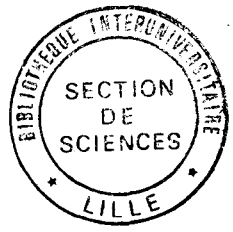
50376
1988
221



50376
1988
221

N° d'ordre : 2103

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THESE DE DOCTORAT

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

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

Philippe NIRDé

LES ECDYSTEROIDES PARASITAIRES

Soutenue, le 16 Décembre 1988 devant la commission d'examen:

Professeurs	Jean	MONTREUIL,	Président
	Maurice	PORCHET,	Rapporteur
	René	LAFONT,	Rapporteur
	Pierre	FORMSTECHER,	Rapporteur
	André	CAPRON,	Examinateur

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires du
Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire
du Professeur **André CAPRON**.
(Unité mixte INSERM U 167 - CNRS URA 155)
Institut **PASTEUR** de Lille.

Avec les collaborations de :

Max	De REGGI
Jean Paul	DESSAINT
Bertrand	SELLIN
Gérard	TORPIER
Georges	TSOUPRAS
Charles	LUTSCH
Jean Yves	CESBRON

A ma femme ,

Ces huit longues années de séparation ont été un obstacle permanent à une vie équilibrée et harmonieuse.

Je lui dédie particulièrement cette thèse pour lui exprimer mon éternelle gratitude pour son immense courage et sa compréhension.

A la mémoire de mon Père,

A mon fils Pierre.

AVANT PROPOS.

A mon maître
Monsieur le Professeur André CAPRON
Membre de l'Académie des Sciences

Vous m'avez très chaleureusement accueilli dans votre laboratoire et c'est à vous que je dois ma formation scientifique. J'ai pu apprécier votre très large culture scientifique et votre ouverture d'esprit. Ma situation personnelle m'a permis de bénéficier de vos grandes qualités humaines. Je suis très heureux et fier d'être votre élève.

Que ce travail reflète le témoignage de ma très sincère reconnaissance et de mon respectueux attachement.

A mon Président de jury de thèse,
Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL.

Vous me faites aujourd'hui l'honneur de présider ce jury de thèse. Je vous remercie d'avoir bien voulu consacrer une partie de votre précieux temps pour l'analyse de ce travail.

Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur Maurice PORCHET

J'ai toujours trouvé auprès de vous une large compréhension jointe à un bienveillant intérêt et à de précieux conseils. Avec nos modèles expérimentaux qui sortent des sentiers battus, vous m'avez encouragé à maintenir les nouveaux concepts face à nos détracteurs. Vous me faites aujourd'hui l'honneur de bien vouloir juger cette thèse.

Qu'il me soit permis de vous exprimer ici ma profonde gratitude.

Monsieur le Professeur René LAFONT

Directeur du Laboratoire de Biochimie et Physiologie du Développement,
Ecole Normale Supérieure, CNRS URA 117.

Je suis très honoré de pouvoir bénéficier de votre compétence et vous suis particulièrement reconnaissant d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect

Monsieur le Docteur FORMSTRECHER,

Vous me faites aujourd'hui l'honneur de bien vouloir juger cette thèse. Je vous remercie de votre bienveillance et vous exprime ici toute ma gratitude.

Je rends un hommage particulier à toutes celles et à tous ceux qui m'ont apporté leur aide, de près où de loin, dans la réalisation de ce travail.

A tous les techniciens, notamment à Patrick FRESSANCOURT pour sa contribution technique et le plaisir que j'ai eu à travailler avec lui.

A la fondation Américaine, Edna McConnel (New-York) pour avoir financé pendant deux ans ce programme de recherche.

Au CNRS et à l'INSERM pour leur soutient financier pendant toute la durée de ce travail.

Ce travail a été l'objet des communications suivantes:

Brevet d'invention:

CAPRON, A.; DELAAGE, M.A.; DE REGGI, M.L.; HIRN, M. & NIRDE, P. (1983) Médicament et Vaccin pour lutter contre les parasitoses à helminthes, dérivant d'un composé ecdystéroïdes. N° 83-03297.

Articles originaux:

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

2: NIRDE, P.; TORPIER, G.; DE REGGI, M.L. & CAPRON, A. (1983) **F.E.B.S. Letters** 151(2) : 223-227. Ecdysone and 20-hydroxy-ecdysone: New hormones for the human parasite *Schistosoma mansoni.*

3: NIRDE, P.; TORPIER, G.; CAPRON, A.; DELAAGE, M.A. & DE REGGI, M.L. (1984) in: **Biosynthesis, Metabolism and mode of action of invertebrate hormones** -J. Hoffmann & M. Porchet (Eds.)- Springer Verlag, Berlin. Ecdysteroids in schistosomes and host-parasite relationship, pp 331-337.

4: NIRDE, P.; DE REGGI, M.L.; TSOUPRAS, G.; TORPIER, G.; FRESSANCOURT, P. & CAPRON, A. (1984) **F.E.B.S. Letters** 168(2) : 235-240. Excretion of ecdysteroids as a marker of parasite infection.

5: NIRDE, P. (1986) **J. Autom. Chem.** 3(1) : 28-31. Treatment of superoxide dismutase by a regression method.

6: NIRDE, P.; DE REGGI, M.L. & CAPRON, A. (1986) **J. Chem. Ecol.** 12(8) : 1863-1884. Fundamental aspects and potential roles of ecdysteroids in schistosomes: An update overview.

7: NIRDE, P.; LUTSCH, C.; CESBRON, J.Y. & CAPRON (1988) Soumis. Ecdysteroids in the biological fluids of vertebrates infected with Brugia malayi.

8: LUTSCH, C.; CESBRON, J-Y.; NIRDE, P.; BARBIER, M.; VIDAL, F.; RAFFENE, L.; AJANA, F. & CAPRON, A. (1988) soumis. Diagnostic value of the assay of circulating antigen for filariasis.

Communication à des congrès (sur invitation):

NIRDE, P.; DE REGGI, M.L.; TORPIER, G. & CAPRON, A. Londres, Mai 1982. **International Congress of the Royal Society of Medecine and Tropical Hygiene.**

NIRDE, P.; TORPIER, G.; CAPRON, A. & DELAAGE, M.A. Strabourg, Septembre 1983. II **colloque International du CNRS** sur les hormones d'invertébrés.

NIRDE, P. & CAPRON, A. Baltimore - The John Hopkins University (USA) Mai 1985. **International Conference** on: Chemical communication and regulation of sexual reproduction, growth and maturation in schistosomes.

Communication dans d'autres thématiques:

NIRDE, P.; DELBOS, M.; COMBES, D. (1988) **Plant. Phys. Biol.** 26 : 211-212. Pollen storage by a new cryoperservation technique.

INTRODUCTION

Les parasites peuvent être définis comme des être vivants qui pendant une partie de leur vie, ou la totalité, se nourrissent de diverses substances d'un autre être sans le détruire. Cette union peut être bénéfique à l'hôte, c'est le cas des symbiotes.(par exemple l'association *Azotobacter* et Légumineuses). Presque tous les embranchements du règne végétal ou animal possèdent des représentants qui se sont adaptés à la vie parasitaire.

Chez l'homme, les maladies parasitaires constituent un problème majeur de santé publique dans plus de 70 pays tropicaux et représentent un obstacle majeur à l'évolution des pays en voie de développement. Parmi celles-ci, les schistosomiases[1] touchent plus de 200 millions de personne et sont responsables du décès annuel de près d'un million d'entres elles.

Découvertes au milieu du siècle dernier par l'allemand Théodore BILHARZ (1851), les bilharzioses sont des pathologies dues à des vers gonochoriques du genre *Schistosoma*, appartenant à l'embranchement des Plathelminthes.

Cinq espèces sont pathogènes pour l'homme:

- *Schistosoma mansoni* (SAMBON, 1907) agent de la bilharziose intestinale et hépato-splénique,

- *Schistosoma japonicum* (KATSURADA, 1904) agent de la bilharziose artério-veineuse et hépato-splénique,

- *Schistosoma mekongi* (VOGE, 1978) espèce nouvellement séparée de *S.japonicum*,

1: ou Bilharzioses

- *Schistosoma intercalatum* (FISHER, 1934) agent de la bilharziose rectale,

- *Schistosoma haematobium* (BILHARZ, 1852) agent de la bilharziose vésicale.

Chez l'homme cette pathologie est millénaire. L'argument a été fourni par la présence d'oeufs enkystés de schistosomes dans la momie d'un roi d'Egypte de la XVIIIe dynastie: TOUTHANKAMON.

Comme beaucoup de parasites, les schistosomes présentent des adaptations étonnantes pour réussir son cycle biologique qui implique obligatoirement et successivement un mollusque d'eau douce appelé **hôte intermédiaire** et un vertébré: l'**hôte définitif**.

Adapté au parasitisme depuis quelques 250 millions d'années, les schistosomes ont parfaitement appris à faire face à des situations peu favorables chez leurs hôtes définitifs. En particulier, a déjouer les mécanismes immunologiques de l'hôte, principaux acteurs de l'interface hôte-parasite.

Grâce à la fois, à l'existence de modèles expérimentaux (rat, hamster, souris et singe) et à l'évolution des techniques biochimiques de ces dernières décennies, les travaux ont été orientés vers une meilleure compréhension des mécanismes multifactoriels, mis en jeux dans l'interface hôte-parasite. Le décryptage de ces mécanismes immunologiques ne peut être abordé que par des études *in-vitro*. Même si elles ne peuvent refléter la complexité des mécanismes réellement existant *in-vivo*, elles ont le mérite de révéler le rôle possible de tel ou tel mécanisme immunologique et d'en étudier les modulations.

Dès l'infestation parasitaire, le système immunologique de l'hôte définitif réagit pour rejeter cette population indésirable. Cette défense non spécifique fait intervenir l'activation du complément par la voie alterne. Si cette réponse immune est efficace les schistosomes ont trouvés la parade:

l'inhibition de cette voie alterne. Elle s'opère par la présence, à la surface des schistosomules, des récepteurs du C_{1q} et du C_{3b} de sorte qu'en fixant ces molécules, les parasites déplétent leur micro-environnement en C_{1q} et C_{3b}, donc inactivent la voie du complément.

La pénétration des formes infestantes de schistosomes[2] induit la production d'anticorps, parasites spécifiques à partir de la 4ème semaine post infestation, permettant à l'hôte d'élaborer des réactions de défenses spécifiques (**CAPRON** et al. 1987).

La réponse immune de l'hôte fait intervenir des phagocytes mononucléés comme les macrophages et des éosinophiles en présence d'anticorps de classe IgE (**CAPRON** et al. 1975) et de sous classe IgG_{2A}. Ces anticorps dirigés contre le parasite induisent l'activation, l'adhérence et la cytotoxicité des cellules effectrices vis-à-vis de jeunes schistosomules.

Malgré l'efficacité de ces systèmes, l'expérience indique que le parasite devient très vite insensible à ces attaques immunes. En particulier grâce à de nombreuses différenciations du parasite chez son hôte définitif.

Les recherches effectuées sur la différenciation du complexe externe délimitant le tégument externe du parasite ont apporté les prémices d'une phase 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 observable, 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 des arthropodes où ces métamorphoses sont induites par une famille hormonale spécifique: Les hormones ecdystéroïdes.

Les ecdystéroïdes jouant un rôle primordial chez les invertébrés et la physiologie des trématodes présentant de nombreuses lacunes, il nous a

2: ou cercaires

paru essentiel de mieux comprendre les réactions endocrines essentielles dont dépendent le développement et les mécanismes de défense du parasite.

Cependant, avant d'aborder nos travaux en détail, nous rappellerons les données essentielles à la fois sur la biologie des schistosomes et sur les hormones ecdystéroïdes chez les invertébrés.

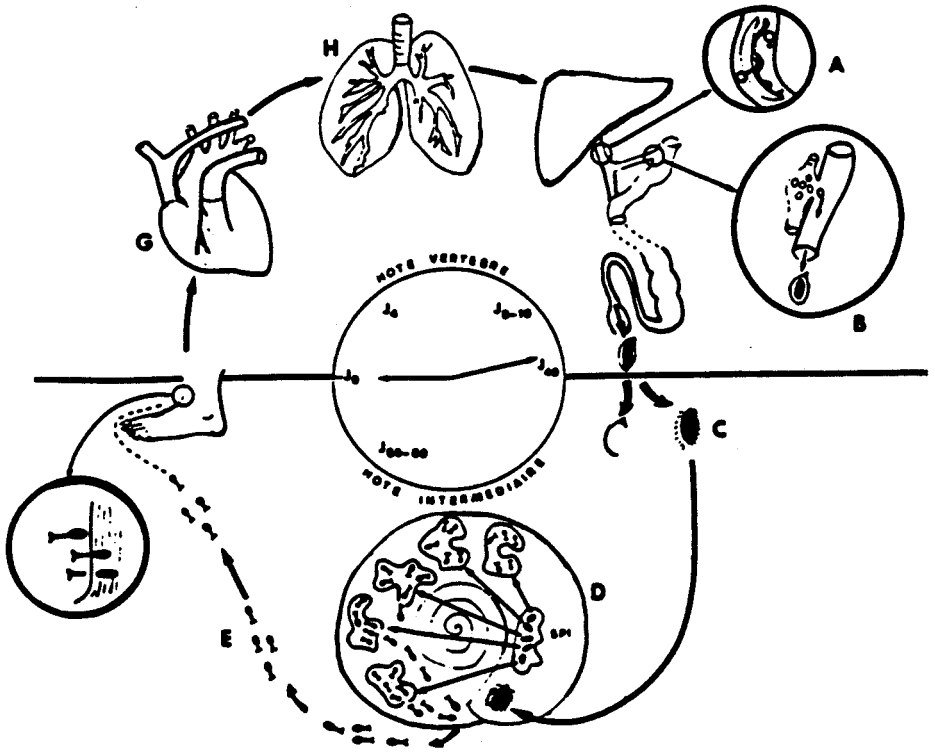
I.1 - LES SCHISTOSOMIASES .

I.1.1 GENERALITES.

I.1.1.1 - 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 dans les ramifications de la veine porte et tout spécialement dans le plexus mésentérique inférieur (Fig.I.A).

Figure I



La production de sperme est continue et c'est au niveau des capillaires de la sous-muqueuse intestinale que les femelles fécondées pondent leurs oeufs. Plusieurs centaines, voire des milliers, d'oeufs sont émis chaque jour par femelle

Chaque oeuf pourvu d'un éperon latéral, caractéristique de l'espèce *S.mansoni*, diffuse des enzymes qui provoquent de graves lésions tissulaires pouvant conduire à des tumeurs cancéreuses épithéliales (carcinomes).

Les oeufs s'accumulent dans les fins capillaires superficiels et provoquent leur congestion. Les oeufs traversent alors la paroi intestinale et pénètrent dans la lumière de cet organe (Fig. I.B).

Les oeufs embryonés au moment de la ponte et rejetés à l'extérieur de l'organisme avec les fèces du malade, n'éclosent qu'au contact de l'eau douce. Ils libèrent alors un miracidium (Fig. I.C).

A ce stade, le cycle évolutif du parasite nécessite obligatoirement l'intervention d'un hôte intermédiaire approprié: un mollusque gastéropode pulmoné spécifique de chaque espèce de schistosomes.

Bulinus contortus pour *Schistosoma haematobium*
Biomphalaria glabrata pour *Schistosoma mansoni*
Oncomélania nosophora pour *Schistosoma japonicum*
Bulinus forstralii pour *Schistosoma intercalatum.*

Le miracidium,larve nageante ciliée phototrope, pénètre le mollusque au niveau des tentacules par chimiotactisme. Il y détermine des déformations et un gonflement permettant de reconnaître les mollusques parasités.

Ce miracidium va subir des transformations biologiques pour devenir sporocyste primaire contenant des cellules germinales dans lequel bourgeonnent des sporocystes fils qui donnent naissance après passage dans les glandes digestives du mollusque hôte à des furcocercaires (Fig.

I.D). Ces formes ultimes seront libérées par le mollusque parasité 30 à 40 jours après son infestation selon une chronobiologie précise. De plus, un phénomène d'amplification par multiplication asexuée permet à un mollusque infesté par un seul miracidium d'émettre plusieurs milliers de cercaires génotypement identiques.

L'évolution du miracidium chez le mollusque est assujettie à des conditions climatiques rigoureuses qui expliquent que, malgré la présence de bulins en Corse et en Languedoc, la parasitose ne peut y prendre un caractère endémique. En effet, la température de l'eau doit être de 28°C pour que les miracidiums se développent. Au dessous de 18°C l'hôte intermédiaire ne peut plus être parasité.

La cercaire est une deuxième larve nageante non ciliée, pourvue d'un appendice caudal bifide. Cette larve infeste activement l'homme par voie transcutanée à l'occasion d'une immersion dans l'eau infestée (Fig. I.E). Ce passage transcutané est facilité par la libération d'enzymes lytiques contenues dans les glandes préacétabulaires de la cercaire. Libération effectuée sous contrôle de son système nerveux. Cette pénétration s'accompagne d'une acquisition d'une double membrane trilamellaire et de la perte de son appendice caudal se transformant en ce que l'on appelle un schistosomule.

Cette nouvelle larve essaime dans les veines et les vaisseaux lymphatiques, gagne le coeur par la circulation de retour (Fig. I.G), puis les poumons. Cette période du cycle est caractérisée par une modification morphologique du parasite qui s'allonge et réduit son diamètre apparent, lui permettant de s'adapter aux fins capillaires pulmonaires. Après retour au coeur, les parasites parviennent au foie par l'intermédiaire de la circulation veineuse du système porte (8ème-10ème jour).

Des travaux récents concernant la cinétique de migration des schistosomes chez la souris indiquent que la phase hépatique commence à J9 avec un recrutement de la population hépatique à J21 (**WILSON** et al., 1986). De plus, 2 à 3 passages foie-poumons-foie via le système vasculaire

semblent être nécessaires aux parasites. Bien qu'il ne nous soit pas permis d'extrapoler de tels résultats de la souris à l'homme, ce type d'expérience porte le message clair que la migration des parasites dans l'organisme hôte n'est pas aussi simple que nous l'avons initialement décrit.

Dans le foie, les parasites deviennent adultes. Les vers adultes après accouplement remontent le flux sanguin à contre-courant et gagnent une ramification veineuse pour la ponte. Les mécanismes biologiques qui gouvernent ce tropisme ne sont pas connus.

I.1.1.2 - Aspects cliniques.

Chez l'homme la réaction cutanée inflammatoire, contemporaine de l'infection et le plus souvent discrète, correspond à la période d'invasion. Cette dermatite correspond à la libération des enzymes cercariennes lors de la destruction des parasites pendant leur phase de pénétration. A cet égard, il a été démontré dans des modèles expérimentaux que la proportion de cercaires de *S.mansoni* qui meurent pendant le passage transcutané varie selon les auteurs et les critères d'évaluation. L'utilisation de cercaires radiomarquées au sélénium est, à mon sens, la technique la plus fiable et indique que 10% seulement des cercaires ne franchissent pas la barrière cutanée (**MANGOLD** et al, 1983). On peut penser que ce pourcentage est du même ordre de grandeur chez l'homme. Les premiers signes cliniques vont apparaître 30 à 40 jours après l'infestation et évoluer en plusieurs étapes en fonction du stade de développement de la population parasitaire.

Le début de la maladie coïncide avec la migration des parasites dans l'organisme et peut être marqué par des symptômes (fièvre, céphalées, anorexie) d'autant plus accentués que le nombre de parasites infestants est élevé.

Des manifestations allergiques (urticaire, myalgies, arthralgies), des troubles respiratoires (toux, douleurs thoraciques, dyspnée) complètent la

symptomatologie mais généralement, les signes gastro-intestinaux (diarrhée, hépatomégalie) sont au premier plan.

Sur le plan hématologique, on décèle une hyperleucocytose et une hyperéosinophilie (> 20%). L'augmentation des transaminases signe l'atteinte hépatique.

La présence des parasites adultes sur leurs lieux de ponte caractérise la période d'état où se dévoilent des signes focaux alors que la symptomatologie générale peut s'estomper.

Cette période est marquée par des poussées de diarrhées et des rectorragies. La rectoscopie montre des lésions inflammatoires résultant de réactions granulomateuses se développant autour des oeufs. Tous les oeufs ne vont malheureusement pas être évacués avec les fèces et vont migrer à l'intérieur de l'organisme de l'hôte avec toutes les conséquences redoutables que cela comporte.

En particulier, au niveau du foie, chaque oeuf va être le point de départ d'un granulome péri-portal, siège d'une réaction fibreuse aboutissant à la fibrose hépatique. Cette fibrose est génératrice d'hypertension portale et de ses complications propres (varices oesophagiennes, ascite).

Le diagnostic de certitude est assuré par la présence d'oeufs dans les selles.

I - 1 - 2. INTERFACE HOTE-PARASITE.

I - 1 - 2 - 1. HOTES SUSCEPTIBLES ET HOTES RESISTANTS.

Le contraste entre spécificité étroite au niveau du mollusque et spécificité large au niveau du vertébré est particulièrement net chez les

schistosomes, sauf pour *S.haematobium*. Cependant, l'évolution du parasite présente des variations selon l'hôte vertébré expérimental qui l'héberge (**BRUMPT**, 1936). Trois catégories d'hôtes peuvent être définies:

- Les hôtes permissifs, comme le hamster, la souris ou le cobaye assurent aux parasites un développement normal et présentent les symptômes de la maladie;
- Les hôtes 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 développent pas la maladie.

LES HOTES PERMISSIFS :

- La souris est le modèle expérimental qui assure une évolution normale au parasite ainsi qu'une sexualité parfaite des vers.

- Le hamster est d'un degré d'efficacité comparable à celui de la souris dans le cas d'infestation à deux sexes (parasites mâles et parasites femelles). Par contre, en infestation unisexuée à cercaires mâles, une certaine labilité de la gonochorie[1] 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'infestations bisexuées (**BUTTNER**, 1950). L'une des illustration les plus significatives de l'influence de l'hôte définitif sur le développement parasitaire 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 différents de développement et dans de rares cas un ovotestis.

1: Du grec *gonos* (génération) et de *khôrismos* (séparation): Séparation complète des sexes dans des individus distincts.

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.

LES HOTES SEMI-PERMISSIFS.

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

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

Inversement, quand des parasites juvéniles 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).

I - 1 - 2 - 2. INFLUENCE DE LA PHYSIOLOGIE DE L'HOTE DEFINITIF SUR LE DEVELOPPEMENT PARASITAIRE.

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 ablation d'organes, soit par injection d'hormones exogènes à l'animal.

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 conséquence, 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).

EFFETS D'HORMONES EXOGENES.

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**, 1970).

L'action des oestrogènes, sous forme d'implant de 20mg, est comparable à celle de la testostérone (**BARRABES** et al., 1979). Certains auteurs pensent

que cette action protectrice est sous la dépendance de la forme tri dimensionnelle de la molécule.

EFFETS DE L'ABLATION DE GLANDES ENDOCRINES DE L'HOTE.

1/ Hypophysectomie. Chez la **souris**, animal permissif pour la schistosomiase, l'hypophysectomie n'altère pas le développement des parasites mais conduit à une diminution de 60% du nombre d'oeufs émis par les femelles. Cependant, les oeufs se développent normalement et donnent naissance à des miracidiums viables (**KNOPF** et al. 1980). Chez **le rat**, hôte semi-permissif rejetant naturellement la population parasitaire dès la 4ème semaine d'infestation (**CIOLI** et al. 1977), l'hypophysectomie prolonge la vie des parasites au delà de la 18 ème semaine et permet la survie à un nombre de parasites 2 à 4 fois plus important que chez les rats normaux (**KNOPF** et al. 1980). L'hypophysectomie du rat assure aux parasites femelles la production et la ponte d'oeufs contenant des miracidiums viables. Fait important, la réponse immune du rat hypophysectomisé est comparable à celle du rat normal (**KNOPF** et al. 1980) ce qui suggère que la perte du statut permissif du rat n'est pas imputable directement à un dysfonctionnement du système immunitaire.

2/ La Thyroïdectomie rend un rat, normalement semi-permissif, permissif à la schistosomiase. Ce statut permissif est analogue à celui obtenu par hypophysectomie (**KNOPF** et al. 1980). Si des injection d'hormones thyroïdiennes T4 sont effectuées avant l'infestation du rat thyroïdectomisé, ce modèle redevient semi-permissif (**KNOPF** et al. 1985). Les réponses immunologiques primaires et secondaires du rat thyroïdectomisé sont analogues à celles du rat normal.

I - 1 - 2 - 2 - 3. STEROIDES METABOLISES PAR *S.mansoni*.

Toutes ces expériences sur l'influence d'hormones exogènes sur le parasite ont conduit des 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 sexuels: Cholestérol, Cortisone, 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).

I - 1 - 2 - 3. INFLUENCE DES PARASITES ENTRE EUX.

Le troisième facteur ayant une action sur le développement parasitaire est la présence ou non du parasite de l'autre sexe. Dans les 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'extrait 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* se développent 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 fût 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).

I - 1 - 3. LES NEUROTRANSMETTEURS: SEULES HORMONES CONNUES

L'étude des hormones propres aux parasites n'a jamais été un axe de recherche prioritaire. La priorité était portée sur la biologie du parasite tels le métabolisme de certaines enzymes ou la formation des oeufs, et sur l'immunologie en vue d'une prophylaxie à court terme.

Les études portant sur le système hormonal sont essentiellement orientées sur les neurotransmetteurs. Dans une revue générale sur l'endocrinologie des principaux représentants du phylum des acoelomates (**WEBB** 1988), auquel appartiennent les plathelminthes, aucun travail n'est mentionné concernant d'autres types d'hormones chez *S.mansoni*

LES AMINES BIOGENES.

Le 5-OH-tryptamine (5-HT) et les catécholamines sont les principales amines biogènes étudiées chez le parasite *S.mansoni*. La 5-OH-tryptamine mise en évidence par les techniques d'immuno-fluorescence est présente dans le parasite à des concentrations dix fois supérieures à celles du cerveau des mammifères (**BENNETT** et al., 1969). Sa localisation est ganglionnaire (**BENNETT** et al., 1971) et la voie anabolique est double : soit

par décarboxylation du 5-OH-tryptophane (5-HTP)(**CATTO** et al., 1981), soit par transport actif de la 5-OH-tryptamine à l'intérieur du parasite (**BENNETT** et al, 1973 - **CATTO** et al, 1979). Les travaux récents de MANSOUR semblent être en faveur d'une accumulation de la 5-HT de l'hôte (**MANSOUR** 1984).

Quant à la voie catabolique, elle conduit à l'acide 5-OH-indol-acétique, grâce à la présence de l'enzyme 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 - **BUEDING** et al, 1982) et de *Fasciola hepatica*, active l'adényl cyclase de *S.mansoni* (**HIGASHI** et al, 1973 - **KASSCHAU** et al, 1982) et de *F.hepatica* (**MANSOUR** et al, 1960), 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.

Les 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 élucidé.

LES ESTERASES.

Mise en évidence par les techniques histochimiques de **BUEDING**, elles sont présentes à tous les stades de développement de *S.mansoni*:

1/ dans les neurones

2/ dans les terminaisons neuromusculaires.

Les estérases ont certainement un rôle à jouer dans les activités motrices sensorielles.

I.2. LES ECDYSTEROIDES CHEZ LES INSECTES.

I.2.1. GENERALITES

I.2.1.1. RAPPELS BIOLOGIQUES.

Les oeufs d'insectes, issus d'une reproduction unisexuée (parthénogenèse) ou bisexuée (cas le plus fréquent), vont donner naissance d'abord à des embryons puis à des larves aptères.

Ces larves vont subir plusieurs **mues** ou métamorphoses conduisant à la nymphe, stade larvaire pourvu d'ébauches alaires, puis à l'adulte.

Cependant, beaucoup d'insectes sont capables de suspendre leur développement biologique à un stade déterminé. Cet événement est appelé **diapause**.

Les mues, comme les diapauses, sont régulées par des hormones spécifiques: Les **hormones ecdystéroïdes**

Cette famille hormonale clé de voûte du développement des insectes, est elle même sous la dépendance de deux autres familles d'hormones:

- Des hormones **peptidiques**, sécrétées par certaines cellules du cerveau: les **PTTHs** (Pro Thoracico Tropic Hormones), qui vont induire la synthèse des ecdystéroïdes,
- Des hormones **sesquiterpéniques**, sécrétées par les corps allates: Les **JHs** (Juvenile hormones) qui vont moduler l'action des hormones ecdystéroïdes.

En raison des différences anatomiques existant entre la larve et l'insecte adulte pour les site de production de l'ecdysone, les voies anaboliques des ecdystéroïdes sont différentes pour chacun de ces stades.

I.2.1.2. LES HORMONES ECDYSTEROIDES.

Le terme ecdystéroïde est le produit de fusion

- de **stéroïde**, terme chimique indiquant que le noyau de base de cette famille moléculaire dérive du cholestérol par aphérèse,
- et de **ecdysis**, terme grec qui signifie la mue, c'est à dire un ensemble de processus biologiques conduisant au développement d'une assise épithéliale et à l'apolyse d'une cuticule.

La première expérience biologique relatant une altération de la mue chez les insectes fut effectuée à la fin du siècle dernier par Eugène BATAILLON (**BATAILLON**, 1894). Ses expériences de ligations chez *Bombyx mori* conduisaient à une demi chrysalide. Il conclut que cette mue anormale était due à une variation de pression engendrée par la pose de la ligature.

La suspicion d'un facteur hormonal impliqué dans les mécanismes de mue des insectes a été évoquée en 1922 (**KOPEC 1922**) mais établie par les travaux de HACHLOW (**HACHLOW 1931**) et confortée par ceux de WIGGLESWORTH (**WIGGLESWORTH 1934**) qui ne mentionnèrent même pas les travaux de KOPEC.

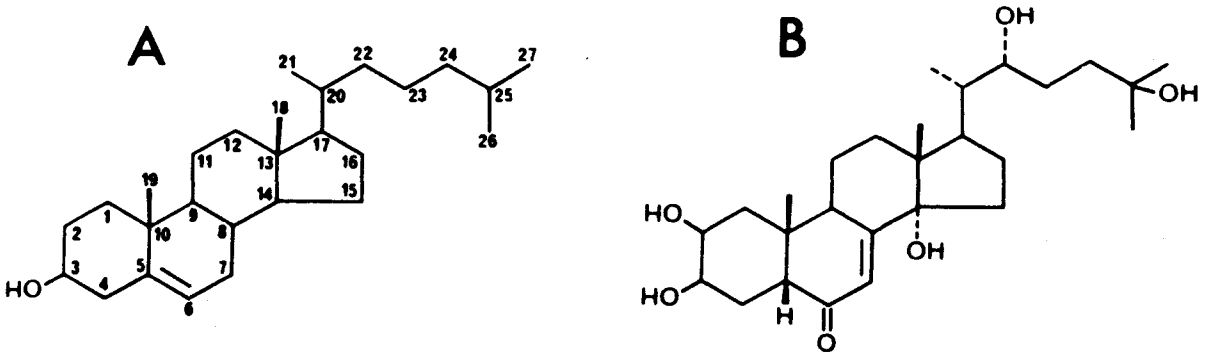
Ce facteur hormonal a été isolé et purifié après 20 ans d'efforts par BUTENANDT (**BUTENANDT et al, 1954**) et baptisé par Peter KARLSON α-ecdysone[2], chef de file historique de cette famille moléculaire.

2: 2β, 3β, 14α, 22R 25 penta-hydroxy-5β-cholest-7-ène-6-one ou **Ecdysone**

Une deuxième hormone, de comportement physico-chimique différent de l'α-ecdysone fut isolée *chez Bombyx mori* à partir de 500 kg de chrysalides par KARLSON en 1956 (**KARLSON 1956**): la β-ecdysone[3].

Ce n'est qu'en 1965 que la configuration de ces nouvelles hormones fut définitivement établie par cristallographie aux R.X. grâce aux travaux de HUBBER (**HUBBER et al, 1965**).

Cholestérol α-ecdysone



La β-ecdysone allait être isolée à partir d'autres espèces que les insectes, notamment à partir de Crustacés (**HAMSPHIRE et al, 1966**), d' Annélides (**PORCHET et al, 1984**) et des Plantes (**NAKANISHI et al, 1966, TAKEMOTO et al, 1967**). Ainsi, apparaissent les termes de zooecdystéroïdes pour représenter les ecdystéroïdes du règne animal et les phytoecdystéroïdes pour celles du règne végétal (Revue: **HETRU** et al, 1980).

3: 2β, 3β, 14α, 20, 22R 25 hexa-hydroxy-5β-cholest-7-ène-6-one ou **20-OH-ecdysone** ou **Ecdystérone**.

A partir de la connaissance de la structure chimique des ecdystéroïdes, la synthèse organique (**KERB et al, 1966**) permettait l'obtention de quantités suffisantes d'hormones pour entreprendre les premières études de l'activité biologique de l'α-ecdysone et de la β-ecdysone.

Elles devaient conduire à la démonstration que la β-ecdysone contrôlait des processus morphologiques dont la mue. C'est ainsi que cette molécule fut considérée universellement comme l'hormone de mue.

Depuis cinquante ans que l'existence de ce type d'hormones est établie, plus d'une centaine d'ecdystéroïdes différentes sont actuellement identifiées. De plus, les travaux sur le rôle des hormones ecdystéroïdes montrent qu'elles ne contrôlent pas seulement la mue post embryonnaire des insectes comme l'évoquaient les premiers travaux mais également le développement embryonnaire des insectes, le développement larvaire et la reproduction des adultes (ovogenèse, spermatogenèse).

Les recherches sur les ecdystéroïdes des insectes sont de loin les plus avancées par rapport aux autres modèles. Afin de donner un schéma général de nos connaissances dans le vaste domaine des hormones ecdystéroïdes, le modèle des insectes servira de référence. En particulier, ce schéma rapportera les résultats acquis principalement sur les espèces *Locusta migratoria*[4], *Bombyx mori*[5] et *Manduca sexta*[6].

Pour mémoire, en dehors des insectes, les ecdystéroïdes sont présentes chez tous les arthropodes (crustacés, myriapodes, arachnides) et chez des non arthropodes (annélides, mollusques, coelentérés). La présence d'ecdystéroïdes chez les parasites ayant pris un essor après les publications des travaux de notre laboratoire, cet aspect sera évoqué dans le chapitre discussion.

4: Criquet migrateur d'Afrique.
5: Vers à soie
6: Vers du tabac

Par rapport aux hormones stéroïdes sexuelles humaines, les ecdystéroïdes, dont la structure chimique a été donnée précédemment, ont les particularités suivantes :

1/ Conservation du précurseur cholestérol en C_{27} avec sa chaîne latérale,
2/ Présence de fonctions hydroxyles supplémentaires qui confèrent une plus grande hydrophilie,
3/ Changement de la configuration à la jonction des cycles A et B. La jonction est 5β-trans comme pour les acides biliaires.
4/ Présence d'une fonction céto-diènique sur le cycle B

I.2.2. LES ECDYSTEROIDES CHEZ LA LARVE.

I.2.2.1. BIOSYNTHESE DE L'ECDYSONE.

Le site de biosynthèse de l'ecdysone est localisé dans des glandes paires du prothotorax: les glandes prothoraciques (*Bombyx mori*: **CHINO** et al, 1974; *Manduca sexta:* **KING** et al, 1974; *Leucophae maderae:* **BORST** et al, 1974, *Locusta migratoria:* **HOFFMANN** et al.,1975).

Cependant, des structures homologues aux glandes prothoraciques présentes dans d'autres espèces jouent également ce rôle de site de production de l'ecdysone (Ring Glands de *Calliphora*, **WILLIG** et al, 1971 ou de *Sarcophaga bullata*, **BOLLENBACHER** et al, 1976; Oenocytes de *Tenebrio molitor*,**ROMER** et al, 1974; organes-Y du crabe.

De par leur structure, les ecdystéroïdes dérivent chimiquement du cholestérol (**KARLSON** et al, 1963), or les insectes sont incapables de cycliser le squalène donc de synthétiser *de novo* le noyau stérol (**CLARK** et al, 1959).

Cette molécule provient des stérols alimentaires ou pour les insectes phytophages des phytostérols alimentaires (**CLAYTON** 1964 - **KAPLANIS** et al. 1980).

La transformation des stérols en cholestérol est réalisée dans le tube digestif ou le corps gras de l'insecte. Le cholestérol, précurseur du noyau ecdystéroïde est véhiculé dans l'hémolymphe par une lipoprotéine: l'Arylphorine. Ce complexe cholestérol-lipoprotéine permet au cholestérol de pénétrer plus facilement à l'intérieur des glandes prothoraciques. Dans les années 70, plusieurs groupes avaient tentés, en vain, de faire produire de l'ecdysone par les glandes prothoraciques *in vitro* en les incubant avec du cholestérol "commercial" radio-marqué. Ces échecs étaient imputés en partie au fait que sans la présence du complexe lipo-protéique le précurseur ne pouvait franchir la barrière membranaire.

Bien que toutes les séquences biochimiques ne soient pas définitivement établies, en particulier en ce qui concerne les hydroxylases impliquées dans la voie anabolique de la biosynthèse, on possède néanmoins les grandes lignes directrices. Dans les glandes prothoraciques les étapes précoces de la biosynthèse de l'ecdysone seraient à partir du cholestérol:

i) la formation des doubles liaisons $\delta 7$,
i) l'addition d'une fonction cétol en 6,
ii) la formation du 6-céto-di-ène,
iv) l'hydroxylation de la molécule en C_{25}, C_{22}, C_{14} et C_2.
(revue: Koolman 1980).

L'ecdysone est ensuite sécrétée par les glandes prothoraciques dans le système hémolymphatique de l'insecte au cours d'un stade larvaire (**HIRN** et al., 1979) et la conversion de l'ecdysone en 20-hydroxy-ecdysone ainsi que la biosynthèse des autres ecdystéroïdes sont assurées par d'autres organes que les glandes prothoraciques (corps gras, tubes de Malpighi ou autres tissus périphériques contenant les mono-oxygénases - Cet aspect sera détaillé ultérieurement).

Quel est le signal biologique qui indique aux glandes prothoraciques d'initier la biosynthèse de l'ecdysone ?

I.2.2.1.1.INITIATION DE LA BIOSYNTHESE.

Cette initiation de la synthèse de l'ecdysone est induite lorsque les glandes prothoraciques sont stimulées par les hormones peptidiques **PTTHs** (**BOLLENBACHER** et al, 1977, 1979).

Ces hormones sont produites par un type de cellules neuro-sécrétrices de la *pars intercerebralis* (**GIRARDIE** et al., 1971 - **AGUI** et al., 1979).

Chez *Bombyx mori*, la nature protéique des PTTHs fut élucidée (**ISHIKAWA** et al, 1963). Il existe au moins deux hormones PTTHs au regard de leur activité et de leur poids moléculaire: La 4K-PTTH et la 22K-PTTH (Revue voir **ISHIZAKI** et al, 1984). L'analyse physico-chimique de la 4K-PTTH indique que cette protéine appartient à la famille des insulines, présentant deux chaînes polypeptidiques de 20 et 28 acides aminés, reliées par des ponts disulfures.

Bien que le mécanisme exact du contrôle de l'initiation de la biosynthèse de l'ecdysone par les PTTHs ne soit pas totalement élucidé, les travaux publiés dans ce domaine plaident en faveur d'une régulation à plusieurs étages:

1/ Intervention d'AMP-cyclique, de calcium et de deux protéines kinases, Ca^{2+} dépendantes, ayant des similitudes avec les iso-enzymes type I et type II de vertébrés (**SMITH** et al, 1986),

2/ Présence d'un deuxième facteur de régulation qui module l'activité des glandes prothoraciques et qui agirait en synergie avec les PTTHs. Ce facteur est une protéine hémo-lymphatique de 30 kD (**WATSON** et al, 1985),

3/ Influences de paramètres biologiques sur les PTTHs:

- Environnement (**MIZOGUCHI** et al., 1982)
- Facteurs humoraux dont la JH (**WATSON** et al.,1985, 1986 - **HIRUMA** et al., 1978, 1980)
- Les ecdystéroïdes elles-mêmes (**BEYDON** et al.,1983).

I.2.2.2. BIOSYNTHESE DE LA 20-OH-ECDYSONE.

La 20-hydroxy-ecdysone (20-OH-ecdysone) est issue de la conversion de l'ecdysone.

Après la synthèse de l'ecdysone dans les glandes prothoraciques, cette hormone est excrétée dans l'hémolymphe pour être reprise par le corps gras[7]. C'est à ce niveau que l'ecdysone sera convertie en 20-OH-ecdysone par un complexe enzymatique à cytochrome P_{450}. La conversion fait intervenir plusieurs facteurs dont l'adényl cyclase (**LEHMANN** et al, 1986).

Ce complexe enzymatique est appelé ecdysone 20-mono-oxygènase (EC 1-14-99-22) bien qu'il s'agisse d'une réaction d'hydroxylation selon le schéma:

$$\text{ecdysone} + O_2 + NADP + H^+ \longrightarrow \text{20-OH-ecdysone} + H_2O + NADP^+$$

Dans ce schéma, il a été démontré chez *L.migratoria* que la constante de MICHAELIS est de l'ordre de 0.3 µM ($K_m \approx 0.3$ µM), alors que la 20-OH-E, produit de la réaction, est un inhibiteur compétitif de cette réaction ($K_i \approx$ 0.7µM),(revue **WEIRICH** et al, 1984).

L'activité du complexe ecdysone 20-mono-oxygènase fut d'abord mis en évidence dans le tube digestif (**NIGG** et al., 1976) puis dans le corps gras (**BOLLENBACHER** et al., 1977) et les tubes de Malpighi[8] (**FEYEREISEN** , 1977). Les glandes prothoraciques ne contiennent pas d'ecdysone 20-mono-oxygènase.

7: Tissu analogue au foie des vertébrés.
8: Tissu analoge aux tubes séminifères des vertébrés.

La localisation subcellulaire de la conversion de l'ecdysone en 20-OH-ecdysone est soit mitochondriale (**SMITH** et al., 1979), soit microsomale (**FEYEREISEN** et al., 1978).

La 20-OH-ecdysone après sa synthèse est relarguée dans l'hémolymphe de sorte que l'ecdysone et la 20-OH-ecdysone coexistent dans ce compartiment. Les rapports entre l'ecdysone et la 20-OH-ecdysone sont variables mais les fluctuations entre ces deux hormones sont toujours associées à des changements morphologiques importants (**LAFONT** et al., 1975 - **BOLLENBACHER** et al., 1975 - **HIRN** et al., 1979).

Du fait de la plus grande activité biologique, dans des tests *in vitro*, de la 20-OH-ecdysone par rapport à l'ecdysone, l'ecdysone est considérée par de nombreux auteurs comme une prohormone et la 20-OH-ecdysone comme l'hormone active (**KING** et al., 1974). Cependant, le schéma réel ne parait pas aussi simple car dans les processus tégumentaires conduisant à la mue ces deux hormones semblent avoir des rôles différents, voire complémentaires. L'ecdysone serait responsable de la crise mitotique de l'épiderme donc de l'apolyse alors que la 20-OH-ecdysone provoquerait la biosynthèse cuticulaire (**PORCHERON** et al, 1984). Il est clair qu'une réponse définitive sera apportée lorsque les chimistes auront trouvé et synthétisé l'inhibiteur de la conversion de l'ecdysone en 20-OH-ecdysone, c'est à dire un inhibiteur spécifique de la 20-mono-oxygénase.

Dans l'hémolymphe, des protéines, de faibles et de fortes affinités, sont capables de lier spécifiquement, soit l'ecdysone, soit la 20-OH-ecdysone, soit indifféremment la 20-OH-ecdysone ou l'ecdysone. Chez *L.migratoria* la protéine qui lie spécifiquement la 20-OH-ecdysone est une protéine acide (pH_i=5.5) de haut poids moléculaire (PM=230 Kd) et de forte affinité pour son substrat (K_d = 1.10^{-7}M) (**FEYEREISEN** et al., 1980), de sorte qu'apparemment près de 80% de la 20-OH-E se trouve sous forme liée.

De plus cette protéine est produite par le corps gras lui même à tous les stades du développement de la larve.-

I.2.2.3.ROLES BIOLOGIQUES DES ECDYSTEROIDES CHEZ LA LARVE .

Cette approche du rôle biologique des ecdystéroïdes chez les insectes a été entreprise selon quatre conceptions expérimentales:

1/ En corrélant les dosages hormonaux à la fois aux modifications morphologiques observées ainsi qu'à l'apparition de systèmes enzymatiques spécifiques,

2/ Par manipulation de larves, soit en posant des ligatures, permettant d'isoler des territoires anatomiques particuliers, soit par ablations de glandes,

3/ Par des études *in vitro* sur des cultures de disques imaginaux, de glandes salivaires, de corps gras ou sur des lignées cellulaires de drosophile provenant de fragments embryonnaires de 6-12 hr (les cellules Kc),

4/ Par des études à un niveau moléculaire, chez des modèles particulièrement bien connus sur le plan génétique comme les Drosophiles.

D'une manière générale, les ecdystéroïdes ont comme principales fonctions l'induction de synthèses protéiques. Ce sont des enzymes impliquées dans la synthèse (ou la dégradation) de la cuticule, des enzymes histolytiques, des protéines de réserve du corps gras, des enzymes de la mélanisation et d'autres enzymes dont la caractérisation se limite pour la majorité d'entre elles à la seule connaissance d'un type d'activité biologique.

Dans le cas de corrélations entre le taux hormonal et des modifications morphologiques l'exemple classique est l'apparition de pic hémolymphatique d'ecdysone chez la larve de *Bombyx mori* qui précède chacune des quatre mues larvaires.

Chez *Locusta*, le premier pic hémolymphatique est concomitant d'une intense activité mitotique des cellules épidermiques. Le deuxième pic est

concomitant de l'apolyse et du dépôt de l'épicuticule. Enfin le troisième pic est corrélé au dépôt de la procuticule.

L'observation d'un développement normal de disques imaginaux d'une larve de drosophile après sa transplantation vers l'hémocoele d'une larve receveuse indiquait que la totalité du tissu environnant n'était pas nécessaire. Ces expériences ont conduit au développement des cultures *in vitro* de disques imaginaux dans des milieux appropriés. L'avantage d'un tel système de culture réside dans le fait que les disques imaginaux ne produisent pas d'hormones ecdystéroïdes, ni ne les métabolisent. Ainsi, les réponses biologiques sont dues aux seules molécules incorporées dans le milieu (i.e. les ecdystéroïdes). Ces propriétés sont également vraies pour les cultures des lignées Kc.

Dans ce type de modèle biologique, les changements morphologiques attribués aux hormones ecdystéroïdes sont multiples:

1/ **L'évagination** des disques imaginaux est induite par la seule 20-OH-Ecdysone à des concentrations molaires inférieures à 10^{-7}M, puis, le **dépôt de la cuticule** a lieu lors de la brusque diminution du taux hormonal.

2/ Le **dépôt de la pro-cuticule** est induite par des concentrations molaires en 20-OH-ecdysone de 10^{-6}M. La pro-cuticule est formée de chaîne de chitine (polymères de N-Acétyl-Glucosamine).

Dans les lignées cellulaires Kc, des activités enzymatiques, ecdystérone induite, ont été obtenues après stimulation hormonale. L'une des particularité de ces expériences est l'apparition tardive de la réponse ecdystéroïde qui se situe après au moins 12 heures de stimulation.

Les lignées Kc ont permis de mettre en évidence les activités enzymatiques, ecdystéroïde induite, suivantes:

- Acétyl-choline-estérase
- Catalase
- Dopa-décarboxylase (DDC)
- β-Galactosidase

- Superoxide dismutase (SOD)

Par ailleurs, la 20-OH-ecdysone à 10 nM est capable d'induire la synthèse d'actine II et d'actine III issue du gène 5C. Par contre l'actine I issue du gène 57A n'est pas sous le contrôle de l'ecdysone

D'autres activités ont été attribuées à l'ecdysone, par exemple la phosphorylation de la 30 Kd (ITOH et al. 1985) dont le comportement électrophorètique est analogue à celui de la protéine ribosomique 6S (ITOH et al. 1986).

L'induction de tubuline issue du gène 60 C (MONTPIED et al. 1988) est également sous la dépendance des hormones ecdystéroïdes.

Pendant les dernières phases de la métamorphose, l'insecte doit "ré-agencer" ses tissus internes pour prendre l'aspect adulte. Ces remaniements impliquent, entres autres étapes, la disparition des organes existants comme des muscles ou des neurones. Les hormones ecdystéroïdes semblent jouer un rôle prépondérant dans cette étape. En particulier, il a été démontré que la dégénérescence de la paire de motoneurones située au niveau du 3ème ganglion abdominal, cellules MN 12, correspond à une chute du taux hormonal (BENNETT et al. 1985 -FAHRBACH et al. 1987).

L'action des ecdystéroïdes, à un niveau chromosomique, a été mise en évidence par CLEVER et KARLSON (CLEVER et al. 1960) lorsqu'ils ont observé la présence de puffs dans les glandes salivaires de *Chironomus tentans*. Le concept du mode d'action des hormones avec une action directe sur la chromatine venait de naître, il allait être également valable pour les hormones de vertébrés. Ce sont les difficultés techniques, en particulier le manque d'hormones ecdystéroïdes radioactives de forte activité spécifique et biologiquement actives qui ont permis à ce concept de se développer beaucoup plus rapidement chez les vertébrés. Il aura fallu attendre 1978 pour démontrer l'existence de récepteurs protéiques pour les ecdystéroïdes. L'évolution récente des techniques de biologie moléculaire et de culture cellulaire ont permis l'étude du mode d'action des ecdystéroïdes dans des modèles biologiques (Glandes salivaires, Corps gras, disques imaginaux,

lignée cellulaire Kc). (Revues: **ASHBURNER** 1980, **PONGS** 1984, **RICHARDS** et al, 1984).

Au niveau cellulaire, les ecdystéroïdes pénétrent les membranes cytoplasmiques et nucléaires pour se fixer sur l'ADN chromosomique.

Les études menées sur des gènes, analogues aux gènes de cellules Kc des puffs précoces des glandes salivaires et inductibles par les ecdystéroïdes, montrent que ces gènes produisent, après traduction, des polypeptides appelés E.I.P. (Ecdysteroid Inducible Polypeptides): EIP 40 et EIP 28/29 pour les protéines de 40 Kd, 28 Kd et 29Kd (**SAVAKIS** et al, 1980). Il existe sur le locus 55 B-D une seule copie d'un gène responsable des formes EIP 40 et sur le locus 71CD une seule copie du gène EIP 28/29. EIP 28 et EIP 29 sont le produit d'un seul transcrit. Les mRNAs matures de EIP 28 et de EIP 29 ne diffèrent que par 12 nucléotides et résultent de splicing différent du transcrit initial unique. Quant au gène EIP 40 il est transcrit dans deux directions opposées donnant deux protéines différentes. Les séquences régulatrices sont situées en amont du site d'initiation de la transcription. Il faut noter que la longueur de ces séquences régulatrices sont dix fois plus longues que celle des bactéries.

I.2.3. LES ECDYSTEROIDES CHEZ L'ADULTE.

Dès 1956, Peter KARLSON avait observé que des femelles de *Bombyx mori* contenaient des ecdystéroïdes (**KARLSON** et al, 1956). Cependant, compte tenu des faibles taux dosés, ces résultats avaient été interprétés comme des taux résiduels persistant chez l'adulte après ses mues pupales.

Le hasard a voulu que cette observation soit isolée et les résultats ont rejoint les greniers pendant.....20 ans.

Les années 75 ont été plus favorables pour cet axe thématique des ecdystéroïdes chez les adultes en ce sens que plusieurs équipes, à peu près à la même époque, ont publié (re-publié) ce type d'observation.

La présence d'hormones ecdystéroïdes chez l'insecte adulte a été détectée tout à fait fortuitement dans ces années 75.

En suivant le dernier et 5ème pic larvaire d'ecdystéroïdes chez *Locusta migratoria* l'équipe de Jules HOFFMANN confirma qu'après l'émergence il ne restait que quelques traces d'ecdystéroïdes (**HOFFMANN** et al. 1975). Résultats en parfait accord avec les modifications anatomiques de l'insecte puisque les glandes prothoraciques, productrices d'ecdysone, régressent et dégénèrent quelques heures après cette émergence.

C'est en poursuivant leurs dosages qu'ils eurent la surprise de constater des taux d'hormones ecdystéroïdes plus de dix fois supérieurs aux taux rencontrés chez la larve. Cette observation confirmait les travaux d'autres équipes (**HAGEDORN** et al. 1975), ce qui confortait ce nouveau concept face au septicisme du reste de la communauté scientifique.

Il fallait donc, pour convaincre, reprendre des études des voies anaboliques de l'ecdysone chez l'adulte.

I.2.3.1. BIOSYNTHESE DE L'ECDYSONE OVARIENNE.

Les femelles adultes synthétisaient des ecdystéroïdes et ces molécules étaient accumulées dans les ovaires. Résultats obtenus par les techniques d'ablation et de cultures *in vitro* (**HANAOKA** et al. 1974 sur *Bombyx mori*, **HAGEDORN** et al, 1975 sur *Aedes aegypti*, **HOFFMANN** et al, 1976 sur *Locusta migratoria*, **DELBECQUE** et al, 1978 sur *Macrotermes*).

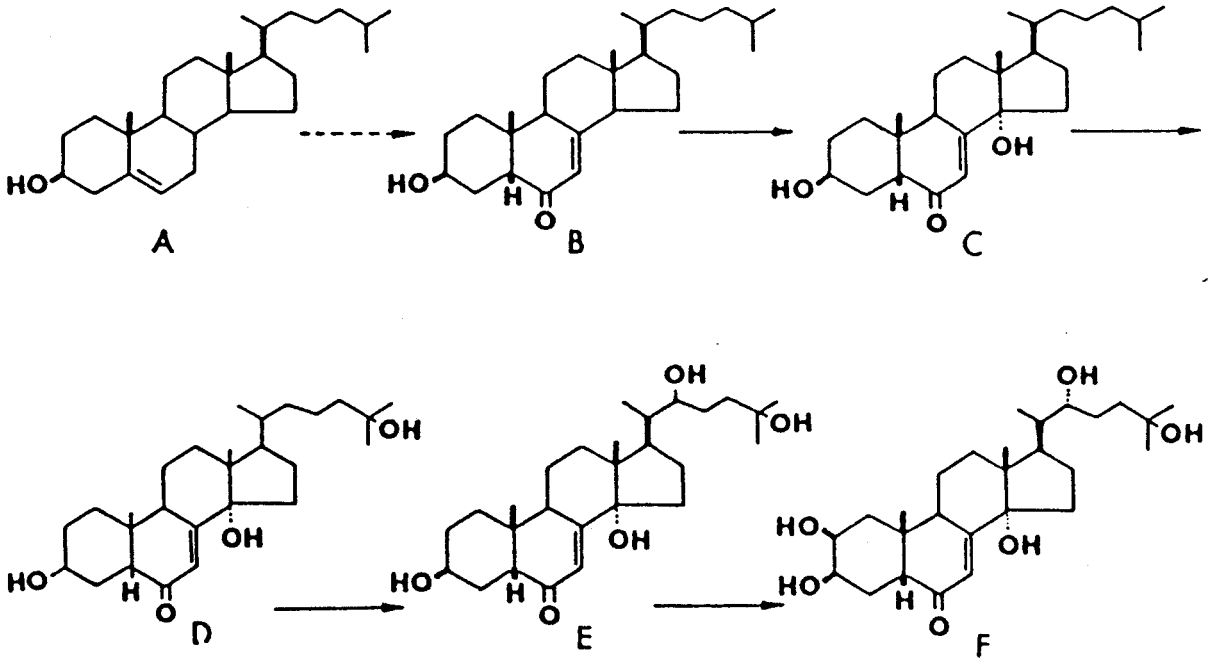
Le lieu exact de la biosynthèse d'ecdysone est l'épithélium folliculaire entourant les oocytes terminaux (**GOLTZENE** et al, 1978).

Le cycle ovarien de *Locusta* est d'une dizaine de jours. Cependant, la production d'ecdysone par les cellules folliculaires ne s'effectue qu'à la fin de la vitellogenèse pour se terminer à l'ovulation: la synthèse n'a pas durée plus d'une dizaine d'heures.

L'analyse des ecdystéroïdes chez les insectes adultes allait conduire à la mise en évidence de nouvelles molécules, dans les oeufs et les embryons, telles la 26-hydroxy-ecdysone, la 20,26 dihydroxy-ecdysone et la makistérone A, une molécule d'ecdystéroïde en C_{28}.

Les voies de biosynthèse de l'ecdysone "ovarienne" chez *Locusta* sont déduites de résultats portant sur l'identification chimique de précurseurs obtenus par conversion biochimique de molécules tritiées après incubation *in vitro* d'ovaires (**OHNISHI** et al. 1981 - **HETRU** et al. 1978). Plusieurs voies métaboliques ont été proposées selon le type d'insecte (*Bombyx mori, Locusta migratoria*). Les grandes lignes de cette biosynthèse seraient à partir d'un précurseur probable cholestérol:

1/ Formation du 7-déhydro-cholestérol
2/ synthèse du Kétodiol ou 2,22,25 tri-déoxy-ecdysone
3/ Hydroxylation en C_{25} puis en C_{22},
4/ Hydroxylation en C_2.



Possible pathway of ecdysteroid biosynthesis in *Locusta* ovary. A, cholesterol; B, 2,14,22,25-tetradeoxyecdysone; C, 2,22,25-trideoxyecdysone; D, 2,22-bisdeoxyecdysone; E, 2-deoxyecdysone; F, ecdysone. [From Hetru et al, 1978.]

La majorité des molécules d'ecdystéroïdes synthétisées restent au stade 2-déoxy-ecdysone (sous la forme d'un ester 22-adénosine-monophosphorique - TSOUPRAS et al, 1983), un tiers seulement est converti en ecdysone.

De plus, chez *Locusta migratoria*, la presque totalité des ecdystéroïdes ovariennes sont conjuguées et près de 98% des hormones passent dans les oocytes où elles sont liées à la vitelline (LAGUEUX et al, 1981). Les concentrations d'ecdystéroïdes ovariennes sont très importantes, de l'ordre de 100 µM pour les conjugués de 2-déoxy-ecdysone et de 50 µM pour les conjugués d'ecdysone; taux hormonaux exceptionnels dans le règne animal.

Les conjugués majeurs identifiés chez les femelles de *Locusta migratoria* sont le 22-adénosine-ester-mono-phosphate-2-déoxy-ecdysone et le 3-phosphate-3-épi-2-déoxy-ecdysone (TSOUPRAS et al, 1982).

Cette concentration importante d'ecdystéroïdes ovariennes n'exclue pas le fait que l'on retrouve, certes à de faibles taux, des ecdystéroïdes dans l'hémoplymphe des adultes (KING et al, 1974 sur *Leucophae maderae*, KOOLMAN et al, 1979 sur *Calliphora erythrocephala*, HANAOKA et al, 1980 sur *Aedes aegypti*, .

Dans les autres espèces que *Locusta migratoria* ce concept général reste vrai. Seules des fluctuations dans la balance hormones ovariennes-hormones hémolymphatiques sont décrites. C'est le cas notamment chez *Galleria mellonella*, où le taux des ecdystéroïdes présentes dans les ovaires représente 60 à 70% des ecdystéroïdes totaux (BOLLENBACHER et al, 1978). L'un des cas extrême serait *Bombyx mori* où la totalité des ecdystéroïdes siègent dans l'ovaire (ONISHI et al, 1977, 1981).

I.2.3.1.1.INITIATION DE LA BIOSYNTHESE.

Les expériences biologiques d'ablation, de cautérisation et d'implant sur les corps allates, les cellules neurosécrétrices du cerveau ou les corps cardiaques, orientèrent rapidement les recherches du facteur d'initiation vers les cellules neurosécrétrices de la *pars intercerebralis*. Le facteur

hormonal a été mis en évidence et appelé "follicule cell tropic hormone" (FCTH) (**CHARLET** et al. 1979).

La structure de cette hormone protéique folliculotrope n'est pas encore connue mais elle pourrait être comme les PTTH ou la EDNH ("egg development neuro hormone", de *Aedes aegypti*).

Quant aux insectes mâles adultes, des hormones ecdystéroïdes ont été détectées. En l'absence d'ovaires, ce sont les enveloppes testiculaires qui synthétiseraient l'ecdysone (**SHIMIZU** et al. 1985, **LOEB** et al. 1982, **LOEB** et al. 1986).

I.2.3.2.ROLES BIOLOGIQUES DES ECDYSTEROIDES CHEZ L'ADULTE.

Chez les Diptères, l'ecdysone passe dans l'hémolymphe pour réguler la production de vitellogénine des femelles (**HAGEDORN** et al, 1973, **FALLON** et al, 1974 sur *Aedes aegypti*), entraîner la mise au repos des corps allates en fin de vitellogenèse (Blattes), provoquer la libération de la neurohormone de ponte (Rhodnius) et stimuler les contractions utérines (Glossine, Grillon). Fait unique, des injections d'ecdysone induisent la synthèse de vitellogènine chez le mâle. En situation physiologique, la 20-OH-ecdysone induit la spermatogenèse du mâle (Revue **HAGEDORN**, 1983).

Par contre, chez *Locusta migratoria*, il existe une faible fraction d'ecdysone libre qui s'accumule au pôle postérieur de l'ovocyte. L'hormone y atteint de fortes concentrations (20µM) au moment de la réinitiation méiotique de l'ovocyte qui était bloqué en métaphase 1. Les conjugués, principalement des 22 phosphates d'ecdysone, sont hydrolysés pendant l'embryogenèse et permet à l'embryon de disposer d'ecdysone libre. C'est grâce à cette "réserve" que la cuticulogenèse embryonaire s'effectuerait. (Revue: **HOFFMANN** et al, 1986).

I.2.4. METABOLITES DES ECDYSTEROIDES.

Le métabolisme de l'ecdysone joue un rôle important dans la régulation des hormones circulantes car il conduit à l'inactivation des molécules d'ecdysone et de 20-OH-ecdysone, en tous cas, diminue de façon significative l'affinité du métabolite pour le récepteur de l'ecdysone ou de la 20-OH-ecdysone.

Des paramètres multiples sont impliqués dans le métabolisme de ces stéroïdes; type d'arthropode, sexe, stade de développement, conditions physiologiques, etc.. rendant laborieux une étude exhaustive de ce chapitre.

L'ecdysone peut être hydroxylée, oxydée, réduite, conjuguée à d'autres molécules biologiques, sa chaîne latérale peut être coupée, des réactions d'isomérisation peuvent avoir lieu (**KING** et al, 1969, **KING** 1972, **HOFFMANN** et al, 1974, **KOOLMAN** et al, 1979, **LAFONT** et al, 1980, **LAFONT** et al, 1984.

Cependant les sites où s'opèrent ces modifications sur la molécule sont restreints et peuvent se résumer ainsi:

CYCLE A:

en 2: conjugaison

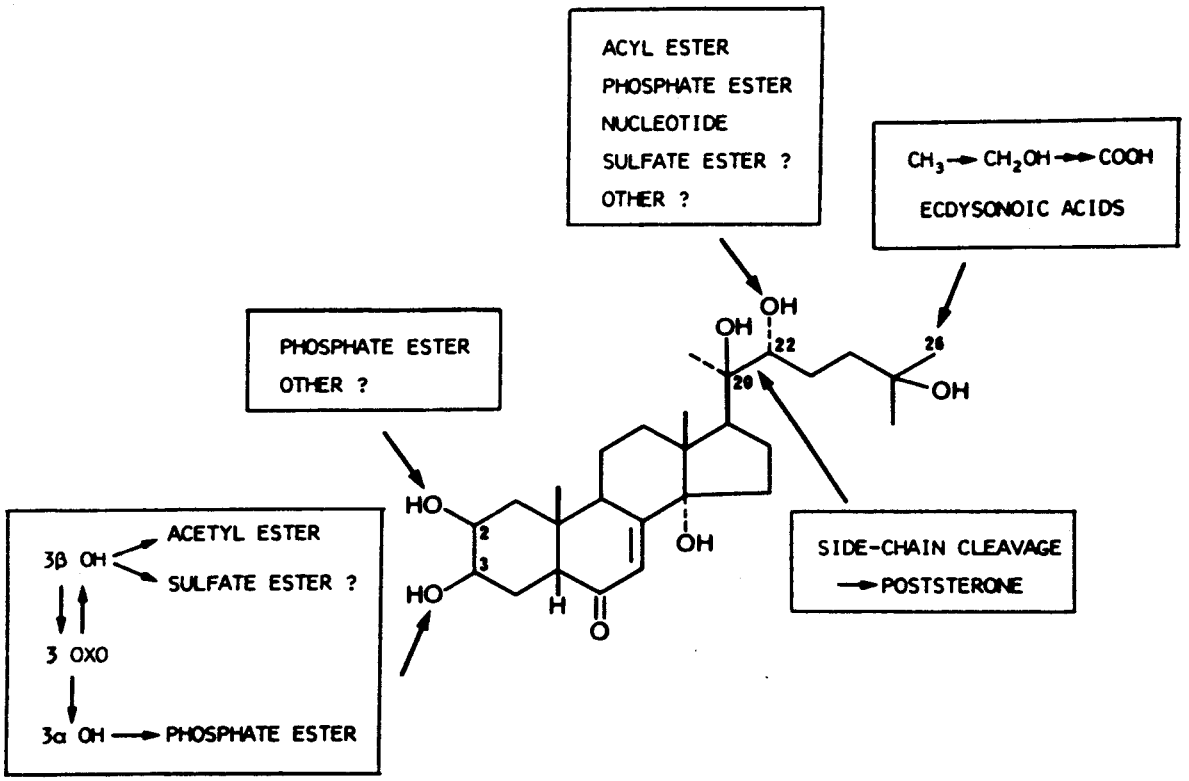
en 3: conjugaison
oxydation
réduction
épimérisation

CHAINE LATERALE:

en 20: hydroxylation

en 22: conjugaison
coupure C20-C22

en 26: hydroxylation
oxydation



Les métabolites ne se limitent pas à une seule modification sur le cycle. Ainsi, une structure possible telle la 3β(α-gluco pyranoside) 20-hydroxy-

ecdysone en est une illustration. Dans ce cas, l'existence du glucoside branché en C_3 sur un noyau 20-OH-E a été trouvée *in vivo* et la configuration citée n'est confirmée qu'*in vitro* (KING 1972). Cet exemple souligne le fait que ces études sont délicates et que bien qu'ayant des arguments sur leur présence *in vivo*, la structure n'est établie qu'à partir d'expériences menées *in vitro* sur des préparations enzymatiques.

Ces métabolites ont donc des polarités différentes du précurseur initial, ce qui a conduit Jan KOOLMAN à classer ces métabolites en trois grands groupes (**KOOLMAN, J.** 1982):

GROUPE 1: ecdystéroïdes de polarité analogue à l'ecdysone.
GROUPE 2: ecdystéroïdes très polaires.
GROUPE 3: ecdystéroïdes moins polaires que l'ecdysone.

La caractérisation par HPLC d'un certains nombres de conjugués peut poser des problèmes expérimentaux. En particulier, il n'est pas rare d'avoir le même temps d'élution pour le conjugué et un standard de référence. (ISAAC et al, 1981).

En plus des problèmes expérimentaux, se pose le problème de l'analyse des résultats. Dans toutes études scientifiques, l'obtention de valeurs chiffrées des résultats est un point important pour leur interprétation. La base de notre travail étant fondé sur le dosage des hormones ecdystéroïdes, le chapitre suivant est entièrement consacré à l'analyse mathématique et à l'informatisation des calculs numériques.

CHAPITRE II

CALCULS INFORMATISES DES RESULTATS.

II - 1 - DOSAGE DES HORMONES ECDYSTEROIDES.

II - 1 - 1. NECESSITE D'UN CALCUL INFORMATISE.

L'analyse des hormones ecdystéroïdes est effectuée par dosage radio-immunologique et l'étude de ces hormones allait devenir la base de notre travail. Face au nombre important de résultats expérimentaux à devoir traiter, un calcul informatisé s'imposait. Il permettait à la fois le traitement rapide des résultats mais surtout excluait les erreurs de calcul inhérentes à l'homme dans de grandes séries.

Cet apprentissage des concepts et du langage informatique fut long et fastidieux dans un environnement où peu comprenait ma nouvelle démarche scientifique.

Aujourd'hui, ces efforts permettent aux équipes Lilloises étudiant les hormones ecdystéroïdes d'être dotées de logiciels parfaitement adaptés aux contraintes expérimentales et humaines. Ceci est d'autant plus utile que la technique récente du dosage des ecdystéroïdes sur tubes "coatés" permet l'analyse simultanée d'un nombre encore plus important d'échantillons.

II - 1 - 2. ARCHITECTURE DU PROGRAMME.

Le schéma général du programme se décompose en trois grandes parties:

1/ Gestion de la courbe de référence

2/ Interpolation linéaire et calcul de la quantité d'ecdystérone contenue dans un échantillon biologique,

3/ Gestion de la bibliothèque de données expérimentales.

II - 1 - 2 - 1. COURBE DE REFERENCE.

La courbe de référence de l'ecdysone ou de la 20-OH-ecdysone est établie d'abord graphiquement en construisant la courbe B/T = f(log C), obtenue après dialyse (avec C, concentration molaire en ecdystéroïde, s'échelonnant de 10^{-12}M à 10^{-5}M).

Cette courbe de type sigmoïde est segmentée à partir de $C=10^{-10.3}$M. L'incrément est de $C=10^{-0.3}$M. A chaque concentration correspond une valeur de B/T qui est mémorisée dans une variable R(x), puis stockée sur disque sous forme de fichier dont le label est toujours "REF".

Grâce à une gestion minutieuse des fichiers de l'ensemble du programme ECDYSONE.EXE, on stocke à la fois la courbe de référence issue de la technique de dialyse à l'équilibre comme celles issues de la technique des "tubes coatés".

II - 1 - 2 - 2. INTERPOLATIONS LINEAIRES.

L'utilisation du dialyseur donne 2 valeurs de radioactivité: L'une correspondant à l'antigène libre et l'autre à l'antigène libre et lié. La somme des deux compartiments correspondant à l'antigène radiomarqué total.

Le taux de liaison satisfait la relation:

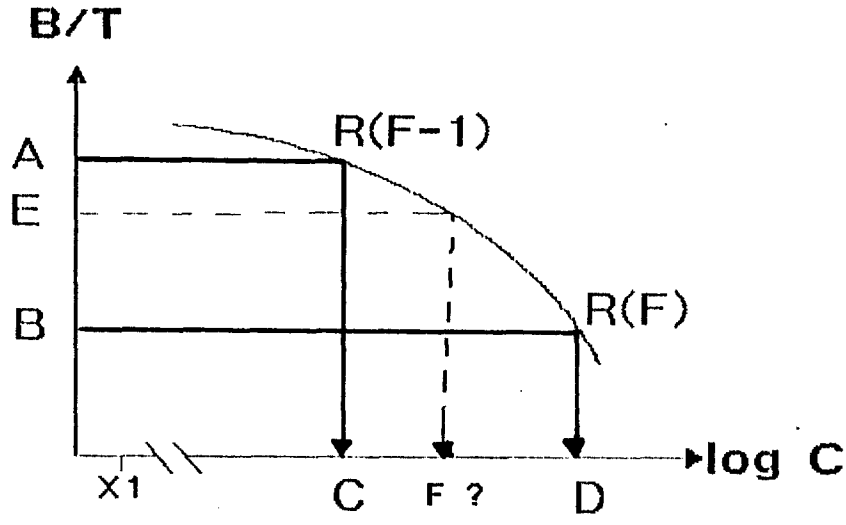
$$\frac{B}{T} = \frac{\text{CPM côté AC} - \text{CPM côté Ag}}{\text{CPM côté AC} + \text{CPM côté Ag}}$$

A partir de cette valeur du B/T , la concentration hormonale de l'échantillon sera calculée par interpolation linéaire de la courbe standard.

II-1-2-2-1. ETUDE MATHEMATIQUE D'UNE INTERPOLATION LINEAIRE.

soit X_1 l'origine de la courbe de référence et X_2 l'incrément selon les abscisses qui séparent deux concentrations contiguës d'ecdystéroïde.

Soit **C** l'abscisse d'un point standard **R(F-1)** ayant **A** comme valeur de B/T, et **D** l'abscisse d'un point standard **R(F)** ayant **B** comme valeur de B/T (Fig. II.1).



Soit **E** la valeur du B/T de l'échantillon biologique obtenue après dialyse, dont l'abscisse **F** est à calculer.

Pour des points **C** et **D** voisins, le segment de courbe,

|r(F-1),r(F)| peut être assimilé à sa corde r(F-1),r(F). Les régles de trigonométrie en coordonnées cartésiennes rectangulaires donnent la relation suivante:

$$\frac{CF}{CD} = \frac{AE}{AB}$$

d'où

$$CF = AE * CD / AB \qquad \text{(équation 1)}$$

La valeur de l'abscisse C, du point R(F−1), par rapport à l'origine de la courbe standard est égale à:

$$X_1 + X_2 * F$$

Par construction: $AE = R(F-1) - E$ (2)

et $AB = R(F-1) - R(F)$ (3)

comme par définition $X_2 = CD$ (4)

l'équation (1) devient, en fonction de (2), (3) et (4):

$$CD = (R(F-1)-E) * X2 / (R(F-1)-R(F)) \quad (5)$$

Or: Abscisse de F = Abscisse de C + CF (6)

La valeur de l'abscisse de C est reliée à l'origine X_1 de la courbe à la fois par le nombre d'intervalles entiers le séparant de X_1 et par la valeur de l'incrément X_2.

Le nombre d'intervalles entiers d'un point d'ordre i−1 est i ($\forall$ i ε N^{*+}), d'où l'abscisse C du point d'ordonnée R(F−1).

$$\text{Abscisse } C = ((F-1) - 1) * X_2$$

$$= F * X_2 \qquad (7)$$

Des équations (5), (6) et (7), il en résulte que l'abscisse F, d'un point

dont le B/T est E, a pour expression:

$$F = (((R(F-1)-E) / (R(F-1)-R(F)) + F) * X_2) + X_1$$

La quantité hormonale correspondante sera obtenue en intégrant les paramètres expérimentaux: P,(poids de l'échantillon), H (volume ou homogènat de l'extrait) et D (dilution avant dosage) selon la relation:

$$Q = \frac{H \times P \times 10^{(F+B)}}{P}$$

II - 1 - 2 - 3. GESTION DE LA BIBLIOTHEQUE DE DONNEES.

Pour chaque échantillon, l'ensemble des données expérimentales est stocké sur mémoire ROM propre à chaque système informatique (généralement sur disquette 5' 1/4). Ceci a l'avantage de pouvoir conserver tous les résultats.

Des répertoires logiques sont créés au gré de l'utilisateur selon la technique utilisée (dialyse ou tubes coatés). La liste des fichiers, pour chaque répertoire, est accessible à partir de l'option "Lectures des fichiers" du programme.

Grâce à ce stockage, toutes les données expérimentales sont accessibles à tous moments. Ainsi, l'analyse peut être effectuée ultérieurement, retraitée, ou imprimée, sans devoir repupîtrer les centaines de données expérimentales.

II - 1 - 3. SOFTWARE.

L'ensemble du logiciel permettant ce calcul est écrit sous GWBASIC Microsoft®, puis compilé par un compilateur BASIC approprié (QUICKBASIC). Ce programme compilé en fait un logiciel autonome PC compatible, supportant

aussi bien un écran monochrome qu'un écran couleur émulé par une carte EGA.

L'option /o a été utilisée pendant la compilation. Elle autorise la liaison avec la bibliothèque d'appels aux *routines* d'entrée/sortie. La liaison du fichier programme objet avec la bibliothèque est effectuée par l'instruction DOS suivante:

LINK fichier.OBJ, fichier.EXE, , BCOM20.LIB

Cette formule à l'avantage d'obtenir un fichier unique directement exécutable qui ne nécessite plus la présence du module BRUN20.EXE. L'éditions de liens avec la bibliothèque d'exécution BCOM20.LIB présente les avantages suivants:

- Programme plus court
- Exécution plus rapide

mais requiert toujours 28Ko de plus sur le disque que la compilation normale.

Pour des modifications mineures du programme exécutable, l'utilitaire DEBUG permettra de modifier le contenu des registres du microprocesseur sans devoir ré-assembler le programme objet.

La totalité des instructions de compilation est rassemblée dans un fichier de procédures automatiques (*.BAT) utilisant des caractères remplaçables %1, %2, %3.

II - 1 - 4. REALISATION PRATIQUE.

Afin de permettre aux futurs utilisateurs de disposer d'un logiciel "clé en main" leur permettant le dosage d'un système ligand-substrat, issu soit du principe conceptuel des "tubes coatés" , soit d'une dialyse à l'équilibre, la liste des instructions en langage BASIC Microsoft[R] est donnée en annexe. Une disquette 5'1/4, pour PC compatible, prête à l'emploi est également fournie. Le lancement de la disquette, une fois insérer dans le lecteur A: s'effectue par les instructions classiques suivantes:

1/ Pupitrer	A:	puis valider
2/ Pupitrer	AUTOEXEC	puis valider.

II - 2 - DOSAGE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE.

II - 2 - 2. NECESSITE DE L'OUTIL INFORMATIQUE.

L'une des principales difficultés rencontrées avec le modèle parasitaire est la faible abondance de matériel biologique, de sorte que toutes les techniques enzymatiques ne sont pas directement applicables : C'est le cas de l'enzyme superoxide dismutase (S.O.D.).

De plus , la S.O.D. des schistosomes, contenue dans un extrait biologique est instable ce qui exclut même le stockage des échantillons à -20°C.

Pour simplifier encore l'approche expérimentale, la technique de dosage de la S.O.D décrite par Mc CORD et FRIDOVICH (1969) ne s'applique qu'aux échantillons biologiques contenant **au moins** une unité enzymatique[1].

Ces conditions sont incompatibles avec certains stades parasitaires étudiés.

Le seul moyen de contourner de telles difficultés était d'établir le modèle mathématique auquel obéissait ce dosage dans toutes ces phases expérimentales.

II - 2 - 2 - MODELE MATHEMATIQUE DU DOSAGE.

On appelle déterminant D du 2nd ordre, représenté par la matrice

$\begin{vmatrix} a1 & b1 \\ a2 & b2 \end{vmatrix}$, l'expression : a1.b2 - a2.b1.

On peut donc écrire :

1: Une unité enzymatique est la quantité de SOD qui inhibe de 50% la vitesse de réduction du ferri-cytochrome C (0.0125 DO/mn)

$$\begin{vmatrix} a1 & b1 \\ a2 & b2 \end{vmatrix} = a1.b2 - a2.b1$$

a1, b1, a2 et b2 sont appelés les **éléments** du déterminant.

La première ligne est constituée par les éléments a1 et b1, la première colonne par les éléments a1 et a2.

On appelle déterminant du 3ème ordre, représenté par la

matrice $\begin{vmatrix} a1 & b1 & c1 \\ a2 & b2 & c2 \\ a3 & b3 & c3 \end{vmatrix}$

l'expression $D = a1 \begin{vmatrix} b2 & c2 \\ b3 & c3 \end{vmatrix} - b1 \begin{vmatrix} a2 & c2 \\ a3 & c3 \end{vmatrix} + c1 \begin{vmatrix} a2 & b2 \\ a3 & b3 \end{vmatrix}$

D'après la définition du déterminant du 2nd ordre,

$$D = a1(b2.c3 - b3.c2) - b1(a2.c3 - a3.c2) + c1(a2.b3 - a3.b2)$$

Le déterminant $\begin{vmatrix} b2 & c2 \\ b3 & c3 \end{vmatrix}$ s'appelle le mineur relatif à l'élément a1. On l'obtient en supprimant dans le déterminant donné, la ligne et la colonne où se trouve l'élément.

Par suite, le déterminant du 4ème ordre de la matrice

$$\begin{vmatrix} a1 & b1 & c1 & d1 \\ a2 & b2 & c2 & d2 \\ a3 & b3 & c3 & d3 \\ a4 & b4 & c4 & d4 \end{vmatrix}$$

aura pour expression

$$a1.\begin{vmatrix} b2 & c2 & d2 \\ b3 & c3 & d3 \\ b4 & c4 & d4 \end{vmatrix} - b1.\begin{vmatrix} a2 & c2 & d2 \\ a3 & c3 & d3 \\ a4 & c4 & d4 \end{vmatrix} + c1.\begin{vmatrix} a2 & b2 & d2 \\ a3 & b3 & d3 \\ a4 & b4 & d4 \end{vmatrix} - d1.\begin{vmatrix} a2 & b2 & c2 \\ a3 & b3 & c3 \\ a4 & b4 & c4 \end{vmatrix}$$

Nous verrons que l'étude du modèle mathématique du dosage de la superoxide dismutase fait appel à un déterminant d'ordre six.

II - 2 - 2 -.1 . Applications aux systèmes d'équations.

Dans le cas de systèmes d'équations linéaires à plusieurs inconnues, le calcul matriciel devient un outil mathématique performant.

L'étude d'un exemple permettra de mieux assimiler la portée d'un calcul matriciel.

Soit le système linéaire suivant, dont les termes x,y et z sont à calculer.

$$\begin{aligned} a1.x + b1.y + c1.z &= d_1 \\ a2.x + b2.y + c2.z &= d_2 \\ a3.x + b3.y + c3.z &= d_3 \end{aligned}$$

Traditionnellement, pour résoudre un tel système d'équations, on procéde par substitutions, méthode longue et fastidieuse.

Par l'approche matricielle, on forme les deux matrices, celle des termes constants, C, et celle des termes inconnus M.

$$C = \begin{vmatrix} d_1 \\ d_2 \\ d_3 \end{vmatrix} \qquad M = \begin{vmatrix} a1 & b1 & c1 \\ a2 & b2 & c2 \\ a3 & b3 & c3 \end{vmatrix}$$

puis celles des termes en x, Mx, en y, My et en z, Mz. Elles sont obtenues en remplaçant dans M les coefficients d'une colonne donnée par la matrice des termes constants.

d'où

$$Mx = \begin{vmatrix} d_1 & b1 & c1 \\ d_2 & b2 & c2 \\ d_3 & b3 & c3 \end{vmatrix}, \quad My = \begin{vmatrix} a1 & d_1 & c1 \\ a2 & d_2 & c2 \\ a3 & d_3 & c3 \end{vmatrix}, \quad Mz = \begin{vmatrix} a1 & b1 & d_1 \\ a2 & b2 & d_2 \\ a3 & b3 & d_3 \end{vmatrix}$$

On démontre que si D, Dx, Dy et Dz sont les déterminants des matrices

M, Mx, My et Mz respectivement, alors:

$$x = Dx/D, \quad y = Dy/D \quad \text{et } z = Dz/D$$

II - 2 - 3 -DOSAGE DE LA S.O.D.

Le dosage de la S.O.D fait intervenir deux types de calculs correspondants à deux analyses de courbes distinctes:

1/ Une régression linéaire rendant compte, pour une concentration enzymatique donnée, de la réduction du ferri-cytochrome C en fonction du temps ($DO=f(t)_c$). Cette analyse nous permet d'associer pour chaque concentration enzymatique sa vitesse initiale, donnée par la pente de la droite.

2/ Une régression polynomiale de degré p, pour "corréler" toutes les vitesses initiales de réduction du ferri-cytochrome C aux concentrations enzymatiques correspondantes.

II - 2 - 3 - 1 - REGRESSION LINEAIRE.

La réduction du ferri-cytochrome C, mesurée par son absorption spectrophotométrique, y, varie linéairement au temps d'incubation, x, pendant la durée des mesures.

$$y = a + b.x$$

Expérimentalement, x varie de 0 à 150 secondes et y varie de 0 à 0.050 AUFS. On a cinq points expérimentaux pour tracer la droite de corrélation.

La résolution mathématique d'une régression linéaire est telle que les coefficients a et b sont choisis pour que la valeur de l'expression:

$$Q = \Sigma (y - (a+b.x))^2 \qquad \text{soit minimale.}$$

Cette condition est atteinte lorsque les dérivées partielles de Q sont nulles, c'est-à-dire lorsque :

$$\frac{\delta Q}{\delta a} = \frac{\delta Q}{\delta b} = 0$$

ce qui donne:

$$\frac{\delta Q}{\delta a} = 0 \quad \Longleftrightarrow \Sigma (y - a - b.x) = 0$$

$$\Longleftrightarrow \Sigma y - n.a - b\ \Sigma x = 0$$

d'où :

$$a = (b.\Sigma x - \Sigma y) / n$$

et $\frac{\delta Q}{\delta b} = 0 \quad \Longleftrightarrow \Sigma x.(y - a - b.x) = 0$

$$\Longleftrightarrow \Sigma x.y - a.\Sigma x - b.\Sigma\ x^2 = 0$$

d'où : $$b = \frac{\Sigma x.y. - (\Sigma x.\Sigma y)/n}{\Sigma x^2 + (\Sigma x^2)^2/n}$$

Le coefficient directeur, b, nous donne la pente à l'origine de la courbe, donc la vitesse initiale de la réduction du ferri-cytochrome C par minute, pour une concentration enzymatique donnée.

Nous avons expérimentalement N (N>9) couples de points, c'est-à-dire N vitesses initiales de réduction du ferri-cytochrome C associées à leur concentration enzymatique.

Nous voulons déterminer l'équation de la courbe qui relie tous ces points entres-eux.

V - 2 - 3 - 2 - REGRESSION POLYNOMIALE.

Notre hypothèse est que l'équation de la courbe est un polynôme de degré P, d'expression:

$$y = a_0 + a_1.x + a_2.x^2 + ... + a_p.x^p.$$

Pour chaque couple de valeur, P+1 équations linéaires sont écrites:

$$\begin{array}{lllllll}
\Sigma y & = a_0 . N & + a_1 . \Sigma x & + ... + a_n . \Sigma x^n & + ... + a_p . \Sigma x^p . \\
\Sigma y . x & = a_0 . \Sigma x & + a_1 . \Sigma x^2 & + ... + a_n . \Sigma x^{n+1} & + ... + a_p . \Sigma x^{p+1} . \\
: & = \quad : & \quad : & \quad : & \quad : \\
\Sigma y . x^p & = a_0 . \Sigma x^p & + a_1 . \Sigma x^{p+1} & + ... & + a_p . \Sigma x^{p+p}
\end{array}$$

La matrice M, de déterminant D est formée par les termes inconnus ne contenant que des termes en x (Σx^i) situés à droite du signe d'égalité..

La matrice Y fait intervenir des termes de gauche en y ($\Sigma y.x^i$).

Nous retrouvons ici un système d'équations linéaires dont les coefficients a_0, a_1,....a_p peuvent être calculés à l'aide du déterminant D et des déterminants D_1, D_2,...D_i,.pour les termes en i:

$$a_0 = D_0/D, \quad a_1 = D_1/D, \quad a_p = D_p/D$$

d'où l'expression du polynôme Y = P(X):

$$Y = \frac{D_0}{D}.x^0 + \frac{D_1}{D}.x^1 + ... + \frac{D_n}{D}.x^n + ... + \frac{D_p}{D}.x^p.$$

Les racines de cette équation sont déterminées par itérations successives de la courbe standard Y = P(X). On encadre la vitesse de réduction du ferri-cytochrome C de l'échantillon par deux vitesses contiguës, Y_1 et Y_2, de réduction du ferri-cytochrome C des standards.

Ils leur correspondent les quantités enzymatiques connues des standards, X_1 et X_2, qui encadrent celle de l'échantillon.

Puis on divise par deux le segment (X_1X_2). soit X_3 cette valeur. Le segment (X_1X_3) ou (X_3X_2) encadre la valeur expérimentale de l'échantillon.

Si la vitesse v_3 de réduction du ferri-cytochrome C ainsi calculée est supérieure à la vitesse expérimentale de la réduction du ferri-cytochrome C de l'échantillon, une autre itération est effectuée jusqu'à ce que la valeur ainsi calculée soit égale à la valeur expérimentale de l'échantillon à 10^{-4} près.

Cette méthode converge rapidement en 12 à 14 itérations.

II - 2 - 3 - 3. LIMITES DU MODELE MATHEMATIQUE.

Le modèle de régression polynomiale permet presque toujours d'obtenir l'équation de n'importe quelle fonction telle que des dosages enzymatiques.

Néanmoins, un certain nombre de restrictions doivent être présentes à l'esprit dans l'utilisation de ce type modèle:

1/ Les valeurs des points de références sur l'axe des abscisses doivent être équidistants,

2/ L'approximation n'est valable que pour des interpolations, c'est à dire que la valeur expérimentale de l'échantillon doit être encadrée par deux points de la courbe de référence.

II - 2 - 4 - SOFTWARE.

Le logiciel est réalisé avec le BASIC *WANG 2200 MVP* permettant le calcul matriciel, contrairement au BASIC *Microsoft*® utilisé couramment sur les micro-ordinateurs actuels.

Quatorze opérations matricielles sont permises par le BASIC *WANG MVP* utilisant les régles de l'algèbre linéaire. Elles peuvent être utilisées pour trouver les solutions de systèmes d'équations linéaires.

L'instruction **MAT INV** provoque le calcul du déterminant d'une matrice par la méthode d'élimination de GAUSS - JORDAN.

Grâce à ce software, le calcul du déterminant d'une matrice 6x6 requiert 0.20 seconde.

L'architecture du programme est donné ci-contre, et tient compte, dans la présentation à l'écran, des habitudes expérimentales de l'opérateur. En d'autres termes, le programme s'adapte à l'utilisateur, ce qui fut, du moins, mon soucis permanent.

Le logiciel s'articule en deux grandes parties:

D'une part, l'entrée des données concernant les standards (densité optique du milieu réactionnel, temps de lecture correspondant) et le calcul des coefficients, Σx^i, $\Sigma y.x^i$, nécessaires aux régressions linéaires et polynomiales.

D'autre part, l'entrée des données concernant les échantillons biologiques a doser (densité optique x au temps de lecture y, volume de prise d'essai, dilution, quantité de protéine) et la recherche du contenu enzymatique par les itérations successives.

Une partie commune aux deux parties de programme, la régression linéaire permettant le calcul de la vitesse initiale de la réaction de

réduction du cytochrome C, est placée dans un module autonome appelé sous-programme.

II - 2 - 5. PERTINENCE DU MODELE .

Le polynôme est obtenu a partir de 11 points expérimentaux (figure II.2).

Un polynôme de degré 6 donne des résultats très satisfaisants comme l'indique la figue II.3 où les échantillons sont des dilutions connues d'une solution de référence de SOD. Ceci nous permet d'observer que le modèle mathématique est applicable dans le domaine 0-100% d'inhibition de la courbe standard.

Cette méthode a été l'objet de la publication suivante.

Journal of Automatic Chemistry/*Journal of Clinical Laboratory Automation*, Volume 8, Number 1 (January–March 1986), pages 28–31

Treatment of super oxide dismutase assay by a regression method

Ph. Nirde
Centre d'immunologie & de biologie parasitaire, Unité mixte INSERM U167, CNRS 624. Institute Pasteur. BP 245. 59019 Lille Cedex. France

Introduction

The superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) is a widely distributed enzyme in all aerobic cells [1 and 2]. It is the principal protective enzyme against oxygen toxicity and acts by catalysing the removal of superoxide radical ($O_2^{-\cdot}$) [3 and 4]. The assay of SOD using Xanthine-Xanthine oxidase-Ferricytochrome C was described by McCord and Fridovich in 1969 [5]. Since, this spectroscopic method has been in use for SOD studies in both the medicine and biology.

The assay is based on the rate of reduction of ferricytochrome C measured spectrophotometrically, but this rate of reduction is not proportional to the amount of enzyme added. Therefore samples must be concentrated or diluted to obtain 50% of inhibition of the rate of reduction of ferricytochrome C: one enzyme unit [5]. So this method is not suitable for biologists working on scarce materials where storage of samples, to have enough material for an assay, may be prejudicial to the enzyme molecule.

In order to make the assay available for all samples, a minicomputer program has been developed. Because samples need not be concentrated nor diluted, this program provides a rapid and a useful calculation for the determination of the amount of SOD in samples, especially for biological extracts with low quantities. In addition, the sensitivity of the assay has been improved by a factor of 30 with this computer-aided approach.

Hardware configuration

The WANG 2200 MVP model has a user memory of 45 K bytes. Only 14 K bytes are necessary for the resident program and the variables. This model has an integrated CRT/keyboard which displays 24 lines on screen, each 80 characters in length. The computer is equipped with a fast printer (2221W WANG) for hard copies and a hard disk unit for storing the program.

Software

The WANG BASIC language allows 14 matrix operations. These operations are performed on numeric arrays according to the rules of linear algebra and can be used for the solution of systems of non-singular homogenous linear equations. The 'MAT INV' matrix statement causes matrix inversion by the Gauss-Jordan elimination method. A matrix can be inverted in a significantly shorter time than is possible with BASIC programs. Indeed, whereas other minicomputers store their program text exactly as it is entered by the programmer, the WANG BASIC interpreter converts into one-byte 'text atom' each word of the text program. Thus, the atomized lines permit faster program execution—lines are more compact and can be more rapidly scanned, for example, inverting a 7 × 7 matrix requires 0·20 s. Because no files are used for this logiciel, this program can be easily adapted to BASIC microsoft language.

Mathematical expressions

Rate of reduction of ferricytochrome C: least squares estimation

The model, for calculating the rate of reduction of ferricytochrome C at a known enzyme amount, is:

$$y = a + b\,x \qquad (1)$$

where y is the absorbance and x the time when absorbance is set up. In the least squares estimation, the parameters a and b are chosen so that the value:

$$Q = \Sigma[y-(a + b\,x)]^2 \text{ is minimum.}$$

This condition occurs when the following partial derivatives are zeroing:

$$\frac{\delta Q}{\delta a} = \frac{\delta Q}{\delta b} = 0$$

$$\text{Thus, } \left|\begin{array}{l} \dfrac{\delta Q}{\delta a} = 0 \\ \dfrac{\delta Q}{\delta b} = 0 \end{array}\right. \Longleftrightarrow \left|\begin{array}{l} \Sigma(y - a - b.x) = 0 \\ \Sigma x.(y - a - b.x) = 0 \end{array}\right. \Longleftrightarrow$$

$$\left|\begin{array}{l} \Sigma y - na - b\,\Sigma x = 0 \\ \Sigma y.x - a\,\Sigma x - b\,\Sigma x^2 = 0 \end{array}\right. \Longleftrightarrow \left|\begin{array}{l} a = (b\Sigma x - \Sigma y)/n \\ b = \dfrac{\Sigma x.y - (\Sigma x.\Sigma y)/n}{\Sigma x^2 + (\Sigma x)^2/n} \end{array}\right.$$

Relationship between rate of reduction of ferricytochrome C and enzyme amount

The p-degree polynomial regression model used with one independent variable is:

$$y = a_0 + a_1\,x + a_2\,x^2 + \ldots\ldots + a_p\,x^p \qquad (2)$$

where a_i is called the partial regression coefficient [6].

For each y_i, x_i of N data points, $p + 1$ sets of simultaneous linear equations can be written down:

$$\begin{array}{llll} \Sigma y = a_0 & N + a_1 & \Sigma x + \ldots\ldots + a_p & \Sigma x^p \\ \Sigma x.y = a_0 & \Sigma x + a_1 & \Sigma x^2 + \ldots\ldots + a_p & \Sigma x^{p+1} \\ \Sigma x^2 y = a_0 & \Sigma x^2 + a_1 & \Sigma x^3 + \ldots\ldots + a_p & \Sigma x^{p+2} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \Sigma x_p y = a_0 & \Sigma x_p + a_1 & \Sigma x^{p+1} + \ldots + a_p & \Sigma x^{2.p} \end{array}$$

The numerical coefficient on the right side (i.e. Σx^i) form a matrix M which determinant is D. These coefficients involve only the xs.

$$M = \begin{vmatrix} N & \Sigma x & \ldots\ldots \Sigma x^p \\ \Sigma x & \Sigma x^2 & \ldots\ldots \Sigma x^{p+1} \\ \Sigma x^2 & \Sigma x^3 & \ldots\ldots \Sigma x^{p+2} \\ \vdots & \vdots & \ldots\ldots \vdots \\ \Sigma x^p & \Sigma x^{p+1} & \ldots\ldots \Sigma x^{2.p} \end{vmatrix}$$

Those on the left also involved the ys. Resolution of such a system is mde by Cramer's method: the determinants of the ith partial regression coefficient, D_i, are:

$$D_0 = \begin{vmatrix} \Sigma y & \Sigma x & \Sigma x^p \\ \Sigma y.x & \Sigma x^2 & \ldots \Sigma x^{p+} \\ \Sigma y.x^2 & \Sigma x^3 & \ldots \Sigma x^{p+} \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ \Sigma y.x^p & \Sigma x^{p+1} & \ldots \Sigma x^{2*p} \end{vmatrix}, \quad D_1 = \begin{vmatrix} N & \Sigma y & \ldots \Sigma x^p \\ \Sigma x & \Sigma y.x & \ldots \Sigma x^{p+1} \\ \Sigma x^2 & \Sigma y.x^2 & \ldots \Sigma x^{p+2} \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ \Sigma x^p & \Sigma y.x^p & \ldots \Sigma x^{2*p} \end{vmatrix}$$

$$D_p = \begin{vmatrix} N & \Sigma x & \ldots \Sigma y \\ \Sigma x & \Sigma x^2 & \ldots \Sigma y.x \\ \Sigma x^2 & \Sigma x^3 & \ldots \Sigma y.x^2 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ \Sigma x^p & \Sigma x^{p+1} & \ldots \Sigma y.x^p \end{vmatrix}$$

Thus, the partial coefficient regressions are:

$$a_0 = D_0/D,\ a_1 = D_1/D, \ldots\ldots, a_p = D_p/D$$

The expression of the polynome $y = P(X)$ is:

$$Y = x^0 .D_0/D + x^1 .D_1/D + x^2 .D_2/D + \ldots\ldots + x^p .D_p/D$$

The root of such a polynomial regression is found by succesive iterations on the standard curve. In this case, two rates of reduction of cytochrome C from the standard are considered, including the rate of reduction of cytochrome C from the sample. If $X1$ and $X2$ are the corresponding enzyme amounts of the standard, these minimum and maximum values respectively enclose the unknown enzyme amount of the sample. For each iteration a half decrease of the segement ($X1$, $X2$) (i.e. $X3 = (X1, X2)/2$) is considered, which encloses the unknown enzyme value. If the calculated rate of reduction of cytochrome C from $X3$ is higher than the rate of reduction of cytochrome C from the sample, $X1 = X2$ is set as shown in figure 1. Another iteration is performed until the calculated rate of reduction is the same as the sample with an approximation of 10^{-4}. This method converges rapidly.

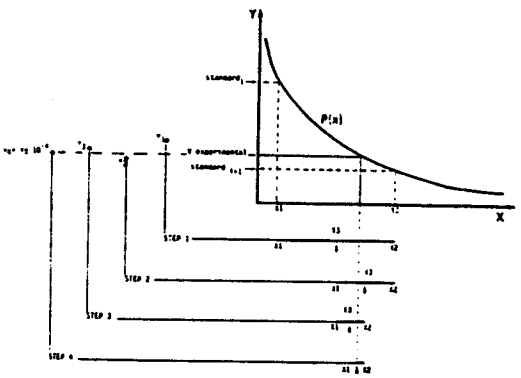


Figure 1. Calculation of the polynomial's root by iterations.

Program description

Standard curve

As shown in figure 2, for a known enzyme concentration a set of experimental data points, x_i (time) and y_i (absorbance) are introduced. The coefficients Σx, Σy, Σx^2 and $\Sigma x.y$ are calculated in a subroutine. Finally, the coefficient b of equation 2 (i.e. the slope of the straight line) is computed; b represents the rate of reduction of ferricytochrome C for a known enzyme amount.

Another subroutine computes the elements Σx^i and $\Sigma y.x^i$-used for polynomial regression. When only alphanumeric characters are keyed, the operator exits this part of the program and matrix and determinants are computed. The standard curve equation is then calculated and samples can be analysed.

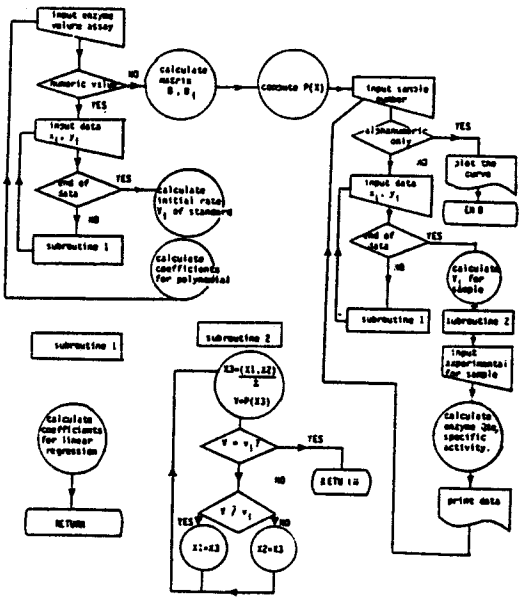


Figure 2. Flowchart of polynomial fitting.

Sample analysis

For samples, as for standard points, the rate of reduction of ferricytochrome C is calculated using a least squares estimation. This program allows the input of replicates by the FOR/NEXT loop. The mean value is calculated and the corresponding enzyme amount is computed by successive iterations in subroutine 2. Experimental parameters, such as initial extraction volume, assay volume and dilution, are integrated for the final calculation of the enzyme amount. Results are then printed. After the last sample is calculated the curve is plotted.

Results

The polynomial curve is fitted with 11 experimental standards whose enzyme amounts are equidistant on the x-axis. Standards have been chosen so that the maximum and minimum rate of reduction of cytochrome C covers those of the samples. All experimental standard points are plotted on a curve (characters 'O')—see figure 3. In these experiments, samples (character '+') were a known dilution mixture of a standard solution. In this way we could verify that the calculated enzyme amount for samples was in good agreement with the real enzyme content. This was so throughout the whole range of 0–100% inhibition of the standard curve (table I).

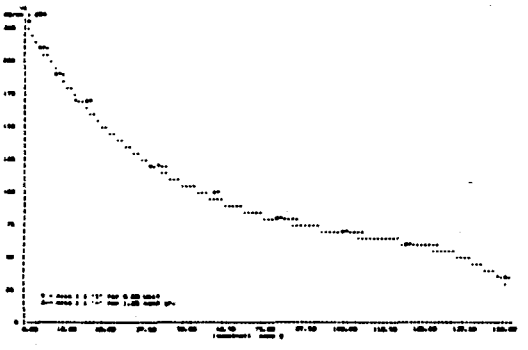


Figure 3. Graph of polynomial model. Because using a typewriter instead of a plotter when experimental and calculated points have the same value all the points are plotted as '.' for theoretical curve, 'o' for standard points and '+' for samples.

Discussion

The polynomial regression model is attractive because it is possible to approximate almost any function, such as the enzymatic assay for SOD. However, restrictions must be kept in mind when using such a mathematical model. The data on the X-axis occurs at equally spaced intervals, and in many cases the approximation is valid only in the region of the data, hence extrapolations are hazardous.

Table 1. Results obtained using the mathematical model.

December, 1984. Expr.: Polynomial adjustment.

SUPEROXIDE DISMUTASE SOLUTION USED : 1 micro g/ml - 21195 units/mg

Volume	Initial speed	Qty SOD 51gma	units Mb
3.000 micro L.	0.0234 0.0/mn	0.30 nano g.	0.3000 U.
5.000 micro L.	0.0214 0.0/mn	5.00 nano g.	0.1059 U.
10.000 micro L.	0.0194 0.0/mn	10.00 nano g.	0.2129 U.
20.000 micro L.	0.0170 0.0/mn	20.00 nano g.	0.4239 U.
40.000 micro L.	0.0122 0.0/mn	40.00 nano g.	0.8478 U.
60.000 micro L.	0.0100 0.0/mn	60.00 nano g.	1.2717 U.
80.000 micro L.	0.0082 0.0/mn	80.00 nano g.	1.6956 U.
100.000 micro L.	0.0072 0.0/mn	100.00 nano g.	2.1195 U.
120.000 micro L.	0.0064 0.0/mn	120.00 nano g.	2.5434 U.
150.000 micro L.	0.0056 0.0/mn	150.00 nano g.	3.1792 U.

To = 233.3

Sample Nb	Initial extract volume	Initial speed	% Inhibit.	Dilut.	Total 51gma 5.0.0 amount	Total enzyme units	Specific activity
0 µl	0.25 ml	.02340 0.0/mn	0 %	1/ 1	0.00 nano g.	0.0000	
1 µl	0.25 ml	.02290 0.0/mn	1 %	1/ 1	1.09 nano g.	0.0231	21182.02 U/mg
2 µl	0.25 ml	.02250 0.0/mn	3 %	1/ 1	2.10 nano g.	0.0447	22354.10 U/mg
5 µl	0.25 ml	.02140 0.0/mn	8 %	1/ 1	5.01 nano g.	0.1063	21277.79 U/mg
10 µl	0.25 ml	.01940 0.0/mn	16 %	1/ 1	10.78 nano g.	0.2285	22850.85 U/mg
15 µl	0.25 ml	.01740 0.0/mn	25 %	1/ 1	17.34 nano g.	0.3676	24506.71 U/mg
20 µl	0.25 ml	.01700 0.0/mn	27 %	1/ 1	20.00 nano g.	0.4239	21195.00 U/mg
40 µl	0.25 ml	.01220 0.0/mn	47 %	1/ 1	41.48 nano g.	0.8792	21981.53 U/mg
60 µl	0.25 ml	.01000 0.0/mn	57 %	1/ 1	60.00 nano g.	1.2717	21195.00 U/mg
80 µl	0.25 ml	.00820 0.0/mn	64 %	1/ 1	80.62 nano g.	1.7088	21360.58 U/mg
100 µl	0.25 ml	.00720 0.0/mn	69 %	1/ 1	100.15 nano g.	2.1228	21228.11 U/mg
120 µl	0.25 ml	.00640 0.0/mn	72 %	1/ 1	120.00 nano g.	2.5434	21195.00 U/mg
150 µl	0.25 ml	.00560 0.0/mn	84 %	1/ 1	149.38 nano g.	3.1789	21192.93 U/mg

From eight standard points onwards, the six degree polynomial gives satisfactory results for the SOD assay. The best results are obtained with 11 data points.

The reason for the development of a polynomial fitting for the SOD assay was the lack of methods available for studying biological material whose SOD content is very low. Whereas one unit was previously needed in the volume assay (50% of inhibition), 0·03 units are now sufficient with the polynomial fitting. Thus, the sensitivity of the enzymatic assay has been improved by a factor of 30. Assays can be performed on very little material and the program may be a useful tool for clinicians and researchers. Indeed, this treatment of SOD assay has allowed the detection of Cu/Zn SOD and Mn SOD in human *Schistosoma mansoni* [7]—so the biological role of these enzymes in *S. mansoni* can now be investigated. Furthermore, in tumor biology, low levels of SOD, particularly extra-cellular SOD (EC-SOD), have been recently reported, rarely in ostensibly normal human cell lines, but rather frequently in malignant cell lines [8]. Moreover, in clinical pneumology, modifications of the oxidant-antioxidant system within the human broncho-alveolar macrophages by intracytoplasmic mineral particules occur, in particular for SOD in coal-worker's pneumoconiosis and silicosis [9]. The assay system described should permit a more rapid and detailed investigations in these fields.

This mathematical model should be applied to research studies on SOD detection, purification, biological role, enzymatic regulation, as well as in a clinical context where large numbers of samples are routinely assayed.

Acknowledgments

The author thanks Professor J. P. Dessaint for valuable discussions and P. Fréssancourt for his skilled technical assistance.

References

1. McCord, J. M. Keele, B. B. Jr. and Fridovitch, I., *Proceedings of the National Academy of Science*, **68**(5) (1971), 1024.
2. Fridovich, I., In *Free Radicals in Biology*, Ed Pryor, W. A. (Academic Press, New York, 1976), I 239.
3. Fridovich, I., McCord, J. M. and Michelson, A. M., In *Superoxide and Superoxide Dismutase*, Eds. Michelson, A. M., McCord, J. M. and Fridovich, I. (Academic Press, New York, 1977), p. 551.
4. Fridovich, I., *Science*, **201** (1978), 875.
5. McCord, J. M. and Fridovich, I., *Journal of Biological Chemistry*, **244** (22) (1969), 6049.
6. Freund, R. J. and Minton, P. D., In *Regression Methods*, Ed. Owen, D. B. (Marcel Dekker, Inc. New York, 1979), **30** 159.
7. Nirde, Ph., International Conference on 'Chemical communication and regulation of sexual reproduction, growth, and maturation in Schistosomes' (Baltimore, 1985).
8. Marklund, S. L., *Journal of Clinical Investigation*, **74** (1984), 1398.
9. Voisin, C., Wallaert, B., Aerts, C. and Grosbois, J. M., In *Third International Workshop on the in vitro Effects of Mineral Dusts* (Springer Verlag, Berlin, 1985).

NEW JOURNAL

In February 1986, The Royal Society of Chemistry will launch a new international periodical entitled *Journal of Analytical Atomic Spectrometry (JAAS)*. Published bimonthly, *JAAS* will contain original research papers, short papers, communications and letters concerned with the development and analytical application of atomic spectrometric techniques. It will also include comprehensive reviews on specific topics, general information and news of interest to analytical atomic spectroscopists including details of forthcoming conferences and book reviews.

An important feature of *JAAS* will be the inclusion of special reviews to be called Atomic Spectrometry Updates. These were formerly published in book form as part of Annual Reports on Analytical Atomic Spectroscopy, which will be discontinued following the introduction of *JAAS*. The review will cover a number of key areas including environmental and agricultural materials; chemical and food materials; instrumentation; industrial chemicals and metals; atomisation and excitation; and minerals and refactories. Successive issues of *JAAS* will review the entire range of topics previously covered by ARAAS to provide a unique current appreciation of developments in analytical atomic spectrometry.

The Editor is Mrs Judith Drew, with Dr J. M. Harnly as US Associate Editor. The Editorial Board includes:

Professor J. M. Ottaway (Strathclyde, UK)
Chairman
Dr M. S. Cresser (Aberdeen, UK)
Dr L. C. Ebdon (Plymouth, UK)
D. L. Miles (Wallingford, UK)
Dr B. L. Sharp (Aberdeen, UK)
Dr M. Thompson (London, UK)
Dr A. M. Ure (Aberdeen, UK)

and the Advisory Board:

Professor F. Adams (Antwerp, Belgium)
Professor R. M. Barnes (Amherst, MA, USA)
L Bezùr (Budapest, Hungary)
Professor R. F. Browner (Atlanta, GA, USA)
Professor L. de Galan (Delft, The Netherlands)
Dr J. B. Dawson (Leeds, UK)
Doz. Dr. sc. K. Dittrich (Leipzig, GDR)
Dr W. Frech (Umea, Sweden)
Dr A. Gray (Guildford, UK)
Professor S. Greenfield (Loughborough, UK)
Professor G. M. Hieftje (Bloomington, IN, USA)
Dr J. M. Mermet (Vernaison, France)
Professor Ni Zhe-ming (Beijing, China)
Dr N. Omenetto (Ispra, Varese, Italy)
Sir Alan Walsh (Victoria, Australia)
Dr B. Weiz (Uberlingen, FRG)
Professor T. S. West (Aberdeen, UK).

The 1986 subscription (ISSN 0267-9477) is £165 (UK) $319 (USA) and £182 (rest of the World). Orders to Royal Society of Chemistry, Distribution Centre, Blackhorse Road, Letchworth, Hertfordshire SG6 1HN, UK.

En conséquences, alors qu'initialement 1 unité enzymatique au moins était nécessaire pour effectuer le dosage de l'enzyme SOD, actuellement 3.10^{-2} Unités seulement sont indispensables pour réaliser cette analyse.

Cette analyse informatisée a permi d'accéder au dosage de la SOD dans tous les stades parasitaires décrits au chapitre IV.

CHAPITRE III.

NAISSANCE D'UNE THEMATIQUE.

Les mécanismes de défense mis en jeux par les hôtes semi-permissifs comme le rat, pour éliminer la population parasitaire faisaient intervenir des mécanismes cellulaires (**CIOLI** et al. 1976, **PHILLIPS** et al. 1975). Cependant, la cinétique de rejet naturel était montrée comme étant dépendante de l'age du parasite plutôt que par la durée d'exposition de l'hôte aux parasites (**CIOLI** et al.1978); un fait difficilement explicable par les seuls mécanismes immunologiques.

L'hypothèse d'un remaniement des protéines intégrales de la membrane induit par anticorps était posé. Pour vérifier cette hypothèse, les techniques de microscopie électronique ont été utilisées. En outre, elles permettaient d'obtenir une réponse visuelle d'un événement biologique.

La publication suivante concerne cette étude de la différentiation du tégument externe de schistosomes agés de 10-20jours (après l'infestation).

Parasitology (1982), 84, 123–130
With 2 plates

Detection of ecdysteroids in the human trematode, *Schistosoma mansoni*

G. TORPIER[1], M. HIRN[2], P. NIRDE[1], M. DE REGGI[2] *and* A. CAPRON[1]

[1] *Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, INSERM U* 167, *Institut Pasteur*, 15 *rue Camille Guérin*, 59019 *Lille Cédex, France*
[2] *Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy*, 70 *route Léon Champ*, 13288 *Marseille Cédex* 2, *France*

(*Accepted* 1 *July* 1981)

SUMMARY

Freeze fracture study of *Schistosoma mansoni* membrane differentiation enabled us to describe the characteristic features of the tegumental membrane complex at various stages of development of this parasite. The observation of a membrane exuviation during the 10–20 day period of infection of the definitive host led us to search for possible hormonal control. The development of an appropriate radioimmunoassay has allowed the detection of significant production of ecdysteroids in a human platyhelminth. This hormonal material undergoes level variation during the development of post-cercarial stages of *S. mansoni* and its precise chemical characterization is presently being investigated.

INTRODUCTION

The human trematode, *Schistosoma mansoni*, has evolved the capacity to complete its life-cycle and to continue oviposition for long periods in a wide range of mammalian hosts (Pitchford, 1977) despite evidence for a significant host immune response (Smithers & Terry, 1969). In contrast to such hosts defined as 'permissive', susceptible rats infected for the first time spontaneously eliminate a large majority of parasites between the 4th and 6th week after infection (mechanism often referred to as 'self-cure phenomenon'). In addition, the few surviving worms are stunted (Cioli & Dennert, 1976) and unable to complete their life-cycle (Cioli, Knopf & Senft, 1977). Previous results have shown that immune mechanisms are involved – at least in part – in inbred rats during initial exposure, and appear to be mediated by thymus-derived cells (Cioli & Dennert, 1976; Phillips *et al.* 1975; Cioli, Malorni, De Martino & Dennert, 1980). However, the timing of 'self-cure' has been shown to depend upon the age of the worm rather than upon the length of host exposure to parasites (Cioli, Blum & Ruppel, 1978) a fact which is difficult to explain only in immunological terms.

Whilst transformation of the cercaria to schistosomulum (Stirewalt, 1974) and morpho-physiological changes accompanying its subsequent developmental stages (Clegg, 1965; Wilson, Draskau, Miller & Lawson, 1978) have been intensively investigated, the differentiation of the tegumental membrane complex (Hockley & McLaren, 1971) has been very little studied (Hockley & McLaren, 1973; Hockley,

McLaren, Ward & Nermut, 1975; Torpier, Capron & Capron, 1977; McLaren, Hockley, Goldring & Hammond, 1978).

The present experiments were undertaken to determine (1) whether cytodifferentiation of the membrane complex, revealed by freeze fracture, is specific for juvenile development stages of *S. mansoni* and (2) whether observed modulation reflects critical events triggered by physiological mechanisms involved in the life-cycle of the parasite.

MATERIALS AND METHODS

Parasites

The *Schistosoma mansoni* used was a Puerto Rican strain maintained in laboratory-reared *Biomphalaria glabrata* snails and hamsters. Cercariae, shed into conditioned tap water, were used within 1 h to produce worms of the required age. Mechanically derived schistosomula were prepared by shearing off the tails of cooled cercariae by Vortex mixing, followed by concentration of the bodies (Ramalho-Pinto *et al.* 1974). These specimens will be referred to as 1-h artificial schistosomula. Juveniles were collected from infected mice on days 6 (lung schistosomula) and day 15 (liver sinusoid and interlobular vein schistosomula) and 40-day adult worms were perfused from mice killed by cervical luxation. Parasites were rinsed in Hanks saline at room temperature before any further treatment. For the radioimmunoassay of ecdysone, parasite stockpiles were used within 6 weeks of storage at −70 °C.

Freeze fracture techniques

The parasite samples were fixed in 2·5% glutaraldehyde in 0·1 M sodium cacodylate buffer, pH 7·2, for 2 h at 4 °C. Freeze fracturing was performed in a Balzers BAF 300 apparatus equipped with an electron beam evaporation device and quartz crystal thin-film monitor. Parasites were fractured at −140 °C using the double replica hinge device and replicas obtained as previously described (Torpier & Capron, 1980).

Freeze fracture nomenclature

According to current terminology (Branton *et al.* 1975) the fracture face of the inner leaflet adjacent to the cytoplasm was named the P face, while its complementary face was designated the E face. During the post-cercarial development of *S. mansoni* the tegumental membrane complex consists of 2 adjacent membranes. So we can see fracture faces P_1, P_2 and E_1, E_2, the index 1 being given to the cytoplasmic membrane and index 2 to the outer membrane.

Extracts

Parasites of each age were homogenized in 96% (v/v) ethanol, heated to 60 °C for 15 min and centrifuged at 800 *g* for 10 min. The pellet was re-extracted twice in the same way. The combined supernatant fluids were dried under nitrogen and the pellets digested at room temperature in 1 M NaOH for protein measurement by the method of Lowry, Rosebrough, Farr & Randall (1951).

Radioimmunoassay (RIA)

The dried extracts were suspended in a known volume (300–400 μl) of 0·1 M citrate buffer at pH 6·2. A pre-determined quantity of [^{125}I]-succinyl-ecdysterone-tyrosine methyl ester (^{125}ISETME) was added to each sample.

This solution was dialysed against antibody for 24 h at 4 °C with constant agitation. The percentage of radioactive antigen bound to the antibody was compared to a standard curve obtained in the same conditions with calibrated solutions of crystalline ecdysone. The results are expressed as picomoles of ecdysterone equivalent/mg of dry tissue, or /parasite. The technique was originally designed by De Reggi, Hirn & Delaage (1975), the immunogen used to raise the antiserum was obtained by succinylation of ecdysterone and conjugation of the hemisuccinate to human serum albumin. Under our conditions, the concentration of ecdysterone required for 50 % inhibition of label binding was 10^{-8} M with serum diluted 1 to 40000.

RESULTS

Ultrastructural studies

During the transformation of cercariae into schistosomula, *S. mansoni* covered its tegumental cytoplasmic membrane with an external membrane resulting from the secretion of lipid leaflets of glandular origin (Hockley & McLaren, 1971; Torpier *et al.* 1977). The distribution of intramembranous particles (IMP) in each of the fracture faces of this membrane complex was characteristic of the developmental stages of the parasite.

The cercarial cytoplasmic membrane was characterized by an important difference in the number of IMPs between the P and E faces (P/E = 30).

During the cercaria–schistosomulum transition, the young schistosomulum P_1 face showed many foci of IMP aggregation located in transitory depressions of the membrane. This phenomenon was rapidly followed by an increase in the affinity of these aggregated particles for the complementary E face. After 1–3 h of evolution, a large number of these IMPs was found associated with the E_1 face whereas a significant remainder of IMPs was still observed in P_1 (Pl. 1 A, C). At that stage, a variable number of IMPs appeared in the newly formed external membrane, and were preferentially associated with the E_2 face (Pl. 1 A).

The membrane complex of the schistosomula which were collected in the lungs of mice infested for 6 days, was characterized by an important number of IMPs in E_2 and E_1 and the remainder of these structures in P_1 (Pl. 1 B, D). The IMPs observed in the E_2 face were highly heterogenous in size. This heterogeneity which probably reflects various degrees of multimerization of the intramembranous structures confers to this fracture face of the lung stage a typical rough aspect (Pl. 1 B).

The membrane complex of juvenile worms obtained from the liver of mice infested for 10–20 days could be defined by (1) a decrease in IMP number in E_2 (Pl. 2 A) compared to the lung stage (Pl. 1 B); (2) an aspect of E_2 similar to that of the adult stage (Pl. 2 A, B and C); (3) a large number of IMP in E_1 (Pl. 2 B) and a net decrease in the number of intramembrane structures in the P_1 face, the aspect

of which was identical to that observed in the adult (Pl. 2B). The P_2 face was almost devoid of particles.

At the adult stage, most of the intramembrane structures were located in the external face, E_2, of the external membrane (Pl. 2B).

The structural differentiation described could be interpreted by a transfer of proteins from the cytoplasmic membrane to the external one. However, quantitative differences in the number of IMPs observed, especially at the E_2 level from the lung stage and onwards could only be explained by the exclusion of membrane components. Thin sections of worms collected during the 10–20 day period allowed us to evolve a membrane exuviation of the tegument of juvenile worms (Pl. 2D). This loss of membranous sheets was concomitant to a discharge of preformed membranes enclosed in multilamellate vesicles a large number of which could be observed fusing with the external complex on freeze fracture replicas (Pl. 2C).

At that step in our study the occurrence of a moulting membrane in *S. mansoni* became a possible explanation to our observations. This phenomenon could represent a true ecdysis event under hormonal control such as occurs in other invertebrates. We thus decided to test this hypothesis by searching for hormone-like substances in *S. mansoni*.

Radioimmunoassay of ecdysone

In preliminary ecdysone assays, citrate buffer extracts of parasites were performed after homogenization in 1 M $HClO_4$ and neutralization with K_2CO_3, according to the method of De Reggi *et al.* (1975). Under these conditions, a significant amount of ecdysteroids was evinced in parasite extracts, a maximum occurring in 6-day-old schistosomula. However, comparison with other stages was

Table 1. *Amounts of ecdysteroids detected in host tissue and parasite extracts by radioimmunoassay*

Extracts	Ecdysone level*	
	Per mg of protein	Per parasite
Parasite		
1-h artificial schistosomula (209500)†	0·028	7×10^{-7}
6-day lung schistosomula (15200)†	2·285	$1{\cdot}2 \times 10^{-5}$
15-day liver worms (7200)†	0·012	$2{\cdot}8 \times 10^{-5}$
40-day adult worms (370)†	0·0195	$3{\cdot}4 \times 10^{-4}$
Uninfected host tissue		
Hepato–pancreas (*B. glabrata*)	0·102	
Mouse lung	0·045	
Mouse liver	0·019	

* The ecdysone level is expressed as picomoles of ecdysterone equivalent /mg of protein or /parasite.

† Number of parasites in parenthesis.

based on levels reported to the unit weight of proteins and did not take into account the number of parasites used.

Thus, a second massive production of worms was undertaken. The extraction was performed as described in the Materials and Methods section. The presence of ecdysteroids in *S. mansoni* was confirmed by a second analysis, the results of which are reported in Table 1. When the results were expressed as picomoles of ecdysterone equivalent /mg of protein, a higher level of moulting hormone was found in 6-day-old lung schistosomula than in the other stages. In contrast, when expressing the result /parasite, a regular increase in the amount of ecdysteroids could be detected from the lung to the adult stage. The very low ecdysone level detected in artificial schistosomula allowed for the exclusion of a possible adsorption of hormone of intermediate host origin (*B. glabrata*) (Table 1) and strongly suggests hormone synthesis by the parasite.

DISCUSSION

S. mansoni is an obligate parasite. Although this metazoan is capable of undergoing some morphological evolution *in vitro* (Clegg, 1965), the membrane complex lining its tegument is unable to differentiate and often shows a complete involution under artificial conditions. This was demonstrated by a detailed analysis of the distribution of integral structures in the various membrane leaflets (Hockley *et al.* 1975; Torpier *et al.* 1977; McLaren *et al.* 1978). The freeze fracture technique enabled us to define the characteristic aspects of the steps of membrane differentiation occurring during the first 6 weeks of development *in vivo*. The structural parameters described led us to suggest a process of transfer of integral structures from the inner to the outer membrane of post-cercarial stages. This possible migration of proteins, the multimerization of which has been evoked for the lung stage, is being verified by freeze fracture and rotary shadowing. Moreover, the characteristics of the membrane of the 10–20-day stage led us to conceive a schistosomulum–juvenile adult transition period. During that period, membrane shedding has been observed on thin sections. Associating this phenomenon with membrane exuviation would at first appear audacious. However, it led us to evince for the first time the occurrence of ecdysteroids in a digenic plathyhelminth. Whereas the detection in nematodes (Horn, Wilkie & Thomson, 1974; Dennis, 1976, 1977*a*, *b*) of insect moulting hormones which also have an effect on cestode growth and reproduction (Kowalski & Thorson, 1976) can easily be integrated in the physiology of the worms, any attempt at explaining it in *S. mansoni* would appear speculative. Detecting this moulting hormone in significant amounts during the juvenile period of the parasite is of interest with regard to the initiation of schistosomulum growth, since it is during the juvenile period between the 10th and 11th day post-infection that larvae leave a semi-quiescent physiological state triggered by a mechanism as yet unknown (Lawson & Wilson, 1980). The inability of *S. mansoni* to synthesize sterols *de novo* is well documented (Meyer, Meyer & Bueding, 1970) and the worm probably largely depends on the host for its ecdysteroid metabolism.

From an immunological point of view, days 6 and 14 in immune mice (Smithers & Gammage, 1980) are crucial for the attrition which occurs after the schistosomes

have left the lungs. It is during this period that we observe the high ecdysteroid levels.

Also, studies on sexual dimorphism in schistosomatidae have shown that the male strongly influences the female reproductive system (Shaw, 1977) possibly via pheromones (Armstrong, 1965) or, more generally, via lipophilic substances (Shaw, Marshall & Erasmus, 1977). These studies and ours strongly suggest an important physiological role for ecdysteroids in the sexual processes of the parasite. The dosages presently undertaken and extended to the study of the juvenile hormones could bring precious information on the mechanisms of these phenomena.

Finally, the major ecdysteroid detected by radioimmunoassay (De Reggi *et al.* 1975) probably corresponds to ecdysone, and further confirmation should be achieved by its high pressure liquid chromatography, which is presently in progress.

The authors would like to express their gratitude to Dr M. Fougereau and Dr. F. M. Kourilsky for helpful facilities in this work. The skilful assistance of Miss J. Fontaine and Mr A. Jacob is also acknowledged. This work was supported by the CNRS (ERA 422), the INSERM (U 167), and the W.H.O. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.

REFERENCES

Armstrong, J. C. (1965). Mating behavior and development of schistosomes in the mouse. *Journal of Parasitology* **51**, 605–16.

Branton, D., Bullivant, S., Gilula, N. B., Karnovsky, M. J., Moor, H., Mühlethaler, K., Northcote, D. H., Packer, L., Satir, B., Satir, P., Speth, V., Staehlin, L. A., Steere, R. L. & Weinstein, R. S. (1975). Freeze-etching nomenclature. *Science* **190**, 54–6.

Cioli, D., Blum, K. & Ruppel, A. (1978). *Schistosoma mansoni*: Relationship between parasite age and time of spontaneous elimination from the rat. *Experimental Parasitology* **45**, 74–80.

Cioli, D. & Dennert, G. (1976). The course of *Schistosoma mansoni* infection in thymectomized rats. *Journal of Immunology* **117**, 59–65.

Cioli, D., Knopf, P. M. & Senft, A. (1977). A study of *Schistosoma mansoni* transferred into permissive and non permissive hosts. *International Journal for Parasitology* **7**, 293–7.

Cioli, D., Malorni, W., De Martino, C. & Dennert, G. (1980). A study of *Schistosoma mansoni* reinfection in thymectomized rats. *Cellular Immunology* **53**, 246–56.

Clegg, J. A. (1965). *In vitro* cultivation of *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology* **16**, 133–47.

Dennis, R. D. W. (1976). Insect morphogenetic hormones and developmental mechanisms in the nematode, *Nematospiroides dubius*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **53A**, 53–6.

Dennis, R. D. W. (1977*a*). Partial characterization of and the effect of insect growth hormones on the ribosomes and polyribosomes of the nematode *Panagrellus redivivus*. *International Journal for Parasitology* **7**, 171–9.

Dennis, R. D. W. (1977*b*). On ecdysone-binding proteins and ecdysone-like material in nematodes. *International Journal for Parasitology* **7**, 181–8.

De Reggi, M. L., Hirn, M. H. & Delaage, M. A. (1975). Radioimmunoassay of ecdysone an application to Drosophila larvae and pupae. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **66**, 1307–15.

Hockley, D. J. & McLaren, D. J. (1971). The outer membrane of *Schistosoma mansoni*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **65**, 432.

Hockley, D. J. & McLaren, D. J. (1973). *Schistosoma mansoni*: changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. *International Journal for Parasitology* **3**, 13–25.

Hockley, D. J., McLaren, D. J., Ward, B. J. & Nermut, M. V. (1975). A freeze fracture study of the tegumental membrane of *Schistosoma mansoni* (Platyhelminths: Trematoda). *Tissue and Cell* **7**, 485–96.

Horn, D. H. S., Wilkie, J. S. & Thomson, J. A. (1974). Isolation of β-ecdysone (20-hydroxyecdysone) from the parasitic nematode *Ascaris lumbricoides*. *Experientia* **30**, 1109–10.

KOWALSKI, J. C. & THORSON, R. E. (1976). Effects of certain lipid compounds on growth and asexual multiplication of *Mesocestoides corti* (Cestoda) Tetrahyridia. *International Journal for Parasitology* **7**, 327–31.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265–75.

LAWSON, J. R. & WILSON, R. A. (1980). Metabolic changes associated with the migration of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni* in the mammal host. *Parasitology* **81**, 325–36.

MCLAREN, D. J., HOCKLEY, D. J., GOLDRING, O. L. & HAMMOND, B. J. (1978). A freeze fracture study of the developing tegumental outer membrane of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **76**, 327–48.

MEYER, F., MEYER, H. & BUEDING, E. (1970). Lipid metabolism in the parasitic and free-living flatworms, *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotophala*. *Biochimica et biophysica acta* **210**, 257–66.

PHILLIPS, S. M., REID, W. A., BRUCE, J. I., HEDLUND, K., COLVIN, R. C., CAMPBELL, R., DIGGS, C. L. & SADUN, E. H. (1975). The cellular and humoral response to *Schistosoma mansoni* infections in inbred rats. I. Mechanisms during initial exposure. *Cellular Immunology* **19**, 99–116.

PITCHFORD, R. J. (1977). A check list of definitive hosts exhibiting evidence of the genus schistosoma weinland, 1858 acquired naturally in Africa and the Middle East. *Journal of Helminthology* **51**, 229–52.

RAMALHO-PINTO, F. J., GAZZINELLI, G., HOWELLS, R. E., MOTA-SANTOS, T. A., FIGUEIREDO, E. A. & PELLEGRINO, J. (1974). *Schistosoma mansoni*: Defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule *in vitro*. *Experimental Parasitology* **36**, 360–72.

SHAW, J. R. (1977). *Schistosoma mansoni*: pairing *in vitro* and development of females from single sex infections. *Experimental Parasitology* **41**, 54–65.

SHAW, J. R., MARSHALL, I. & ERASMUS, D. A. (1977). *Schistosoma mansoni*: *In vitro* stimulation of vitelline cell development by extracts of male worms. *Experimental Parasitology* **42**, 14–20.

SMITHERS, S. R. & GAMMAGE, K. (1980). Recovery of *Schistosoma mansoni* from the skin, lungs and hepatic portal system of naive mice and mice previously exposed to *Schistosoma mansoni*: evidence for two phases of parasite attrition in immune mice. *Parasitology* **80**, 289–300.

SMITHERS, S. R. & TERRY, R. J. (1969). The immunology of schistosomiasis. In *Advances in Parasitology*, vol. 7 (ed. B. Dawes), pp. 41–93. London: Academic Press.

STIREWALT, M. A. (1974). *Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomula. In *Advances in Parasitology*, vol. 12 (ed. B. Dawes), pp. 115–182. London: Academic Press.

TORPIER, G., CAPRON, M. & CAPRON, A. (1977). Structural changes of the tegumental membrane complex in relation to developmental stages of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Ultrastructural Research* **61**, 309–24.

TORPIER, G. & CAPRON, A. (1980). Intramembrane particle movements associated with binding of lectins on *Schistosoma mansoni* surface. *Journal of Ultrastructural Research* **72**, 325–35.

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.

EXPLANATION OF PLATES

Plate 1

Characteristic aspects of the tegumental complex of *Schistosoma mansoni* post-cercarial stages as observed after freeze fracture.
A, C. 1-h artificial schistosomula.
B, D. 6-day lung schistosomula.

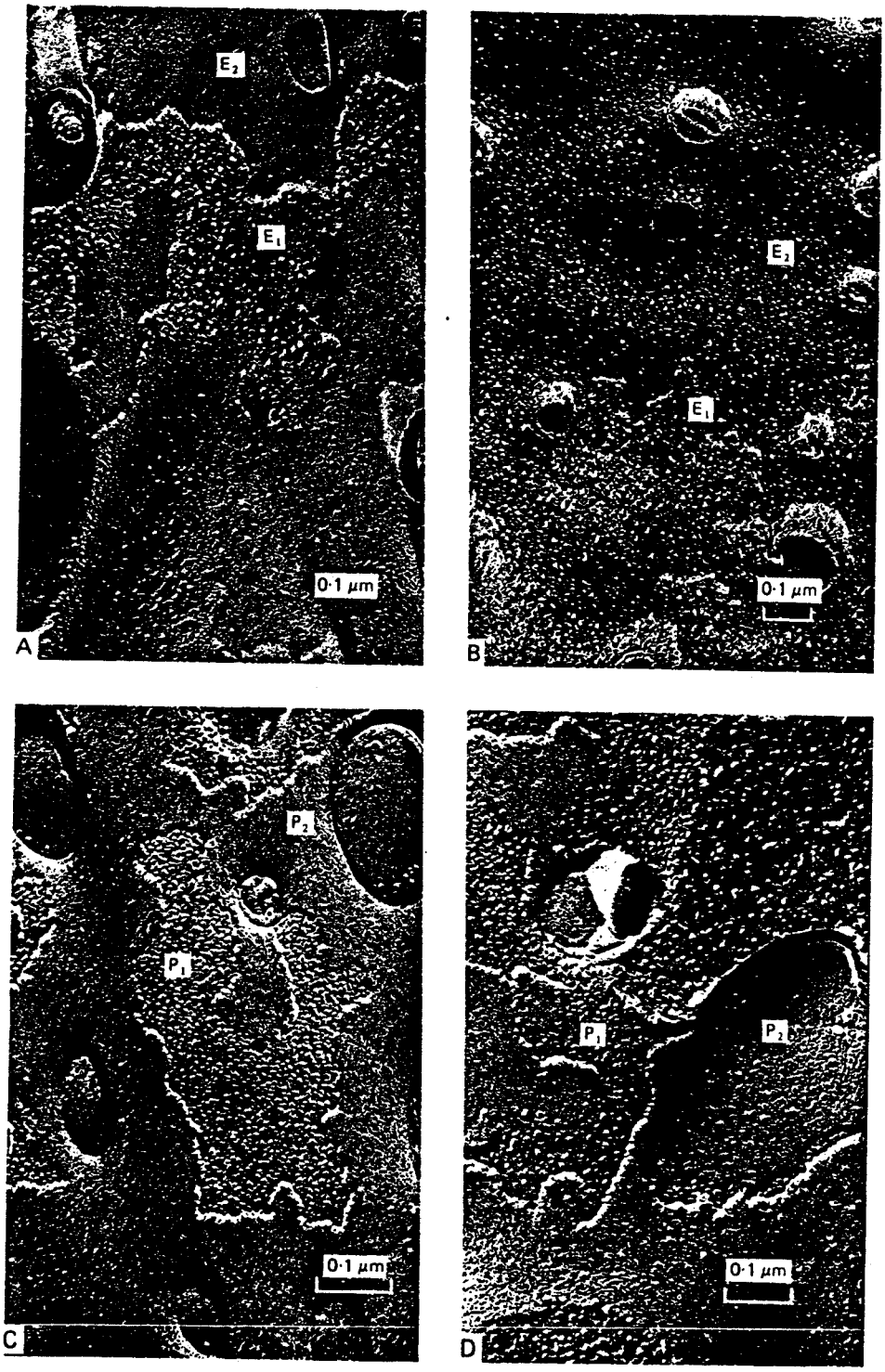
Plate 2

A, B. Characteristic aspects of the tegumental membrane complex of *Schistosoma mansoni* post-cercarial stages as observed after freeze-fracture.
A. 15-day liver worms.
B. Adult worms.
C, D. Illustration of the membrane exuviation observed during the 10–20 day period of infection of the definitive host.
C. Freeze fracture replica showing the fusion (arrowhead) with the membrane complex of membranes preformed in multilamellate vesicules.
D. Same sample as in Pl. 2C processed for ultrathin sectioning and showing the fusion of multilamellate vesicules (arrowhead) and the membrane exuviation (arrow).

Printed in Great Britain

Parasitology, Vol. 84, Part 1

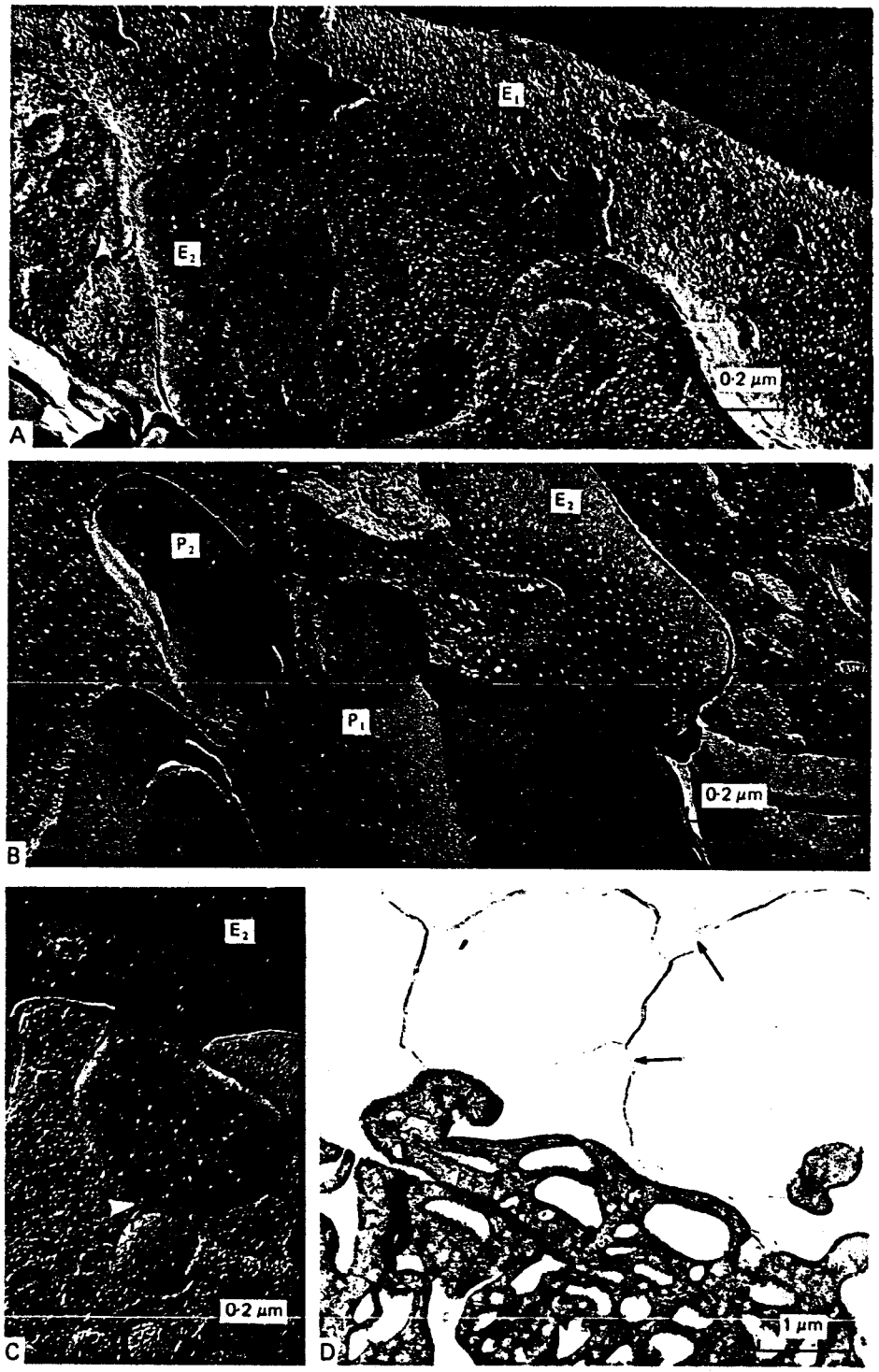
Plate 1



G. TORPIER AND OTHERS

(*Facing p.* 130)

Parasitology, Vol. 84, *Part* 1 Plate 2



G. TORPIER AND OTHERS

La technique de "freeze fracture" permettait de mettre en évidence, visuellement, un phénomène de desquamation membranaire durant les stades 10-20 jours de développement du parasite. L'hypothèse d'un mécanisme physiologique concernant le tégument externe du parasite est confirmé. Cette observation morphologique et la présence d'ecystéroïdes soulevaient une autre question: S'agissait-il d'un vrai phénomène de mue comme chez les arthropodes, où ces métamorphoses sont induites par une famille hormonale spécifiques: Les hormones ecdystéroïdes?

Nous savions qu'en raison de mues évidentes observées chez les nématodes (ROGERS, 1962) la détection d'ecdystéroïdes avait été faite chez ce type parasitaire (ROGERS 1973, HORN et al. 1974). Les remaniements membranaires observés chez les schistosomes faisaient également penser à une mue de ces parasites. C'est par analogie avec la physiologie des autres invertébrés (Insectes, parasites nématodes) où ces processus morphologiques sont étroitement liés à la famille hormonale des ecdystéroïdes, que l'idée d'un rôle possible des hormones ecdystéroïdes dans la physiologie des schistosomes est née.

CHAPITRE IV

LES ECDYSTEROIDES PARASITAIRES

La seule détection d'hormones de type ecdystéroïde dans les schistosomes ne suffit pas pour affirmer que ces hormones ont un rôle physiologique au niveau du parasite.

Les études de ces hormones ecdystéroïdes dans le phylum des invertébrés indiquent qu'un rôle physiologique est associé à:

1/ La présence d'au moins deux hormones ecdystéroïdes: l'ecdysone et la 20-hydroxy-ecdysone,

2/ La présence d'un pic hormonal avant chacune des modifications morphologiques de l'invertébré.

Notre objectif était donc de vérifier l'apparition de ces deux événements au niveau parasitaire: D'une part, montrer l'existence de l'ecdysone et de la 20-hydroxy-ecdysone dans le parasite, et d'autre part, mettre en évidence un pic hormonal dans la période 10-20 jours post infection, date à laquelle une différenciation du complexe membranaire avait été observée.

L'étude quantitative et qualitative des ecdystéroïdes parasitaires a été menée en utilisant la combinaison des techniques de chromatographie liquide haute pression (HPLC), permettant de collecter des fractions biologiquement actives, et le dosage radioimmunologique des ecdystéroïdes, développé par Max DE REGGI, Michel HIRN et Michel DELLAGE de Marseille Luminy. Leur collaboration allait permettre à terme de transférer le dosage des hormones ecdystéroïdes à l'institut PASTEUR de Lille et de me permettre d'acquérir une formation supplémentaire en informatique (voir chapitre II).

Six mois de travaux préliminaires furent nécessaires pour stocker 2 millions d'oeufs, 300 mille schistosomules et 40 mille parasites adultes triés par sexe.

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante.

Volume 151, number 2 FEBS LETTERS January 1983

Ecdysone and 20 hydroxyecdysone: new hormones for the human parasite *Schistosoma mansoni*

Ph. Nirde*, G. Torpier*, M.L. De Reggi+ and A. Capron*

*Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, INSERM (U. 167), CNRS (ERA 422), Institut Pasteur, 15 rue Camille Guérin, B.P. 245, 59019 Lille Cédex, France and
+Centre d'Immunologie INSERM-CNRS, Case 906, 13288 Marseille Cédex 9, France

Received 13 October 1982; revision received 6 December 1982

The insect moulting hormones, ecdysone and 20 hydroxyecdysone, were detected by the combined use of radioimmunoassay and high performance liquid chromatography in the human parasite *Schistosoma mansoni*. On day 11 after infection only the ecdysone form is present, but, on day 40 after infection the ratio between ecdysone and 20 hydroxyecdysone changes with anatomic localization of the adult worms in mammalian host. In the eggs, the ratio of these two hormones is identical to the ratio found in sexually mature worms located in mesenteric veins. These data demonstrate for the first time that *S.mansoni* synthesizes the steroid hormones ecdysone and 20OH ecdysone which are potent molecules in stimulating growth and vitello-genesis of this gonochoric trematode.

Schistosoma mansoni *Fasciola hepatica* *Ecdysone/analysis* *Ecdysterone/analysis* *Radio immunoassay – chromatography, high pressure liquid*

1. INTRODUCTION

More than 350 million people are exposed to *Schistosoma* infection throughout the world. No preventive methods are at present developed and vaccination or immunological therapy are still long term goals. A better knowledge of the physiology of the worm would provide an alternative approach to the control of the proliferation of this disease. Little is known about the neurological or endocrinological control of the development of the parasite. At present only neuromediators have been studied, such as biogenic amines or synaptic molecules [1]. We have shown that ecdysteroid material appeared in *S.mansoni* on day 6 after infection [2]. Here, we demonstrate that these ecdysteroids are the insect moulting hormones ecdysone (E) and 20 hydroxyecdysone (20OH.E). The quantities of these two hormones undergo variations which are related to specific developmental stages in the juvenile forms as well as in adult parasites. A dramatic increase occurs during the first larval stage (day 11 after infection), a critical period in the development of the parasite which has left the lungs and just reached the liver. In addition, ecdysone and 20OH.ecdysone are present in adult males and females and also in the eggs. Combined use of high performance liquid chromatography [3] and radioimmunoassay [4] allowed the measurement of both hormones in the following critical developmental stages: (i) artificially transformed schistosomula; (ii) day old worms; (iii) 20 day old parasites; (iv) adult males and females collected on day 40 after infection and in the eggs.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Schistosomula*

The cercariae of *S.mansoni* is a caryote formed with a tail and a head. This infective form is shed into conditioned fresh water by the intermediate snail host *Biomphalaria glabrata*. After shearing off the tails of cooled cercariae by 1 min vortex mixing, the heads are named mechanically-

Published by Elsevier Biomedical Press
00145793/83/0000—0000/$3.00 © Federation of European Biochemical Societies

derived schistosomula or schistosomula [5]. Purification of schistosomula from tails was done using a 54% Percoll gradient (Pharmacia) in minimum essential medium (MEM, Gibco) at $350 \times g$ for 15 min. The pellet of pure schistosomula was washed 3-times in 0.9% NaCl.

2.2. *Infestation of animals*

Hamsters *Mesocricetus auratus)* were infected by exposure to cerariae as in [6].

2.3. *11-Day old worms*

These have left the lungs of infected hamsters and have just reached the liver for further maturation. Infected hamsters were killed 11 days after infection by cervical dislocation without pentobarbital or heparin treatment. The abdominal and thoracic cavities were opened and the liver removed. The worms were then recovered by perfusion of the liver with MEM. Worms were picked up under light microscopy and washed 3-times in 0.9% NaCl prior to storage at −70°C until further experiments.

2.4. *20-Day old worms*

These worms are heterogenous in size and a few already show the first signs of sexual differentiation. They were recovered as above and two batches were made: worms longer than 1.5 mm (L) and less than 1.5 mm (S), in order to collect more homogenous samples.

2.5. *40-Day old worms*

40-Day old parasites were well differentiated and mature. The normal location for these parasites for copulation and egg laying are the portal and mesenteric vessels. They were recovered by total perfusion of the whole blood system of hamsters with NaCl 0.9% or only from portal and mesenteric vessels of hamsters by local puncture and aspiration of the content of these veins. Males and females were separated in MEM with a paint brush, then washed 3-times in 0.9% NaCl prior to storage at −70°C until further experiments.

2.6. *Egg of 40-day* S.Mansoni

Eggs were recovered from the liver of infected hamsters. Livers were homogenized in 17% NaCl, then filtered through medical gauze (1 mm) prior to sieving (0.124 mm). The filtrate was homogenized in EDTA 3.36 mM, NaCl 140 mM, KCl 2.68 mM, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 8 mM, KH_2PO_4 0.47 mM, solution (pH 7.4) for 30 s and decanted after 2 h at 4°C. The pellets were centrifuged on a 54% Percoll gradient in MEM at $350 \times g$ for 20 min. The supernatant was discarded and the eggs washed 3-times in 17% NaCl.

2.7. *Ecdysteroid assay*

For all the experiments, about 300000 schistosomula, 2.10^6 eggs and 40000 adults were used. Batches of 20–50 mg were homogenized in methanol–water–hexane (5/2.5/1.5, by vol.), the upper phase was discarded and the hypophase was dried under nitrogen flow. The extract was then diluted in 0.1 M citrate buffer (pH 6.1) and this solution used in the RIA method. The blank was run with liver or blood of uninfected animals. The ^{125}I-labelled hormone was a succinyl ecdysterone coupled to [^{125}I]tyrosine-methyl-ester (Immunotech, Marseille). The binding assays were made in a plexiglass apparatus containing 10 dialysis compartments, each divided into two 200-μl chambers by a cellulose membrane [7]. One chamber was filled with 150 μl of antibody and the other with 150 μl of a mixture of equal parts of the unknown ecdysteroid solution and the ^{125}I-labelled hormone. After 24 h shaking at 4°C, equilibrium was achieved and 100 μl of each compartment was counted. The sum of the bound (B) and free (F) lavelled analogue was found on the antibody side and the free (F) alone on the other. The ratio of binding was computed as $r = B/T$ where $T = B + F$. The standard curve was made with pure 20OH.E (Sigma) over 5×10^{-11} M–10^{-8} M. The maximum binding in these conditions was 0.67 ($r_0 = 67\%$). Crude extract bound fractions were then calculated on a Wang 2200 S computer system, with a linear regression of the standard curve. The results were expressed as pmol ecdysone equiv./mg protein (Lowry determination [8]).

2.8. *High pressure liquid chromatography (HPLC)*

A modification of the method in [3] was used. HPLC was performed on a reverse phase column (Whatman, Partisil 10–25/ODS 3) using acetonitrile in a 0.1% solution of trifluoroacetic acid in water as solvent. A linear gradient (1 ml/min for 20 min) was used (Pump, Waters 6000 A). Absorbance was measured at 245 nm, fractions of 30 s

were collected, dried under nitrogen flow then dissolved in 0.1 M citrate buffer (pH 6.1) and analysed by the RIA procedure.

3. RESULTS

Fig.1A shows that newly derived schistosomula contain 4.3 pmol ecdysone equivalents/100 mg protein. On arrival in the liver of the host on day 11 after infection the concentration of the hormone was increased to 25 pmol ecdysone equiv./100 protein (fig.1B). At this stage of infection only the ecdysone form was detected using HPLC – RIA combination ($E/(E + 20OH.E) = 1$).

The lowest level of ecdysteroid was detected on day 20 after infection, representing the background levels in this parasite, though not of the method (fig.1C). Both males and females collected on day 40 after infection by total perfusion of hamsters exhibit an ecdysone level about 3,, pmol/100 mg protein (fig.1D). However, there were differences in the ratio of ecdysone to 20 hydroxyecdysone: $E/(E + 20OH.E) = 0.32$ for the females (fig.2A) and $E/(E + 20OH.E) = 0.38$ for the males. On the other hand, adults collected exclusively by local puncture of the portal vein and mesenteric vessels showed significant sexual differences in hormone level. Males contained <1 pmol/100 mg protein whilst females possessed 2.5 pmol/100 mg protein (fig.1E). As shown in fig.2B, parasites in the mesenteric and portal system exhibit an inverse ratio of ecdysone to 20 hydroxyecdysone as compared with those collected by total perfusion: $E/(E + 20OH.E) = 0.76$ for the females (fig.2B) and $E/(E + 20OH.E) = 0.60$ for the males. The hormonal content of eggs was comparable to that of females. The total activity measured by RIA was 2.6 pmol/100 mg protein (fig.1F) and the $E/(E + 20OH.E)$ ratio was 0.76. It should be emphasized that after HPLC separation the RIA activity was detected exclusively in fractions 50, 51, 52, 56 and 57 (arrows in fig.2). The first 3 peaks correspond to the standard migration of 20OH ecdysone and the two others to the standard migration of ecdysone. Controls performed on uninfected hamster tissues gave a concentration of 0.15 pmol/100 mg protein (fig.1G). In all cases, the RIA activity on collected HPLC fractions gave a greater amount of ecdysone and 20OH ecdysone than before HPLC.

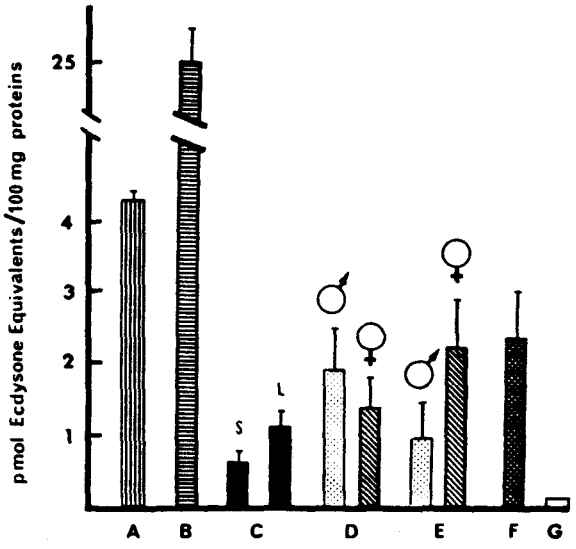


Fig.1. Variation in ecdysone levels during *Schistosoma mansoni* development in vivo using RIA procedure: (A) mechanical schistosomula ($N = 2$); (B) 11-day old worms ($N = 4$); (C) 20-day old worms ($N = 4$). (L) are worms >1.5 mm and (S) are worms <1.5; (D) adult parasites (40-day old) collected by total perfusion of infected hamsters ($N = 6$ for each sex); (E) adult parasites collected only from mesenteric vessels and portal system of animals ($N = 4$); (G) controls performed on uninfected animal tissue ($N > 10$); bars represent SD.

4. DISCUSSION

Combined use of HPLC and RIA has demonstrated for the first time the presence of ecdysone and 20OH ecdysone in a human trematode. In addition, the insect moulting hormones were also formed in *Fasciola hepatica*. The hormonal content of this digenic trematode was comparable to that for *S.masoni* adult females and eggs: 4.4 pmol/100 mg protein (unpublished).

Our work demonstrates that hormonal activity is present at two crucial periods of development in *S.mansoni*. During day 6–day 11 after infection the observed rise in ecdysone levels can be correlated to 3 linked events:

(1) Migration and development of the juvenile worms [9] which have left the lungs and just reached the liver. The process of transformation from the lung to the liver form is charac-

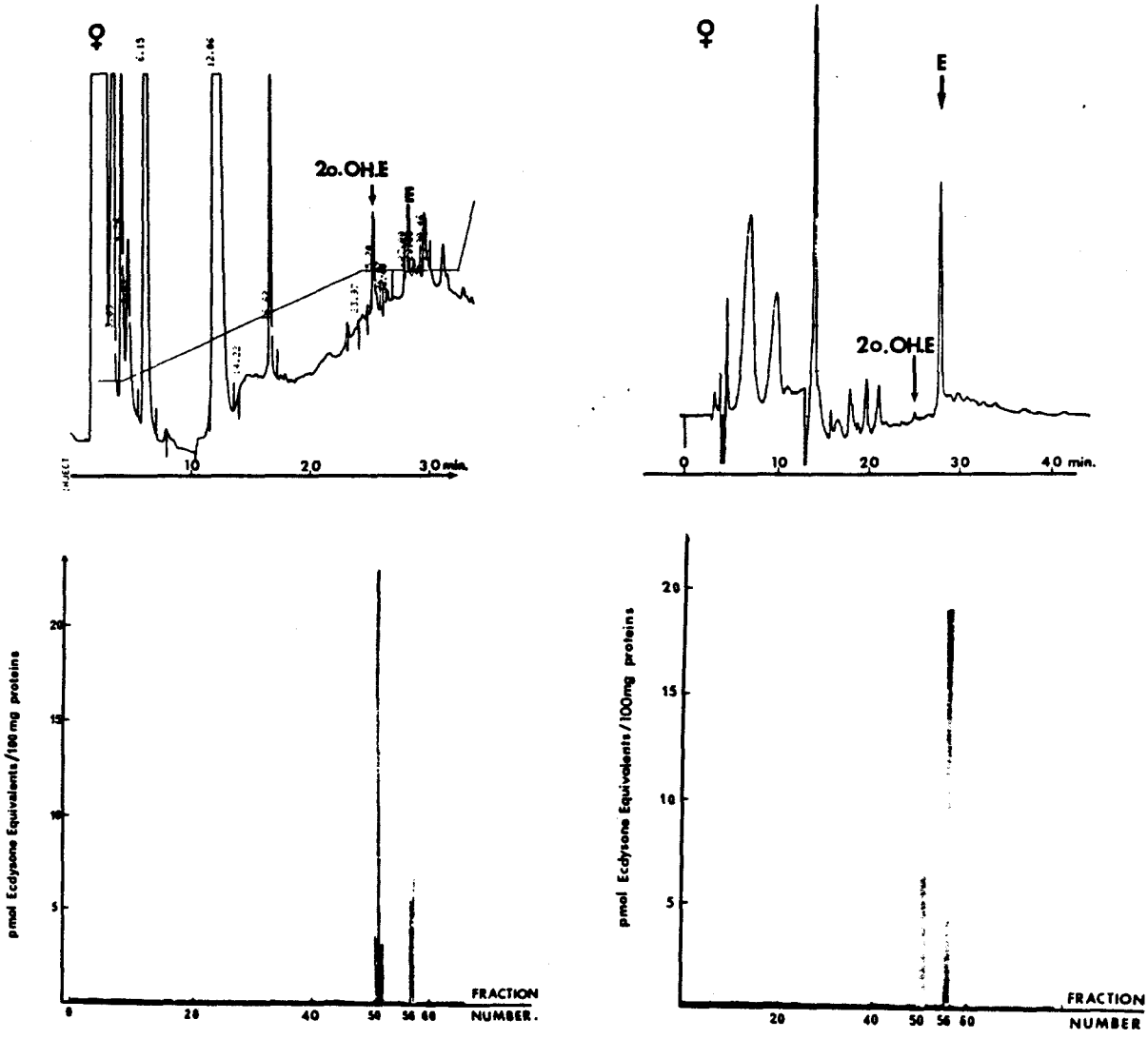


Fig.2. Chromatography of extracts of female schistosomes (top) and radioimmunoassay on collected fraction from high pressure liquid chromatography: (A) female schistosomes from total perfusion of hamsters (Waters data module M 730, system controller M 720); (B) female Schistosomes from mesenteric vessels (Programmator Waters M 650). E = ecdysone; 20 E = 20 hydroxyecdysone; Arrows = standard elution of ecdysone (or 20 hydroxyecdysone) from Sigma.

terized by a number of changes in biological functions such as the ability to migrate, length, shape and coiling.

(2) Metabolic changes [10] occur in the parasite which leaves a semi-quiescent metabolic state. An increase in several biological parameters also occurs during this period (density, nitrogen content, growth initiation).

(3) Membrane modifications of *S.mansoni* [2] have been demonstrated by freeze fracture studies. The observation of membrane exuviation on 10–20-day old schistosomes gave rise to the hypothesis of a possible hormonal control of this moulting process. By analogy with the insect model, it is possible that the increase in ecdysone levels at the juvenile period could

participate in the initiation of these phenomena. It is of interest to notice that only the ecdysone form is present at this period.

The results clearly demonstrate that ecdysone is produced by adult schistosomes. Parasites obtained by total perfusion contain ecdysone and 20OH ecdysone. In this case, where all the parasites were collected from infected hamsters, no sexual differences in hormonal levels can be observed by the RIA method. It is commonly accepted that the portal and mesenteric system are the normal location for the parasite for copulation and egg laying. Adult worms, collected only from these locations, exhibit significant sexual differences in hormone levels. These data indirectly suggest an important potential role for these steroids in the induction of the maturation of the female reproductive system. Moreover, the presence of the ecdysone form may be correlated with vitellogenesis [11]. It has been shown that acetone or ether extracts of male schistosomes strongly influence the vitalline cell activity of females [12].

In *Drosophila,* ecdysone stimulates the synthesis and secretion of yolk polypeptides [13] and it is possible that the same could be true for *S.mansoni.* The large amount of the ecdysones found in the eggs suggest an analogous role to that in insects; e.g., in the growth of the ovocyte [14]. In addition, L-dopa decarboxylase, an essential enzyme in the pathway of sclerotinisation, a crucial process for eggshell formation, is known to be under control of ecdysone in insect model [15]. The recent evidence for the presence of L-dopa decarboxylase in adult and larval schistosomes [16] provides the basis for a precise strategy aiming at the correlation of the activity of this essential enzyme with the parasite is production of steroid hormones. Thus, as in insect model, ecdysone and 20OH ecdysone may play a key role in parasite development. Hormonal action on the juvenile form and on adult parasites to brake parasite development or to prevent egg formation could also be considered. An attractive hypothesis would be that ecdysone does not simply accumulate in the eggs as a passive end component, but may be a source of ecdysteroids during embryogenesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr F.M. Kourilsky for providing facilities for this work. The skillful assistance of Miss Josette Fontaine is acknowledged. Appreciation is also extended to André Moulin for high pressure liquid chromatography facilities. The work was carried out with the aid of grant no. 282-0016 from the Edna McConnel Clark Foundation, New York. This work was also supported by INSERM (U167) and CNRS (ERA 422).

REFERENCES

[1] Bennett, J. and Bueding, E. (1971) Comp. Biochem. Physiol. 39A, 857–867.
[2] Torpier, G., Hirn, M.H., Nirde, Ph., De Reggi, M.L. and Capron, A. (1982) Parasitology 84, 123–130.
[3] Lafond, R., Somme-Martin, G., Mauchamp, B., Maume, B.F. and Delbecque, J.P. (1980) Prog. Ecdysone Res. 00, 45–68.
[4] De Reggi, M.L., Hirn, M.H. and Delaage, M.A. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 1307–1315.
[5] Ramalho-Pinto, F.F., Gazzinelli, G., Howells, R.E., Motta-Santos, T.A. Figueiredo, E.A. and Pellegrino, J. (1974) Exp. Parasitol. 36, 360–372.
[6] Smithers, S.R. and Terry, R.J. (1965) Parasitology 55, 695–700.
[7] Cailla, H.L., Gros, G.S., Jolu, E.P.T., Delaage, M.A. and Depieds, R.C. (1973) Anal. Biochem. 56, 383–393.
[8] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 165–275.
[9] Wilson, R.A., Draskau, T., Miller, P. and Lawson, J.R. (1978) Parasitology 77, 57–73.
[10] Lawson, J.R. and Wilson, R.A. (1980) Parasitology 81, 325–336.
[11] Hagedorn, H.H., O'Connor, J.D., Fuchs, M.S., Sage, B., Schaeger, D.A. and Bohm, H.K. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3255–3259.
[12] Shaw, J.R., Marshall, I. and Erasmus, D.A. (1977) Exp. Parasitol. 42, 14–20.
[13] Jowett, T. and Postlethwait, J.H. (1981) Nature 292, 633–635.
[14] Legay, J.M., Calvez, B., Hirn, M.H. and De Reggi, M.L. (1976) Nature 262, 489–490.
[15] Kraminsky, G.P., Clark, W.C., Estelle, M.A., Geitz, R.D., Sage, B.A., O'Connor, J. and Hodgetts, R.B. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77(7), 4175–4179.
[16] Catto, B.A. (1981) Exp. Parasitol. 51, 152–157.

Ce travail démontre que les schistosomes contiennent les deux hormones ecdysone et 20-hydroxy-ecdysone et qu'il existe des variations qualitatives et quantitatives de ces hormones pendant la vie parasitaire. Deux grands moments biologiques émergent de cette analyse:

1/ A J11 post infection, période de transition entre la forme juvénile et les vers adultes, où seule la 20-hydroxy-ecdysone est détectable par HPLC (L'hypothèse d'un clivage possible de conjugués ecdystéroïdes par l'utilisation conjointe d'une extraction organique bi-phasique Hexane-Méthanol et d'une CCM sur gel de silice (détaillée au chapitre VI, II.2.3.1.2) pourrait expliquer la détection de la seule 20-OH-E.),

2/ A J40, période de maturation du système reproducteur femelle, caractérisée par la ponte des oeufs. De plus, les quantités hormonales varient avec le sexe du parasite et sa localisation anatomique chez son hôte. En particulier la balance des formes ecdysone et 20-hydroxy-ecdysone est inversée lorsqu'un parasite passe d'un site quelconque de l'organisme vers son lieu physiologique de ponte: le mésentère, riche en sérotonine. Ainsi, les schistosomes provenant des veines mésentériques et portales contiennent majoritairement la 20-OH-E.

Cependant, ces premiers résultats encourageants mais obtenus sur un modèle parasitaire particulier puisque les schistosomes sont les seuls trématodes sexués, nous incitèrent à vérifier la validité de ces résultats sur un autre trématode plus "classique": Fasciola hepatica. L'étude de cet autre parasite permettait d'affirmer que la présence d'hormones ecdystéroïdes n'était pas spécifique aux seuls schistosomes. En effet, nous avons également démontré la présence de ces hormones chez le plathelminthe hermaphrodite *Fasciola hepatica*. Chez ce parasite l'analyse HPLC-RIA montre une proportion équivalente d'ecdysone et de 20-OH-ecdysone. De plus, un pic immunoréactif élué à 23 mn, non identifié, pourrait être spécifique de ce trématode.

A ce stade de notre étude deux lacunes paraissaient importantes à combler: D'une part, démontrer la synthèse directe de ces hormones par les

parasites, et d'autre part, connaître le rôle physiologique de ces ecdystéroïdes parasitaires.

En ce qui concerne la synthèse, il ne nous a pas été possible d'obtenir de l'ecdysone ^{3}H en incubant *in vitro* les parasites avec du cholestérol commercial marqué. De même, la conversion d'ecdysone en 20-OH-ecdysone par des extraits parasitaires n'a pas aboutie. La démonstration directe d'une synthèse d'ecdystéroïdes par des parasites n'est à ce jour pas encore faite. Le choix du précurseur cholestérol ou des lipo-protéines reste un élément capital de la réussite de ce type d'expérience. Rappelons nous les échecs des années 70 dans la recherche de preuves directes de la synthèse des ecdystéroïdes par les glandes prothoraciques (Chapitre I, p.32). Cependant, les arguments indirectes plaident en faveur de cette d'une synthèse possible d'hormones ecdystéroïdes par les trématodes.

Quant au rôle des ecdystéroïdes au niveau des parasites, l'orientation a été gouvernée par le contexte biologique des parasites chez son hôte vertébré. Nous avons déjà vu à ce propos, que les parasites sont l'objet d'une attaque par des cellules mononuclées du système immunitaire. Ces cellules libèrent des anions superoxydes au contact de leurs cibles pour les tuer. Sachant que ces mécanismes ne sont pas totalement efficaces *in vivo*, l'existence d'un mécanisme parasitaire qui inhiberait l'action de ces anions superoxides fut posé. Nous avons déjà vu que chez les insectes, les ecdystéroïdes induisent des synthèses protéiques et que l'une d'entre-elles apparait particulièrement relevante dans la schistosomiase: la S.O.D. (E.C.1-15-1-1). Cette enzyme catalyse la conversion de l'anion oxygène en hydrogène peroxide (**McCORD** et al.1969). L'une des partie de la revue suivante est consacrée à la démonstration de la présence des enzymes SOD dans les schistosomes aux stades clés de son évolution biologique.

L'autre façon d'aborder le rôle d'une molécule dans la biologie d'un organisme est d'utiliser des analogues non métabolisables puis d'observer les perturbations engendrées. Dans le cas des ecdystéroïdes, les analogues non métabolisables n'étaient pas disponibles ce qui m'a orienté vers l'utilisation des anticorps anti-ecdystéroïdes. Dans le but de vérifier quelles fonctions biologiques du parasite étaient altérées par l'absence des ecdystéroïdes, la dernière partie de l'article suivant est consacrée aux effets d'anticorps anti-ecdysone sur des cultures de schistosomes. Ce sont

les résultats inattendus des tests *in vitro* qui nous ont conduit également à confirmer *in vivo* nos expériences. Ainsi, l'effet d'immunisations de rongeurs par un immunogène ecdystéroïde avant l'infestation des animaux par *S.mansoni* est également analysé. Pour cette étude plus de 90 hamsters ont été utilisés, immunisés soient par des immunogènes ecdystéroïdes, soit par des antigènes non protecteur de schistosomes (Sm-BG4), soit avec de la BSA seule, soit avec de la BSA et l'adjuvant complet de FREUND.

Journal of Chemical Ecology, Vol. 12, No. 8, 1986

FUNDAMENTAL ASPECTS AND POTENTIAL ROLES OF ECDYSTEROIDS IN SCHISTOSOMES
An Update Overview

PHILIPPE NIRDÉ,[1] MAX L. DE REGGI,[2] and ANDRÉ CAPRON[1]

[1]*Centre d'immunologie & biologie parasitaire*
Unité mixte INSERM U167, CNRS 624, Institut Pasteur
BP 245, 59019 Lille Cédex, France

[2]*IMMUNOTECH Luminy, Case 915*
13288 Marseille Cédex 09, France

(Received October 1, 1985; accepted March 31, 1986)

Abstract—The human digenic trematode *Schistosoma mansoni* produces ecdysteroid hormones. Both ecdysone (22*R*)-2β,3β,14,22,25-pentahydroxycholest-7-en-6-one and 20-hydroxyecdysone (22*R*)-2β,3β,14,20,22,25-hexahydroxycholest-7-en-6-one were detected during the critical development stages of this bisexual parasite: during the exponential growth phase to adult stage (day 11 postinfection) and during the sexual maturation of adult and egg laying (day 40 postinfection). The parasites released their ecdysteroid hormones in the biological fluids of the infected vertebrates as soon as six days postinfection. In addition, the time course of the ecdysteroid titer was correlated with the susceptibility or the innate resistance of the host to schistosome infection. Moreover, we demonstrated that after a schistomicide therapy, ecdysteroids from urine of infected children decreased markedly four days after drug administration. We also have demonstrated that immunization of rodents with an ecdysone-BSA complex led to the reduction of the worm burden. By in vitro studies, we have shown that the ecdysterone antibodies were able to kill the juvenile worms within 24 hr. In addition, we have demonstrated that the enzymes superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) were present in schistosomes and that the total superoxide dismutase activities in both males and females could be correlated with the 20-hydroxyecdysone within parasites.

Key Words—Schistosoma mansoni, ecdysteroid, antiecdysteroid, serum/kinetic, urine/diagnosis, superoxide dismutase (EC 1.15.1.1), mass spectrum, chromatography.

0098-0331/86/0800-1863$05.00/0 © 1986 Plenum Publishing Corporation

INTRODUCTION

The ecdysteroids were first demonstrated in arthropods (Butenand and Karlson, 1954) where they were associated with their moulting process (for review, see Karlson, 1980). Because the growth of nematodes has involved a series of evident moults (Rogers, 1962), the detection of ecdysteroids in worms was done first in this parasitic species (Rogers, 1973; Horn et al., 1974). Our freeze fracture studies of *Schistosoma mansoni* membrane differentiation allowed the observation of a membrane exuviation during the period of 10–20 days after infection (Figure 1.) (Torpier et al., 1982). Such a phenomenon occurring at a precise period of the worm development is reminiscent of the moulting process of arthropods in which metamorphoses are induced by two specific hormones: namely ecdysone and 20-hydroxyecdysone. Since we demonstrated that the produced ecdysteroids (Nirdé, 1982; Torpier et al., 1982, Nirdé et al., 1983a) were released in the biological fluids of the infected hosts (Nirdé 1982, Nirdé et al., 1983b, 1984), particular interest has been devoted to this topic in platyhelminthic worms. (Whitehead, 1983; Koolmann et al., 1984, 1985; Rees and Meldis, 1984; Rees et al., 1985). The present paper is an update review on the ecdysteroids in the human trematode *Schistosoma mansoni* and on the potential roles of these hormones in schistosomiasis.

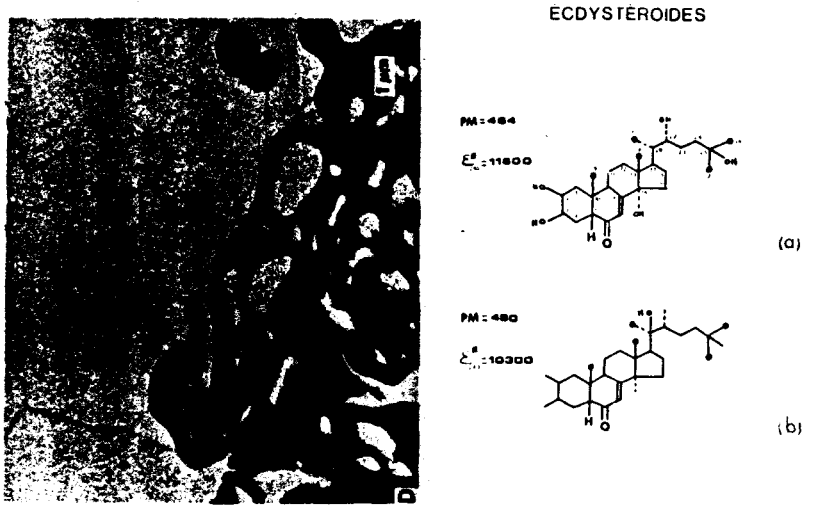


FIG. 1. Illustration of the membrane exuviation (arrow) observed during the 10- to 20-day period after infection (left) and structure of ecdysone (a) and 20-hydroxyecdysone (b). (Modified from Torpier, et al., 1982.)

METHODS AND MATERIALS

Infection of rodents was performed by exposure to cercariae of *Schistosoma mansoni* as initially described by Smithers and Terry (1965). Recovery of parasites of required age was performed by perfusion of the rodents killed by cervical dislocation. Eleven-day-old and 20-day-old worms were collected by perfusion of the liver with MEM. Forty-day-old schistosomes were recovered by total perfusion of the whole blood system with NaCl 0.9% or only from the mesenteric and portal system of hamsters. Eggs were recovered by a 54% Percoll gradient in MEM as described by Nirdé et al. (1983a).

Ecdysteroid extracts of worms were performed by a methanol–water–hexane (10:5:3 by v/v) homogenization as described by De Reggi et al. (1975). For the biological samples such as urine and sera, a methanol–water (3:1 v/v) extraction according to Nirdé et al. (1984) was performed. To 1 ml serum was added 3 ml methanol (Merck). The mixture was then vortexed prior to a 60°C incubation for 15 min and centrifuged (800*g* for 10 min at 4°C). The supernatant was then dried under nitrogen flow and resuspended in 0.1 M citrate buffer, pH 6.1, prior to the RIA assay (De Reggi et al., 1975).

The ^{125}I-labeled hormone was a succinyl ecdysterone coupled to [^{125}I]tyrosine-methyl-ester (Immunotech, Marseille). The binding assays were made in a Plexiglas apparatus containing 10 dialysis compartments, each divided into two 200-μl chambers by a cellulose membrane. One chamber was filled with 150 μl of ecdysteroid antibody (Immunotech) and the other one with 150 μl of a mixture of equal parts of the sample to be analyzed and the ^{125}I-labeled hormone. After 24 hr shaking at 4°C, equilibrium was achieved and 100 μl of each compartment was counted. The sum of the bound (B) and free (F) labeled analog was found on the antibody side, the free (F) alone on the other. The ratio of the binding was computed as $r = B/T$, where $T = B + F$. The standard curve was run with pure 20-OH-ecdysone (Sigma) from 10^{-7} M to 10^{-11} M. Bound fractions were then computed with a WANG 2200 S system, with a linear regression of the standard curve (Nirdé, 1982). The results were expressed as picomoles of 20-OH-ecdysone equivalent per 100 mg of protein or per milliliter of biological fluids (urine or sera).

Mass spectroscopy analysis was done with 600 ml urine of children infected with *Schistosoma haematobium*. A butanol extraction was performed on this material as previously described (Nirdé et al., 1984). The butanol extract was then analyzed by thin-layer chromatography (silicagel plates, 20 × 20 cm, F 254, Merck) with chloroform–methanol as solvent (80:20, v/v). The plates were scraped by 1-cm bands and the products eluted with three washes with 95% ethanol. Only the immunoreactive samples were analyzed by HPLC (Waters, reverse phase) with methanol–water as solvent (40:60 v/v, 1 ml min,

isocratic elution). Gas chromatography was performed on immunoreactive HPLC fractions after derivatization. Fractions to be analyzed were added to 100 μl of trimethylsilylimidazole (TSIM) and heated at 80°C under argon. Separation of derivatized ecdysteroids from reagent was performed through HPLC on silica column with ethanol-hexane as solvent. After evaporation of the solvent under argon, acetone was added to dried extract and 1-2 μl was injected into a gas chromatographic apparatus (Varian 1200, capillary glass column SE/30) at 290°C. A mass spectrometer (LKB 9000S) was coupled to the gas chromatograph. This spectrometer was equipped with an INCOSS computer system which allows the recording of one mass spectrum per second.

The complex ecdysone-BSA was used as immunogenic compound. Hamsters were inoculated by subcutaneous injections by the Vaitukaïtis technique (1971). Each hamster received a primary injection of 200 μg of protein with 1 vol of Freund's complete adjuvent (Bio-mérieux) in a total volume of 500 μl. Boosts of 100 μg were given on day 30 and day 60 after the primary injection. Hamsters were infected 10 days after the last injection with 100 cercariae of *S. mansoni*. Antibody titer was determined by the RIA method.

The in vitro cytotoxicity of sera from hamsters immunized with an ecdysone-BSA complex was performed on skin schistosomula. The skin schistosomula were collected in vitro after penetration of cercariae through isolated pieces of Swiss mice abdominal skin according to the method initially described by Stirewalt and Uy (1969). For the in vitro cytotoxicity assay about 120 schistosomula were incubated in each well of a flat-bottomed microtiter plate (Nunclon, Denmark) with 110 μl of 10% FCS in MEM, 50 μl of heated sample serum to be tested, and 40 μl of fresh guinea pig serum. For studies without complement, the guinea pig serum was heated for 30 min at 56°C. The percentage of mortality was measured by direct visual examination and by scanning microscopy.

For scanning microscopy studies, schistosomula were fixed in 0.1% glutaraldehyde in 0.05 M sodium cacodylate buffer. The samples were then postfixed with 1% osmium tetroxide solution for 1 hr at 4°C and dehydrated in a ethanol series. A gold-palladium coating (60:40) was then performed before examination.

Superoxide dismutase was assayed by the inhibition of the cytochrome *c* reduction using a xanthine-xanthine oxidase system as originally described by McCord and Fridovich (1969). Batches of 4-10 adult worms or 20,000 schistosomula, or 20,000 day-11 parasites were used. Parasite material was suspended in 2 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 7.8), sonicated on ice for 45 sec at 20 kHz (Sonotrode TC 4C, type 20-200 S), and centrifuged for 10 min at 800 *g* (Jouan E96 4°C). Triton X-100 was added to the supernatant to a final concentration of 0.2% (v/v) prior to 30 min incubation at 4°C. Centrifugation was then performed (45,000 *g* for 10 min at 4°C) and the supernatant used in

the SOD assay at pH 10 with or without 1 mM KCN. The final reaction mixture was 2.85 ml and the standard curve was set using bovine erythrocyte SOD (Sigma). Crude extract activities were then computed on a WANG 2200 MVP system by using a polynomial fitting of the standard curve as described by Nirdé (1986). Results were expressed as Sigma SOD units equivalent per milligram of protein.

RESULTS

Figure 2 shows the variation in ecdysone levels during *Schistosoma mansoni* development. Line A indicates that newly derived schistosomula contain 4.3 pmol ecdysone equivalents per 100 mg of protein. Line B corresponds to the day-11 schisotomes. The amount of ecdysteroids at this stage is 25 pmol. Line D represents both males and females collected on day 40 after infection

BU LILLE

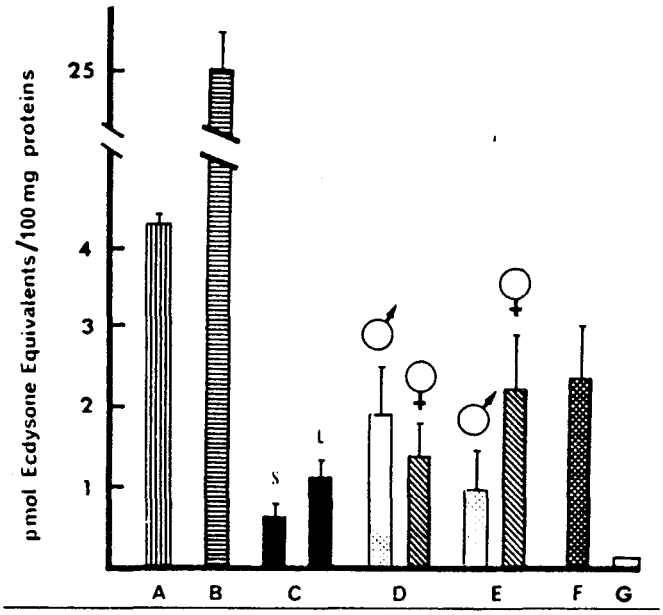


FIG. 2. Ecdysteroid levels during *Schistosoma mansoni* development using the RIA method. (A) Newly derived 3-hr schistosomula (N = 2); (B) 11-day-old schistosomes (N = 4); (C) 20-day-old schistosomes (N = 4); (D) 40-day-old schistosomes (adults) from the total perfusion of hamsters (N = 6); (E) 40-day-old schistosomes from mesenteric vessels (N = 4); (F) Eggs of *Schistosoma mansoni* (N = 6); (G) control performed on uninfected animal tissues (N = 10). Bars are standard deviation. (From Nirdé et al, 1983b.)

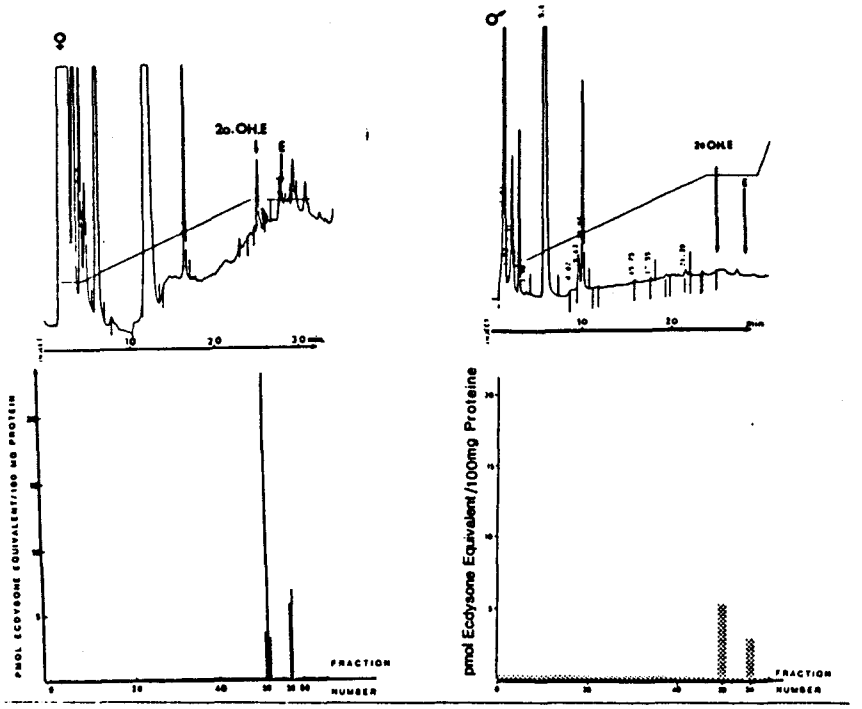


FIG. 3. High-pressure liquid chromatography of the extract of parasite from total perfusion and RIA on collected fractions (♀, females; ♂, males). Column: Whatmann, Partisil 10-25/ODS 3; detection: Waters UV-visible detector M 440, 245 nm; programmer: Waters M 650; flow: 1 ml/min; gradient: 30-min linear gradient of 30% acetonitrile in water was performed; arrows: standard elution of 20-hydroxyecdysone or ecdysone from Sigma run in the same conditions. (Modified from Nirdé et al., 1984a.)

by total perfusion of hamsters exhibiting an ecdysone level at about 2 pmol. No significant sexual differences can be observed by the radioimmunoassay method. In Figure 3, HPLC analyses demonstrate that both ecdysone and 20-hydroxyecdysone are present. The 20-OH-ecdysone is more abundant than ecdysone in both sexes. The ratio, r, of 20-hydroxyecdysone ecdysteroids is $r = 0.62$ for the males and $r = 0.68$ for the females. In contrast, within adults collected exclusively by local puncture of mesenteric vessels (line E), the normal location of these worms for mating and egg laying, sexual differences in ecdysteroid levels were observed: less than 1 pmol for the males and 2.5 pmol for the females.

In addition, HPLC analyses shown in Figure 4 demonstrate that parasites from mesenteric vessels exhibit an inverse ratio of 20-hydroxyecdysone to total

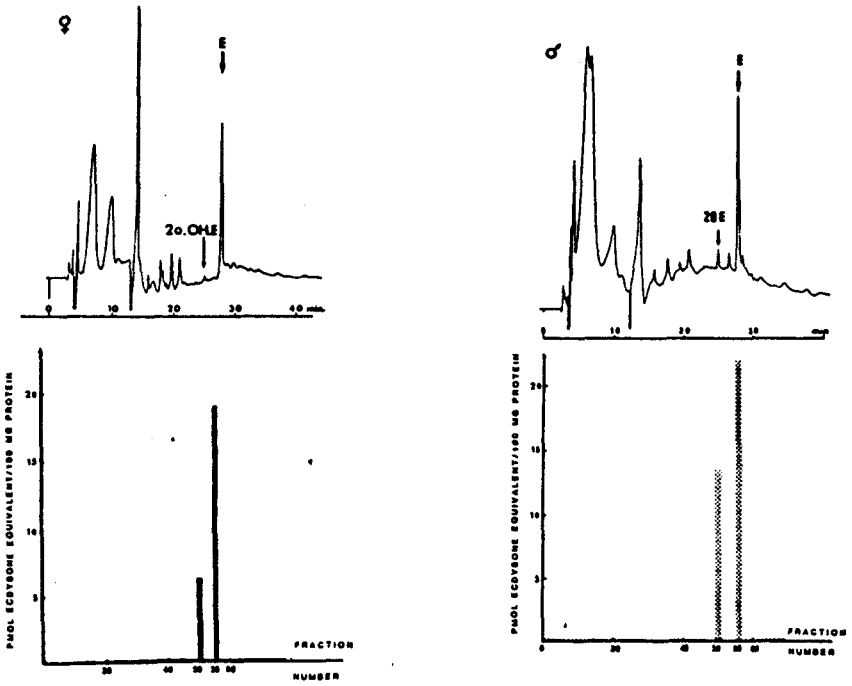


FIG. 4. High-pressure liquid chromatography of the extract of parasite collected exclusively by local puncture of mesenteric vessels and RIA on collected fractions. Column: Waters Microbondapack-phenyl; detection: Waters UV-visible detector M 441; 254 nm; calculator: Waters M 730 and system controler M 720; flow: 1 ml/min with Waters 6000 A pumps; gradient: After 2 min of isocratic conditions with water-acetonitrile (90:10) as solvent, a linear gradient of 30% of acetonitrile:water was performed in 30 min; arrows: standard elution of 20-hydroxyecdysone and ecdysone from Sigma run in the same conditions. (Modified from Nirdé et al., 1984a.)

ecysteroids compared with parasites collected by total perfusion: $r = 0.40$ for the males and 0.24 for the females. In mesenteric vessels, ecdysone is far more abundant than 20-hydroxyecdysone in both sexes. In the eggs, line F, the hormonal content and the ecdysteroid ratio are comparable to those of the females from mesenteric vessels ($r = 0.24$).

As shown in Figure 5, the trematode *Fasciola hepatica* also contains ecdysteroids. The ratio of 20-hydroxyecdysone to ecdysone plus 20-hydroxyecdysone was 0.44. HPLC analyses also indicate that a third ecdysteroid peak was detected. This peak could be specific for this species. Besides the physiological role of these hormones in the parasites, it would be interesting to follow their fate in the biological fluids of the infected hosts. Vertebrates do not pro-

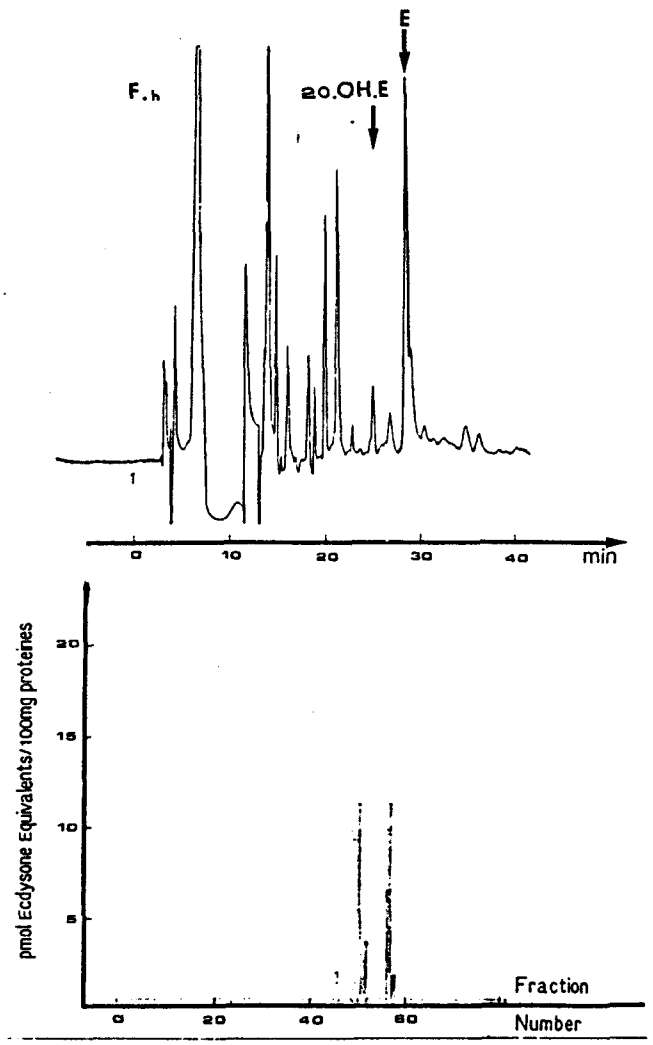


FIG. 5. High-pressure liquid chromatography and RIA analysis in extracts of the trematode parasite *Fasciola hepatica*.

duce insect moulting hormones nor specific enzyme systems to catalyze these hormones and, a priori, the ecdysteroids would not be metabolized by the hosts.

As shown in Figure 6, the serum of infected rodents contains ecdysteroids. As early as six days postinfection, ecdysteroids could be detected in sera of infected rats or hamsters, whereas no detection is possible in uninfected animals, or during the first five days of infection (Nirdé et al., 1984a,b). As shown

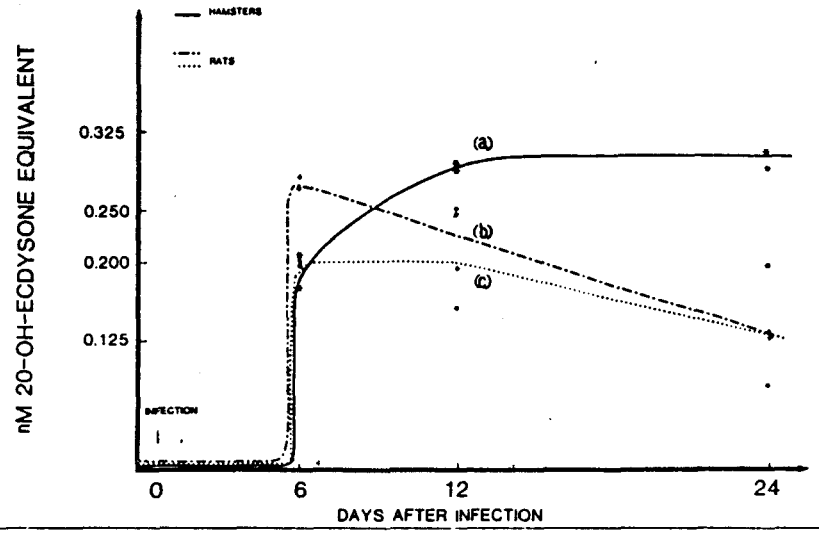


FIG. 6. Changes in ecdysteroid concentration in the serum of permissive and nonpermissive rodent hosts infected with *Schistosoma mansoni*. Hamsters (*M. auratus*, a) and rats (*R. rattus*, b) were infected with 2000 cercariae of *Schistosoma mansoni*, whereas other rats (c) were infected with only 500 cercariae. (From Nirdé et al., 1984a.)

in this figure, the changes in hormone level are different between permissive (curve a) and nonpermissive hosts (curves b and c). In permissive hosts such as hamsters, the RIA activity reaches 0.3 nM on day 12 postinfection, and this value remains unchanged on day 24. In contrast, in the nonpermissive hosts such as rats, the ecdysteroid level reaches 0.3 nM on day 6 postinfection, and, more important, it decreases slowly from day 10–12 onwards. This figure also shows that the rise in ecdysteroid concentration, which occurs on day 6, is significantly lower in rats that received a weaker challenge of 500 cercariae compared to rats challenged with two thousand cercariae. After day 12, the two groups of rats do not differ significantly with regard to the ecdysteroid titer.

Further analyses have shown that ecysteroids were also present in the blood of infected primates, even in the absence of parasitological markers (Nirdé, 1982, Nirdé et al., 1984a). Based on these data, ecdysteroid titers were determined in the urine of humans infected with *Schistosoma haematobium*.

Figure 7 demonstrates that children have a very high concentration of insect-molting hormones in their urine (Nirdé et al. 1984). Urine of 60 infected children between 10 and 14 years of age were assayed. The average level in hormone before chemotherapy was 4 5 nM. However, in three children, the highest value found was more than 180 nM. As seen in this figure, four days after drug administration, the hormonal concentration decreases markedly to one third and then slowly reaches 6 nM some 100 days after treatment.

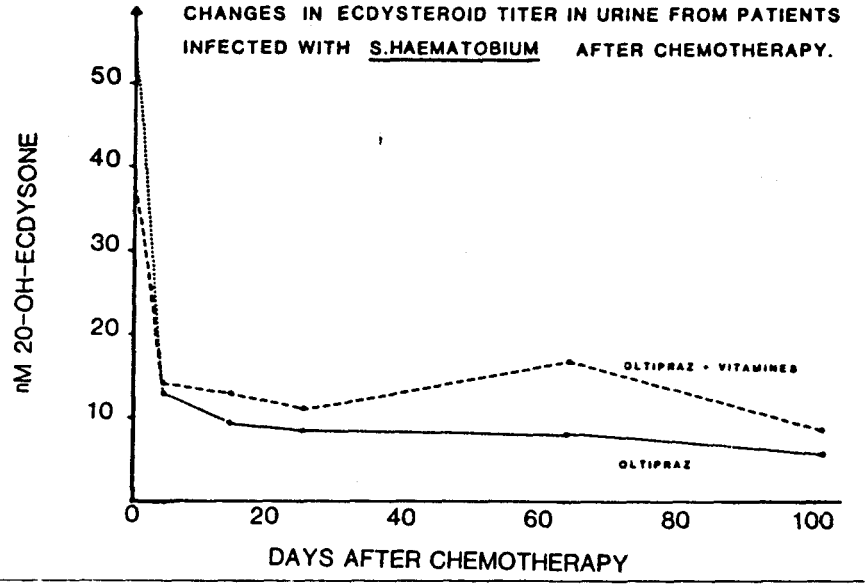


FIG. 7. Changes in ecdysteroid concentration in urine from patients infected with *Schistosoma haematobium* before and after chemotherapy. Day of chemotherapy: D_0, Single dose of Oltipraz (30 mg/kg, N = 20) or Oltipraz plus vitamins (30 mg/kg, N = 20).

Chemical characterization of ecdysteroids found in urine of infected humans has been achieved by mass spectroscopy as shown in Figure 8. Figure 8A, curve a, is the total ion recording. It indicates that several molecules are present in the urine sample. In curve b, the fragmentograph ion recording allows the detection of four ecdysteroid peaks. Arrow 1, the 20-hydroxyecdysone, and arrow 2, the 5 epi-20-hydroxyecdysone, show the two major peaks. One of the minor peaks is the 3-oxo-20-hydroxyecdysone. The last one has not been identified yet. Figure 8B(a) shows the mass spectrum of the compound yielding peak 1 in the fragmentogram. Spectrum b exhibits the mass spectrum of standard 20-OH-ecdysone run under the same conditions. The differences observed in the molecular weight of these ecdysones compared to crude molecules are caused by the derivatization of the ecdysteroids for the mass spectrum analysis. The fragment at *m/e* 561 corresponds to the nucleus of the ecdysone. The fragments with a larger *m/e* correspond to the fragmentation of the side chain of ecdysone after cleavage between C-20 and C-22 and to the loss of a silanol in the case of fully silylated derivatives.

In Figure 9, we notice that ecdysteroids are also detected in the sera of rodents infected with the nematode *Dipetalonema vitae*. Whereas low levels of ecdysteroids were measured on days 43 and 70 postinfection, high amounts of these hormones could be detected on day 63 postinfection.

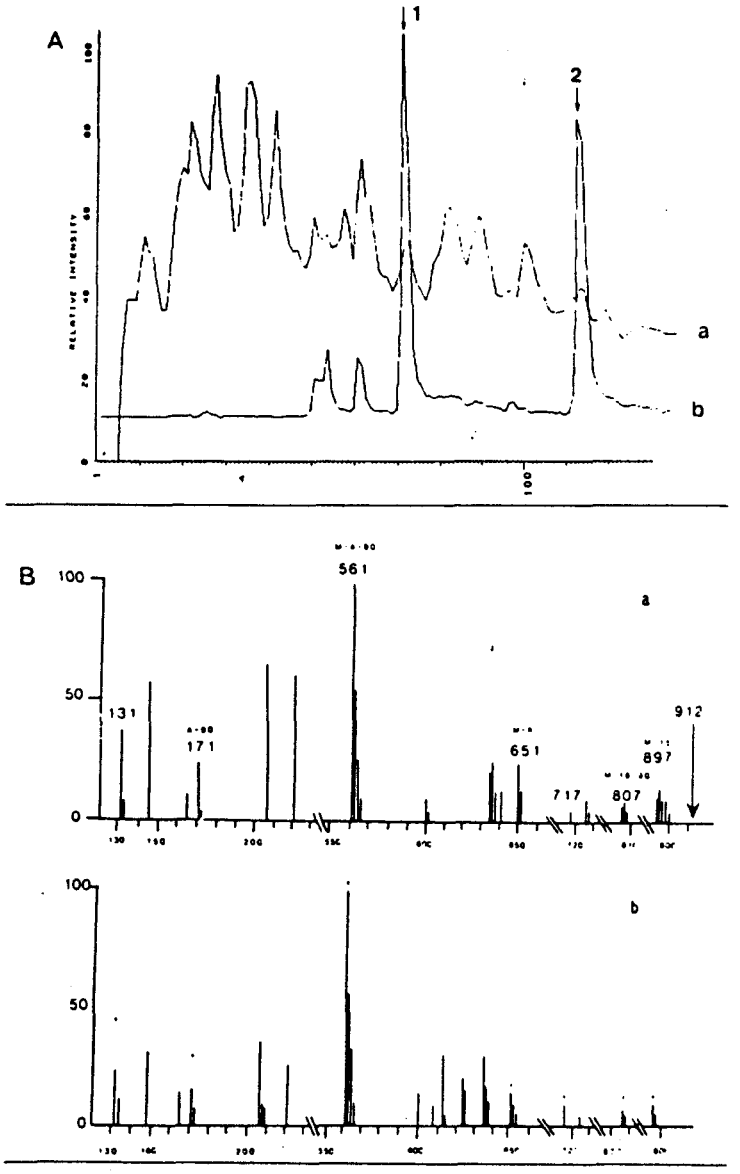


FIG. 8. Gas chromatography and mass spectrometry of hexamethylsilylated natural compounds from the infected patients. (A) Total ion gas chromatograph: (a) total ion recording, (b) recording of ion fragment at *m/e* 561. (B) Mass spectra: (a) mass spectrum of hexatrimethylsilylated reference 20-hydroxyecdysone (reference from SIMES, Milan); (b) mass spectrum of released ecdysteroid yielding peak 1 in A, line b. (From Nirdé et al., 1984a.)

STAGE	ECDYSTEROID AMOUNT *	N
D.43	0.18 +0.08	2
D.63	23.00 + 0.13	2
D.70	0.30 + 0.01	2

* PMOLE ECDYSONE EQUIVAL / ML SERUM

FIG. 9. Ecdysteroid levels in the sera of the nematode *Dipetalonema vitae*.

Figure 10 demonstrates that schistosomes contain the enzyme superoxide dismutase. Two isoenzymes have been detected during the development stages of the parasite: cytosolic Cu/Zn SOD and mitochondrial Mn SOD.

Both SOD activities are present in schistosomula and 11-day-old schistosomes. Adults collected on day 40 after infection by total perfusion of hamsters exhibit more SOD than adults recovered by local puncture of mesenteric vessels. Sexual differences in the ratio between mitochondrial and copper-zinc SOD can be observed. The females contain more copper-zinc SOD than the males.

In addition, as shown in Figure 11, total SOD activities in both males and females can be correlated with the ratio of 20-hydroxyecdysone to total ecdysteroids within parasites. When this ratio increases, the total SOD activities also increase. This is true for both sexes. The presence of ecdysteroid hormones around parasites could suggest that these hormones would be necessary for parasite development. As well as the biological role of these ecdysteroids at the parasite level, it seems interesting to investigate the bioiogical activities of antiecdysteroid antibodies against schistosomes.

Figure 12 shows the effects of immunization of rodents on the parasite burden. In hamsters, without any boosts, the reduction of the parasite population is around 38%. However, the females are more sensitive to the ecdysteroid antibodies than the males. In this case the reduction was over 50%. In the same way, in mice the reduction is around 30%. Once again, the females are far more sensitive than the males: the reduction is 60%. For a long time, it was impossible to reduce the parasite burden when rodents were boosted. Thus, another immunogenic compound has been synthesized.

As shown in Figure 13, the immunization of hamsters, followed by two boosts, leads to a significant reduction of the worm population, compared to hamsters which have received no injection (control) or a nonprotective antigen (placebo).

In addition, as shown in Figure 14, the corresponding ecdysteroid anti-

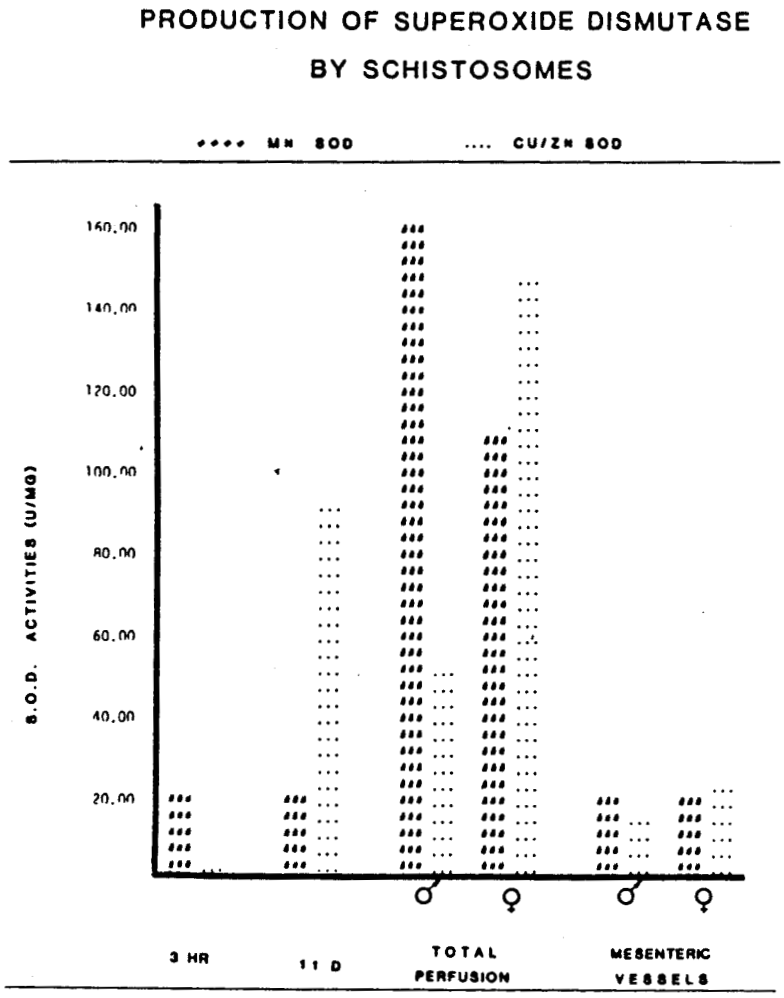


FIG. 10. Variation in superoxide dismutase activities during the development stages of *Schistosoma mansoni*.

bodies thus produced appear to be cytotoxic for schistosomula within 24 hr. For low dilution of the sera (1/4), this cytotoxicity reaches 100% within 24 hr of incubation; otherwise no cytotoxicity occurs. When samples were heated before incubation, the cytotoxicity remained at the same value. As shown in Figure 15, scanning microscopy on the in vitro cultured schistosomula has been investigated. This figure indicates that parasites incubated with the antibodies from immunized hamsters shed their membrane complex. This phenomenon

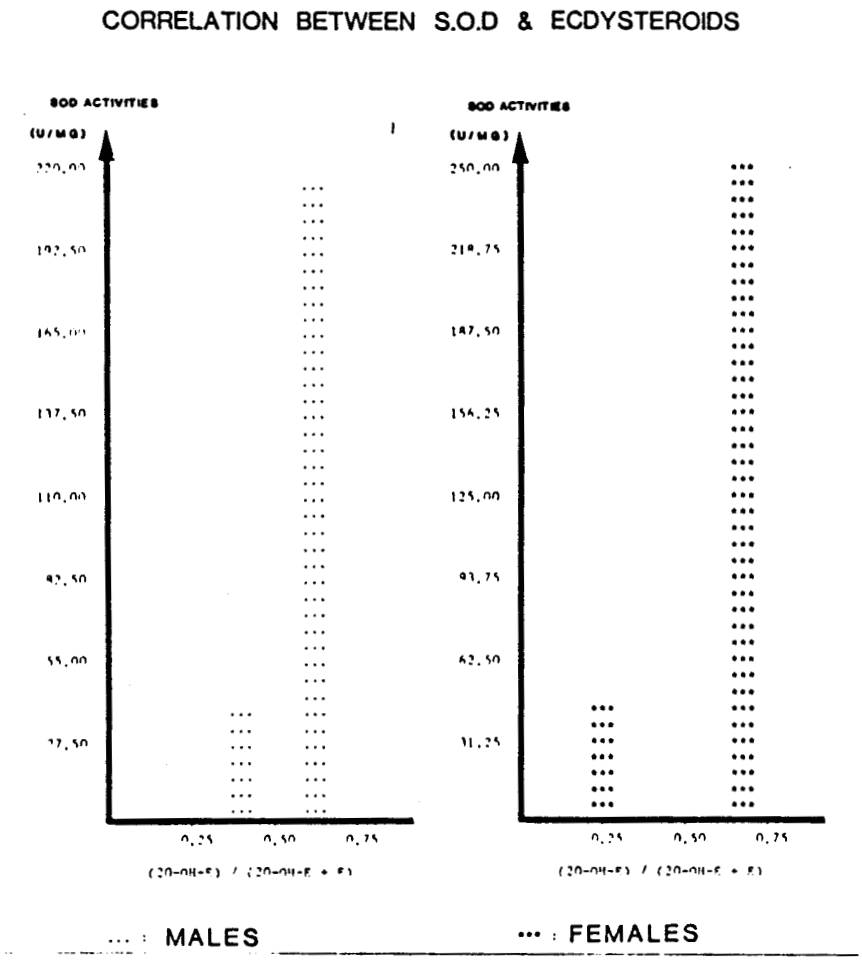


FIG. 11. Correlation between total superoxide dismutase and the ratio of 20-hydroxyecdysone to total ecdysteroids within adult *Schistosoma mansoni*.

leads to the death of the worms. The velvet-like appearance on the surface of the scoured parasites corresponds to the loss of the external tegument of *S. mansoni*.

DISCUSSION

We have demonstrated that the two hormonal activities, ecdysone and 20-hydroxyecdysone, were present at two crucial periods of the development of the bisexual trematode *Schistosoma mansoni*.

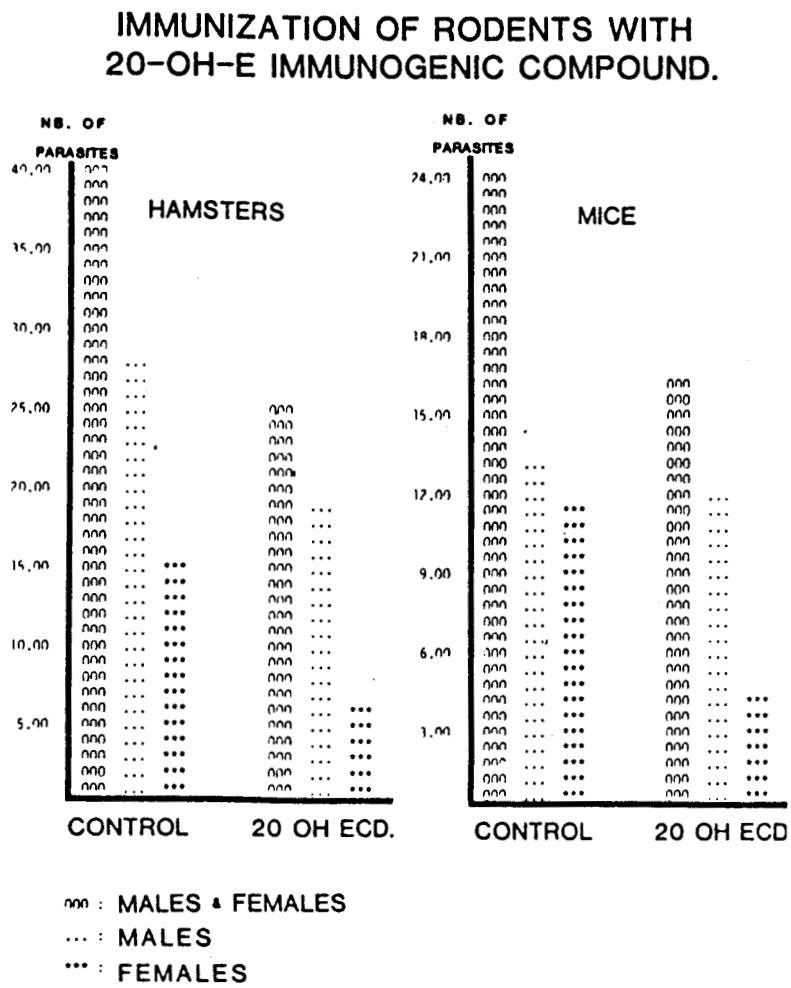


FIG. 12. Effects of a single immunization of an ecdsyone immunogenic compound on the parasite burden.

Firstly, the day 6 to day 11 period after infection is a transition period between the juvenile worm and its exponential growth phase to the bisexual stage. The high amount of ecdysteroids in 11-day-old worms, compared with others, indicates an endogenous synthesis by *S. mansoni*. Because the definitive host does not produce ecdysteroid hormones, passive incorporation of ecdysteroids from the host can be excluded. This rise in ecdysone levels can be correlated to three linked events: (1) The first event is migration and the development of juvenile worms which have left the lungs and just reached the liver.

REDUCTION OF THE PARASITE POPULATION WITHIN IMMUNIZED HAMSTERS

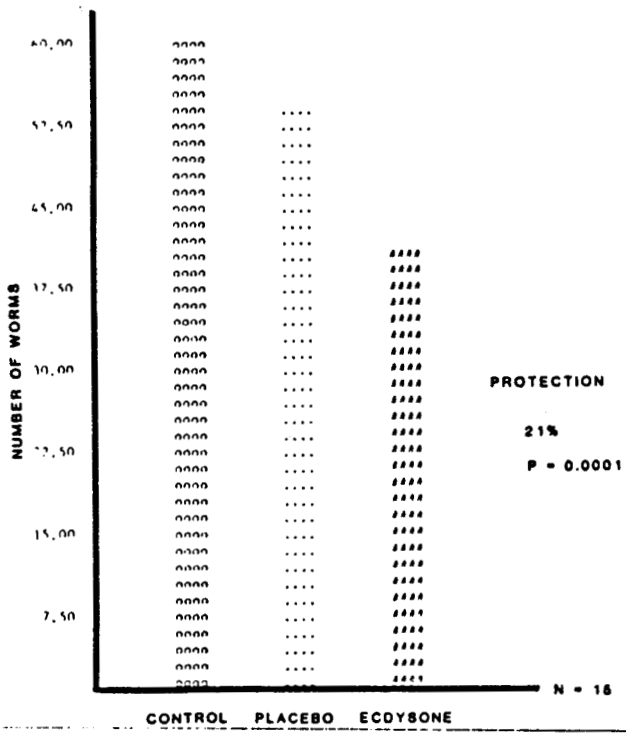


FIG. 13. Effects of immunization with two boosts of an ecdysone immunogenic compound on the parasite burden.

Wilson and coworkers (1978) have demonstrated that the process of transformation from the lung to liver form is characterized by a number of changes in the biological functions of schistosomes. They lose their ability to migrate, and their length and shape are modified. (2) During the same period, metabolic changes occur in the parasite, which leaves a semiquiescent metabolic state. As demonstrated by Lawson and Wilson (1980), an increase in density, nitrogen content, and growth initiation occur. (3) The rise in ecdysteroid is also correlated to membrane modifications of *S. mansoni*, as shown by Torpier et al. (1982).

The second crucial period in adult males and females is the priod of sexual maturation characterized by egg laying. The ratio between ecdysone and 20-hydroxyecdysone appears to be different according to the anatomical localization of the adult worms in mammalian hosts.

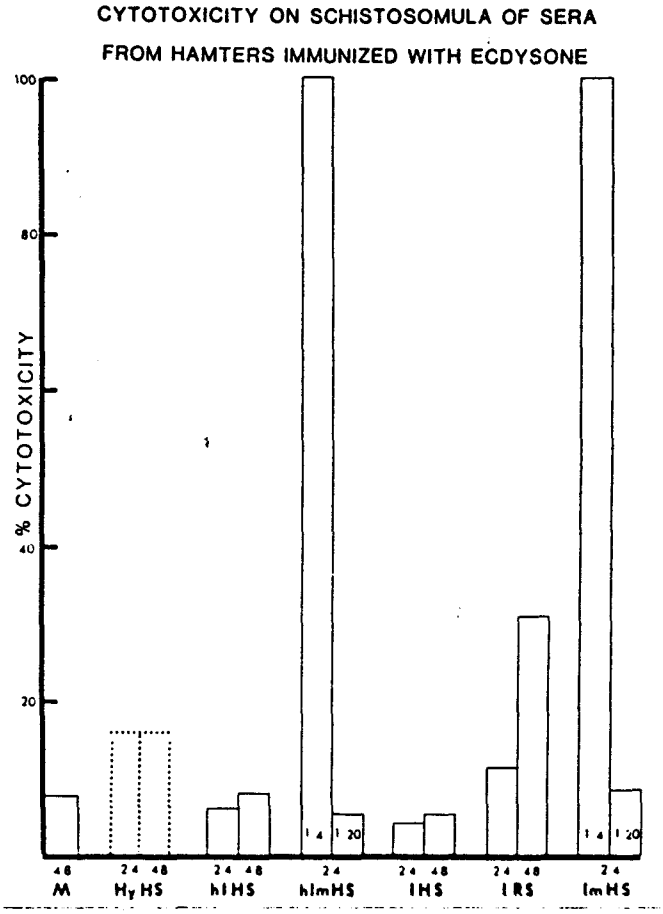
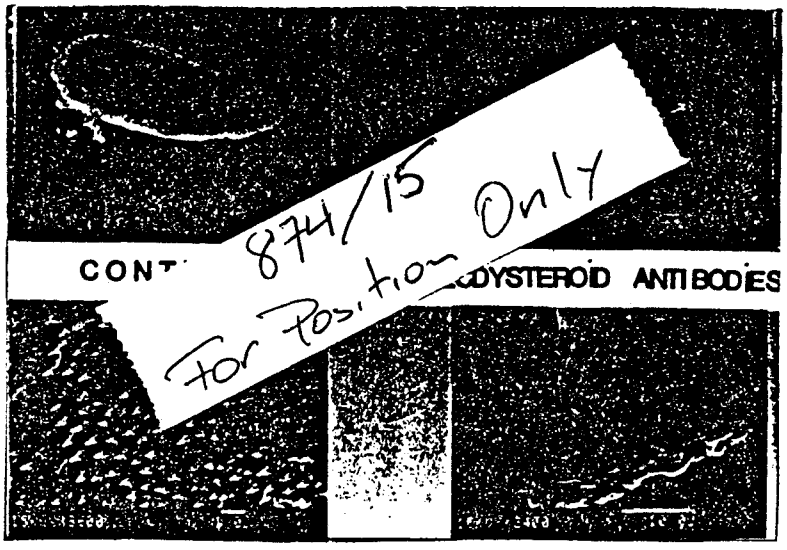


FIG. 14. In vitro cytotoxicity of natural ecdysone antibodies on schistosomules of *Schistosoma mansoni*.

These data indirectly suggest that ecdysteroids would have an important role in inducing the maturation of the female reproductive system. Our work has also demonstrated that the newly derived schistosomula contain ecdysteroids. As our experiments were conducted at 4°C and as the intermediate snail host produced ecdysteroid hormones (Nirdé and Herbert, unpublished), our hypothesis was that this large amount of ecdysteroid hormones found in 3-hr schistosomula might come from the snail host rather than from the parasite itself. In addition, the relatively high level of ecdysteroids during this first larval stage indicates that juvenile schistosomes leave the intermediate snail host with a reserve of ecdysteroids. If the *Schistosoma mansoni* model has allowed some interesting observations in the field of the production of ecdysteroids in para-



874/15 For Position Only

LILLE

FIG. 15. Scanning microscopy on cultured schistosomula after a 24-hr period of incubation with the natural ecdysone antibodies.

sites, it is obvious that this model is not the most suitable for further investigation in the pathway of ecdysteroid hormones in worms. It must be emphasized that the metabolic pathway of ecdysterone in insects has been studied in ovaries where the hormonal level was more than 10^{-3} M. Therefore, the low hormonal level found in parasites, around 10^{-15} M, has not allowed the chemical characterization of these products by mass spectroscopy.

Our work has demonstrated that the serum of infected rodents contains ecdysteroids as early as six days postinfection. Moreover, the changes in hormone level are different between permissive and nonpermissive hosts. These important observations suggest that the concentration of ecdysteroids could be an early biological parameter of parasite infection and may be correlated with the permissiveness of the host. We also have shown that ecdysteroids were present in the serum of rodents infected with the nematode *Dipetalonema vitae*. In addition, we have demonstrated that ecdysteroids were present in the urine of infected children. It is the first demonstration of excreted ecdysteroids by organisms. These hormones have been characterized by GC and MS as the 20-hydroxyecdysone, the 5-epi-20-hydroxyecdysone and the 3-oxo-20-hydroxyecdysone. Our work also shows that the moulting hormones decrease markedly after an antischistosome chemotherapy. According to these data, we therefore confirmed that the ecdysteroids were correlated with the viability of the parasites. Moreover, the release of ecdysteroids by schistosomes might be a general

feature of parasite infection. This is true for trematodes and nematodes. Our work on this point has been confirmed by other teams (Koolmann et al., 1984). This important observation, that human beings may have insect-molting hormones in their biological fluids, could lead to an early diagnosis of parasite infection.

In arthropods, it is well known that ecdysteroids induce protein synthesis. Two of them appear interesting to study with regards to parasite physiology. The first one is the enzyme superoxide dismutase. This enzyme catalyzes the conversion of oxygen anion to hydrogen peroxide (McCord and Fridovich, 1969). Superoxide dismutase could be involved in escape mechanisms of worms against oxygen anions produced by the immune cells: macrophages and eosinophils.

Our work demonstrated that superoxide dismutase was produced by schistosomes. The two SODs were present during the critical development stages of the parasite. Once again, the ratio of Mn SOD to Cu/Zn SOD was different between males and females. The females contained more cytosolic SOD than the males in both the mesenteric and the total perfusion. However, parasites collected from total perfusion of hamsters exhibited more SOD activities than parasites collected exclusively from the mesenteric vessels. Moreover, the total SOD activities could be correlated with the ratio of 20-hydroxyecdysone to total ecdysteroids within parasites. As 20-hydroxyecdysone is more active than ecdysone, in the physiological sense, our hypothesis is that the 20-hydroxyecdysone, or its conjugates, induces this enzyme in *Schistosoma mansoni*.

The second interesting enzyme is the dopa decarboxylase. Gathering together the publications on ecdysone, serotonin, and dopa decarboxylase, the schema in Figure 16 indicates what the action of ecdysone on egg shell formation may be. Two pathways are possible for the synthesis of melanin. The first one involves the serotonin molecule, the enzymes dopa decarboxylase (EC 4.1.1.28), and hydroxyindole-*O*-methyltransferase. On one hand, the enzyme dopa decarboxylase is known to be under the control of ecdysone (Kraminsky et al., 1981), and, in schistosomes, decarboxylates 5-OH-tryptophan as well as L dopa (Catto, 1981). On the other hand, serotonin is abundant in mesenteric vessels, and *S. mansoni* contains high concentrations of this biogenic amine. In addition, the enzyme hydroxyindole-*O*-methyltransferase is inhibitied by estradiol around 1 mM whereas it is activated by low steroid levels (Cardinali et al, 1981). Thus the amount of circulating estradiol could modulate the production of melanin. This fact must be correlated to the experiments of Barrabes and coworkers (1980), who demonstrated that large amounts of estradiol reduce egg production by schistosomes.

The second pathway involves L-dopa and dopa decarboxylase. At present, no direct experiments have been done to verify this schema, but it must be kept in mind when the induction of the female reproductive system is investigated.

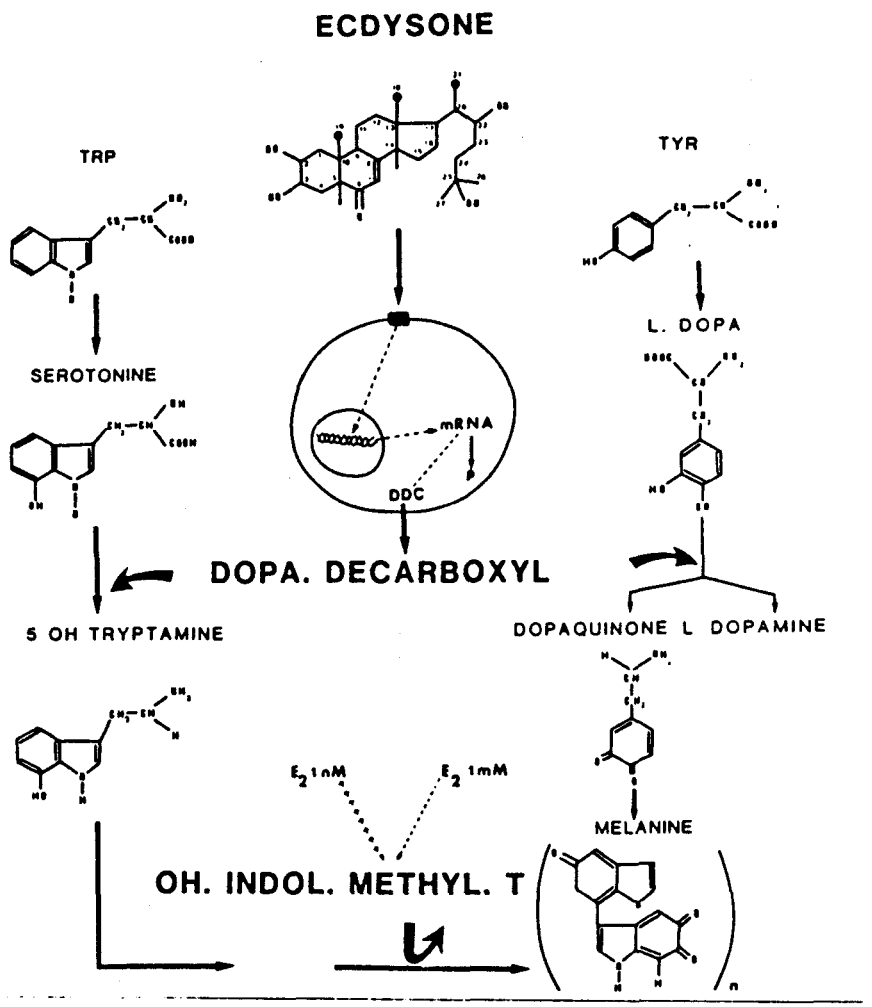


FIG. 16. Action of ecdysone on egg shell formation.

We certainly do not claim that we have achieved a high degree of protection. It is obvious that our experimental protocols have to be optimized. However, this partial result indicates that immunization with ecdysteroids might lead to a reduction of the worm burden. Although no direct evidence has been obtained on the physiological role of ecdysteroids within parasites, close correlations between the presence of significant amounts of hormones and some physiological phenomena are thought provoking. In this regard, the involvement of ecdysteroid hormones seems evident: (1) in parasite morphogenesis,

(2) in sexual maturation of the female reproductive system, and (3) in the induction of enzymes implicated in parasite escape mechanisms. Moreover, because humans do not produce ecdysone, the cytotoxic effect of ecdysteroid antibodies might be a novel strategy for immunoprophylaxis of parasite infections in man.

Acknowledgments—The authors thank Dr. B. Sellin (CERMES, Nigeria) for serum and urine samples of infected children and Dr. G. Prencier for scanning microscopy studies. The authors are indebted to Dr. G. Teller (Strasbourg) for mass spectroscopy analysis and P. Fressancourt for his skillful assistance. These works were carried out with the aid of grant 282-0016 from the Edna McConnell Clark Foundation, New York. This work was also supported by INSERM (U 167) and CNRS (624).

REFERENCES

BARRABES, A., DUONG, T.H., REYNOUARD, F. and COMBESCOT, C. 1980. La parasitose expérimentale à *Schistosoma mansoni* du hamster doré: Etude de l'effet sur l'intensité du parasitisme et sur le taux d'anticorps circulants après administration d'estradiol, de testostérone ou de progestérone. *Ann. Parasitol.* 55(6):671-677.

BENNETT, J., BUEDING, E., TIMMS, A.R., and EMGSTROM, R.G. 1969. Occurrence and levels of 5-OH-tryptamine in *S. mansoni. Mol. Pharmacol.* 5(5):542-545.

BUTENANDT, A., and KARLSON, P. 1954. *Z. Naturforsch.* 9b:389-391.

CATTO, B.A. 1981. *Schistosoma mansoni:* Decarboxylation of 5-hydroxytryptophan, L-dopa, and L-histidine in adult and larval schistosomes. *Exp. Parasitol.* 51:152-157.

CARDINALI, D.P., VACAS, M.I., and RITTA, M.N. 1981. A biphasic effect of estradiol on serotonin metabolism in rat pineal organ culture. *Experientia* 37:203-204.

DENIS, R.D.W. 1977. On ecdysone binding proteins and ecdysone-like material in nematodes. *Int. J. Parasitol.* 7:181-188.

DE REGGI, M.L., HIRN, M.H., and DELAAGE, M.A. 1975. Radioimmunoassay of ecdysone: An application to drosophila larvae and pupae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66:1307-1315.

HORN, D.H.S., WILKIE, J.S., and THOMSON, J.A. 1974. Isolation of beta ecdysone from the parasitic nematode *A lumbricoïdes. Experientia.* 30:1109-1110.

KARLSON, P. 1980. Ecdysone in retrospect and prospect, pp. 1-11, *in* J. A. Hoffmann (ed.). Progress in Ecdysone Research. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.

KOOLMANN, J., WALTER, J., and ZAHNER, H. 1984. Ecdysteroids in helminths, pp. 323-330, *in* (J. Hoffmann and M. Porchet (eds.). Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones. Springer Verlag, Berlin.

KRAMINSKY, G.P., CLARK, W.C., ESTELLE, M.A., GEITZ, R.D., SAGE, B.A. O'CONNOR, J., and Hodgetts, R.B. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77(7):4175-4179.

LAWSON, J.R., and WILSON, R.A. 1980. Metabolic changes associated with the migration of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni* in the mammalian host. *Parasitology* 81:325-336.

MARSH, J.L., and WRIGHT, T.R.F. 1980. Developmental relationship between dopa decarboxylase, dopamine acethyltransferase, and ecdysone in Drosophila. *Dev. Biol.* 80:379-384.

MCCORD, J.M., and FRIDOVICH, I. 1969. Superoxide Dismutase an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244(22):6049-6055.

NIRDÉ, P. 1982. Hormones de *Schistosoma mansoni* et interface hote parasite. Doctoral thesis. Lille No. 1010.

NIRDÉ, P. 1986. Treatment of superoxide dismutase assay by a regression method. *J. Autom. Chem.* ~~In press~~ 3(1):28-31

NIRDÉ, P., TORPIER, G., CAPRON, A., DELAAGE, M.A., 1983a. IIth International CNRS symposium. Strasbourg, August 1983.

NIRDÉ, P., TORPIER, G., DE REGGI, M.L., and CAPRON, A. 1983b. Ecdysone and 20-hydroxyecdysone: New hormones for the human parasite *Schistosoma mansoni*. *FEBS Lett.* 151(2):223-227.

NIRDÉ, P., DE REGGI, M.L., TSOUPRAS, G., TORPIER, G., FRESSANCOURT, F., and CAPRON, A. 1984a. Excretion of ecdysteroids as a marker of parasite infection. *FEBS Lett.* 168(2):235-240.

NIRDÉ, P., TORPIER, G., CAPRON, A., DELAAGE, M.A., and DE REGGI, M.L. 1984b. Ecdysteroids in schistosomes and host-parasite relationship, pp. 331-337, *in* J. Hoffmann and M. Porchet (eds.). Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones. Springer Verlag, Berlin.

REES, H.H., and MENDIS, A.H.W. 1984. The occurrence and possible physiological significance of ecdysteroids, pp. 338-345, *in* J. Hoffmann and M. Porchet (eds.) Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones. Springer Verlag, Berlin.

ROGERS, W.P. 1962. The Nature of Parasitism. Academic Press, London.

ROGERS, W.P. 1973. Juvenile and molting hormones from nematodes. *Parasitology* 67:105-113.

SMITHERS, S.R., and TERRY, R.J. 1965. The infection of laboratory host with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology* 55:695-700.

STIREWALT, M.A., and UY, A. 1969. *S mansoni*: Cercarial penetration and schistosomule collection in an in vitro system. *Exp. Parasitol.* 26:17-23.

TORPIER, G., HIRN, M.H., NIRDÉ, P., DE REGGI, M.L. and CAPRON, A. 1982. Detection of ecdysteroids in the human trematode, *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 84:123-130.

VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J.B., NIESCHLAG, E., and ROSS, T. 1971. A method for providing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol.* 33:988-991.

WHITEHEAD, D.L. 1983. Steroids—the earliest hormones. *Nature* 306:540.

WILSON, R.A., DRASKAU, T., MILLER, P., and 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.

1/ L'hypothèse d'une présence d'enzymes de type SOD est vérifiée et deux lignes directrices se dégagent de cette étude:

a/ Le parasite *S.mansoni* produise des enzymes superoxide dismutases pendant toutes les phases de son développement,

b/ Qu'il semble exister une corrélation positive entre les ecdystéroïdes parasitaires et la production d'enzymes SOD. A cet égard, les résultats d'une étude *in vitro* indiquent une augmentation de 46% en SOD parasitaire pour des concentrations hormonales de 10^{-10}M. Dans cette étude non publiée, un mélange des deux hormones a été utilisé. Le rapport entre les deux hormones a été choisi en fonction de la corrélation théorique entre la SOD et les ecdystéroïdes parasitaires (la concentration en ecdysone était de 3.33 10^{-5}M et pour la 20-OH-E de 6.66 10^{-5}M). La pré-stimulation de 24hr à 10^{-10}M du mélange en ecdystéroïdes était suivie d'une incubation de 24hr sans hormones, puis d'une stimulation de 4 jours par différentes concentrations hormonales de 10^{-5}M à 10^{-11}M. Par analogie avec les insectes où cette enzyme est sous le contrôle de l'hormone ecdysone et bien que notre étude ne soit pas effectuée sur un nombre importants d'expériences, nous avons un argument en faveur d'une production de la SOD parasitaire sous la dépendance d'ecdystéroïdes.

2/ En revanche, l'approche du rôle biologique des ecdystéroïdes en utilisant des anticorps anti-ecdystéroïdes à la place d'analogues hormonaux non métabolisables, a conduit à des résultats tout à fait inattendus: a/ L'observation d'une action cytotoxique d'anticorps ecdystéroïdes vis-à-vis des jeunes schistosomules en culture, b/ Une cytotoxicité qui se manifeste en microscopie à balayage par la perte totale du tégument externe des schistosomules, et c/ La réduction significative de la population parasitaire après immunisation de rongeurs par un immunogène ecdystéroïde.

D'un immunogène à l'autre, il y a toujours eu un effet sur la population parasitaire. La réduction observée variait d'un lot d'immunogène à l'autre de 10 à 100%. De même pour les études *in vitro*, la cytotoxicité variait dans de grandes proportions. Seuls des anticorps monoclonaux 20-OH-Ecdysone, ne sont pas cytotoxiques vis-à-vis des schistosomes alors que le polyclonal l'est. Ces résultats ont été confirmés par le Dr. Jean Marie

GZRYCH au sein du laboratoire avec d'autres lots d'anticorps (les anticorps "gamma-301285", "delta-301285" et "ec19" fournis par Immunotech).

Ces résultats soulèvent le problème crucial du mode d'action d'anticorps anti-hormones vis-à-vis d'un métazoaire qui contient les hormones correspondantes. A ce jour aucune explication du mode d'action de ces anticorps anti-ecdystéroïdes n'est réellement donnée. Cependant, on peut penser que les anticorps peuvent se fixer sur la membrane du parasite. La structure cible la plus évidente pouvant être liée à cet anticorps est le haptène correspondant, en l'occurrence un ecdystéroïde. Dans ce cas, si les ecdystéroïdes peuvent se trouver à la surface du parasite, ils peuvent très bien passer dans le milieu sanguin de l'hôte dans lequel évolue le parasite. Ma nouvelle hypothèse, très audacieuse il est vrai, était que les ecdystéroïdes, excrétés dans le sang par le parasite, pouvaient être dosés. Le chapitre suivant est entièrement consacré à l'étude du sang et des urines de l'hôte infesté par des parasites.

CHAPITRE V

LES ECDYSTEROIDES EXCRETES

Nous avons démontré dans l'un des chapitres précédents, que les trématodes contiennent des hormones ecdystéroïdes en faible quantité mais dosables. Ces études ne donnent qu'un "instantané" de la situation, en particulier, elles ne donnent aucun renseignement sur la vitesse de production de ces hormones, ni sur leur devenir. Les ecdystéroïdes semblant jouer un rôle primordial dans la physiologie des parasites, pourrait-il exister une forme de stockage de ces hormones parasitaires chez l'hôte définitif qui n'en synthétise pas dans une situation non pathologique? Dans ce cas, les ecdystéroïdes deviendraient un marqueur biologique d'une infestation parasitaire. Les schistosomes étant hébergés dans le système vasculaire de l'hôte, il était naturel d'analyser ce compartiment biologique.

En utilisant les techniques conjointes d'HPLC et de RIA nous avons analysé les sérums et les urines de vertébrés infestés par *Schistosoma mansoni* dans le but de vérifier notre hypothèse. Différents hôtes ont été étudiés: Des rongeurs permissifs (hamsters) et semi-permissifs (rats) pour les schistosomes. Cette analyse fut ensuite étendue aux primates dans un modèle d'infestation chronique (singes *Patas patas*) où disparaissent certains symptômes parasitologiques comme la présence d'oeufs dans les selles (La présence d'oeufs dans les fèces est l'élément capital qui confirme le diagnostic d'une infestation par les schistosomes). Enfin, les ecdystéroïdes ont été dosées dans les urines de jeunes schistosomiens vivant en zone d'endémie (Niger), avant et après une chimiothérapie effectuée dans le cadre d'une campagne de l'OMS. Ces mêmes malades ont permis la collection d'urine nécessaire à la caractérisation par spectrométrie de masse des ecdystéroïdes majeures présentes dans les urines de bilharziens.

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet de la publication suivante.

Volume 168, number 2 FEBS 1312 March 1984

Excretion of ecdysteroids by schistosomes as a marker of parasite infection

P. Nirde, M.L. De Reggi*, G. Tsoupras+, G. Torpier, P. Fressancourt and A. Capron

*Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, INSERM (U167), CNRS (ERA 422), Institut Pasteur, BP 245, 59019 Lille Cédex, *IMMUNOTECH S.A., Case 915, 13288 Marseille Cédex 9* and *+Laboratoire de Biologie Générale, CNRS (ERA 118), 12 rue de l'Université, 67000 Strasbourg, France*

Received 25 January 1984

Ecdysteroids produced by schistosomes are released in biological fluids of infected hosts. In the sera, the concentration of ecdysteroids correlates with the permissiveness of the host to schistosome infection and its detection is available in the absence of positive parasitological tests. In the urine, ecdysteroid concentration decreases markedly after chemotherapy. 20-Hydroxyecdysone and its epimer were identified in the urine of infected patients using mass spectrometry. These data demonstrate for the first time that ecdysteroids are released by organisms. Moreover, they are potent molecules of parasite infection and can be used for parasite diagnosis.

Schistosomiasis *Body fluids* *Ecdysterone* *Mass spectrum analysis* *Radioimmunoassay*

1. INTRODUCTION

The parasitic worms which cause schistosomiasis (bilharziasis) in man or rodents belong to the genus *Schistosoma*, a somewhat unusual group of digenic trematodes. This parasite has a complex life cycle involving an intermediate host in addition to the definitive host in which they reach sexual maturity. Schistosomes are the only trematode in which sexes are separate in adult worms. During the mature stage, the females may lay several hundred eggs per day which cause irreversible sequelae (granuloma, liver fibrosis). Another characteristic of schistosomes is their adoption of the blood as their adult habitat.

The presence of ecdysteroids, the insect moulting hormones, has been reported in the trematode *Schistosoma mansoni* where it is assumed that they control development and reproduction as they do in arthropods [1,2]. As well as the biological role of these ecdysteroids at the parasite level, it would be interesting to follow their fate in the infected host. This report shows that appreciable amounts of ecdysteroids are released into both sera and urine of infected hosts (rodents, monkeys and man), where they can be quantified by radioimmunoassay (RIA). Moreover, two of the excreted ecdysteroids have been characterised using high-performance liquid chromatography (HPLC), RIA, gas chromatography (GC) and electron impact mass spectrometry (MS). This has led to the identification of 20-hydroxyecdysone and 5-epi-20-hydroxyecdysone. It should be borne in mind that schistosomiasis (bilharziasis) is a major health problem in 73 tropical countries, where the number of infected people is estimated to be about 300 million. Our findings show that measurement of ecdysteroid concentrations in blood and urine can be used to diagnose parasitic diseases on a large scale, and to monitor the efficiency of chemotherapy.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Infection of rodents*

Hamsters (a) (permissive) and rats (b,c) (non-permissive) were infected by exposure to cercariae of *S. mansoni* as in [3]. They received 2000 cer-

Published by Elsevier Science Publishers B.V.
00145793/84/$3.00 © 1984 Federation of European Biochemical Societies

cariae, except for one group of rats which received only 500.

Two wild monkeys (*Patas patas*), aged 2 years and weighing 5 kg, were infected 10 times at 2-week intervals by exposure to 500 cercariae of *S. mansoni* as in [3]. The infection was checked by immunodiagnosis [4,5] and parasitological diagnosis [6]. The two animals differed from each other since monkey A had eggs in the stools whereas monkey B did not, even 535 days after the first infection.

2.2. *Ecdysteroid assay*

One-ml samples of serum were taken and added to 3 ml methanol. The mixture was heated at 60°C for 15 min and centrifuged (800 × *g*, 10 min). The supernatant was dried under a flow of nitrogen. The residue was dissolved in 0.1 M citrate buffer (pH 6.1) and then assayed according to the RIA method in [7].

Urine samples: the study was conducted on 60 children aged 12–14 years from Niamey (Nigeria), infected with *S. haematobium*. Urine samples were taken around 10 a.m. at school. On the spot, 1 ml urine was added to 3 ml methanol and the mixture sent to our laboratory. Samples were then treated as described above.

2.3. *Chemotherapy*

The children received a single dose of antihelminthic drugs. The first group (n = 20) was treated with Oltipraz alone (30 mg/kg), the second (n = 20) with Oltipraz plus vitamins (30 mg/kg) and the last group (n = 20) received Praziquantel (30 mg/kg).

2.4. *Mass spectrum analysis*

Urine from 20 people infected with *S. haematobium* was collected (600 ml). Urine samples were added to 1200 ml butanol. After centrifugation at 1000 × *g* for 3 min, the butanol phase was dried under reduced pressure at 40°C. The residue was then dissolved in 95% ethanol before being centrifuged (1000 × *g*, 3 min). The supernatant was dried under nitrogen and suspended in methanol prior to being analysed by thin-layer chromatography (silica gel plates 20 × 20, F254, Merck) with chloroform–methanol as solvent (80:20, v/v). Bands of 1 cm width were scraped off and extracted with 95% ethanol. Immunoreactive samples were then analysed by HPLC as in [2]. GC was performed on immunoreactive HPLC fractions after derivatization. For this purpose, 100 μl trimethylsilylimidazole (TSIM) were added. This solution was heated overnight at 80°C under argon, and separation of derivatized ecdysteroids from the reagent was performed by HPLC on a silica column with ethanol–hexane as solvent. After evaporation of the solvent under argon, acetone was added to the dried extract and 1–2 μl were injected into a GC apparatus (Varian 1200, capillary glass column SE/30) at 290°C. An LKB 9000 S electron impact mass spectrometer was coupled to the gas chromatograph. This spectrometer was equipped with an Incoss computer system which allows the recording of one mass spectrum per s during the whole process of chromatography.

3. RESULTS

Fig.1 shows the results of ecdysteroid RIA measurement in the blood of rodents before and after infection with *S. mansoni*. It is apparent that no immunoreactivity is recorded before infection and during the first 5 days after infection.

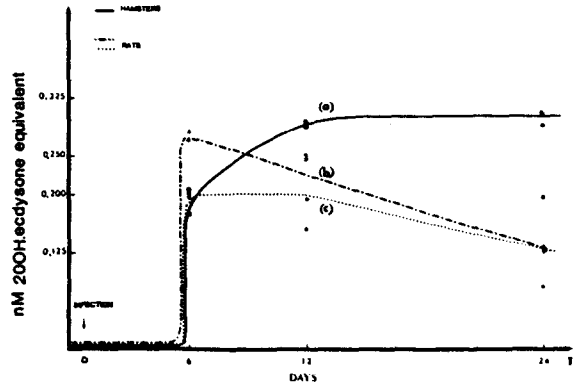


Fig.1. Changes in ecdysteroid concentration in the blood of rodents before and after infection. Hamsters (permissive) and rats (non-permissive) were infected with cercariae of *S. mansoni*. Blood samples were analysed by RIA on different days of infection. (a) Hamsters infected with 2000 cercariae, (b) rats infected with 2000 cercariae, (c) rats infected with 500 cercariae. Each experimental point is the mean of 4 individual values; bars, SE.

However, on day 6, appreciable amounts of ecdysteroids can be detected in the blood of the rodents. The changes in hormonal level differ between permissive (hamsters) and non-permissive hosts (rats). In the first case, the ecdysteroid concentration reaches 0.3 nM on day 12 post-infection and this value is unchanged on day 24 (fig.1a). In contrast, in non-permissive hosts, the ecdysteroid level reaches 0.3 nM as early as day 6 and, more importantly, decreases thereafter, reaching 0.22 nM on day 12 and 0.13 nM on day 24 (fig.1b). Fig.1 also shows that the rise in ecdysteroid concentration which occurs on day 6 is significantly lower in rats which were challenged with a dose of 500 cercariae compared to rats challenged with 2000 cercariae (fig.1c). On the following days, the two groups of rats did not differ significantly.

Ecdysteroids are also present in the blood of infected primates. Fig.2 shows that, in *P. patas* monkeys, they reach 4 nM in the serum on day 218 post-infection and more than 8 nM on day 499 and day 535. In contrast, ecdysteroid levels in an uninfected monkey were below 0.3 nM in the serum (fig.2c). It should be noted that *S. mansoni* eggs were found in the stools of monkey A during the duration of the experiments (10–180 eggs/g). Monkey B lacked eggs in the stools on day 499 and thereafter. Despite this difference in the form of the chronic model, ecdysteroid levels were very similar in both animals.

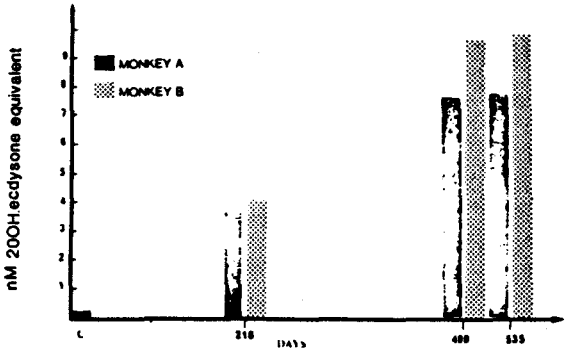


Fig.2. Ecdysteroid titer in sera of monkeys infected with *S. mansoni*. Monkey A, chronic model of infection with eggs in the stools during infection. Monkey B, chronic model of infection without eggs following day 218. (c) Control performed with blood of uninfected monkeys treated under the same conditions.

Ecdysteroids were assayed in urine of children infected with *S. haematobium*. Patients had very high concentrations of these hormones; the mean level was 30 nM and the highest value found in 3 children was 180 nM (fig.3). It is noted that the hormonal concentration decreased after antihelminthic chemotherapy. Four days after drug administration, the ecdysteroid titer fell to one-third, and then slowly decreased, reaching around 6 nM some 100 days after treatment. Chemical characterization of ecdysteroids found in urine of infected patients was achieved by GC and MS after trimethylsilylation (fig.4). Total ion recording and fragmentograph ion recording are shown in fig.4A. The total ion analysis (fig.4A,a) indicates that several molecules are present in urine samples. The fragmentograph recording of the main ion of 20-hydroxyecdysone at *m/e* 561 (fig.4A,b) [8] allows the detection of two major molecular forms. The first peak (vertical arrow 1) has the same retention time as standard hexatrimethylsilyl 20-hydroxyecdysone and the second (arrow 2) has the same retention time as standard hexamethylsilyl 5-epi-20-hydroxyecdysone (reference compound prepared by Dr Hetru [9]) run under the same conditions. The mass spectrum of these

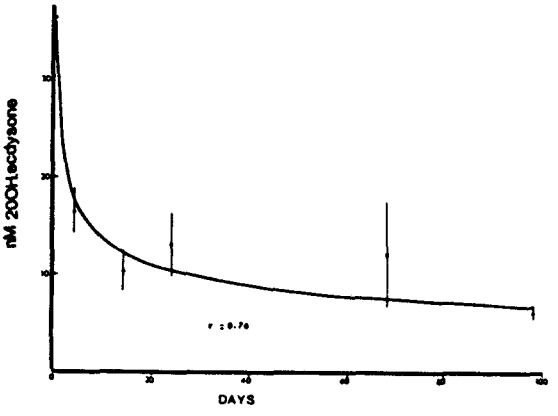
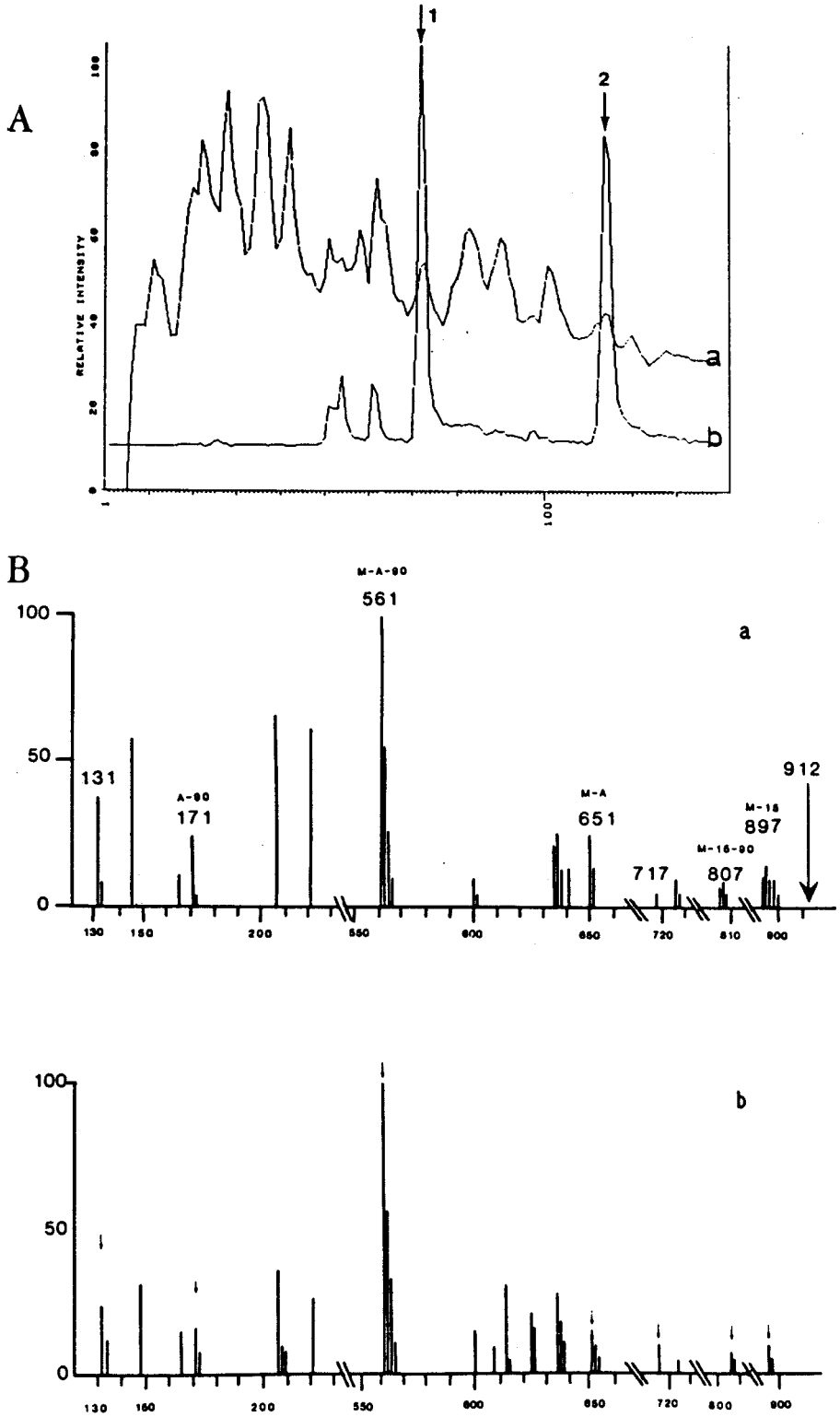


Fig.3. Changes in ecdysteroid titer in urine from patients infected with *S. haematobium* before and after chemotherapy. On day 0 the children received a single dose of antihelminthic drugs: Oltipraz alone or Oltipraz plus vitamins or Praziquantel. The effect of these treatments on the ecdysteroid titer was very similar, therefore the means of 60 individual values are shown (each individual value is the mean of triplicates); bars, SE.


A
1
2
a
b
RELATIVE INTENSITY
B
M-A-90
561
a
131
A-90
171
M-A
651
M-15
897
M-15-90
807
717
912
b

molecules is given in fig.4B. The spectrum of reference trimethylsilylated 20-hydroxyecdysone (fig.4B,a) has the main ion at *m/e* 561 which corresponds to the loss of the side chain of the ecdysteroid after cleavage between C-20 and C-22 and the loss of a silanol in the case of fully silylated derivatives. This ion is highly characteristic of the hexatrimethylsilylated 20-hydroxyecdysone. The fragments at *m/e* 131 and 171 correspond to fragmentation of the 20-hydroxyecdysone side chain [10]. Moreover, the fragment at *m/e* 897 (molecular ion minus one methyl) is also present. In conclusion, peaks 1 and 2 yield the same mass spectra which are similar to the mass spectrum of 20-hydroxyecdysone obtained under the same conditions. The difference in retention time is explained by the fact that peak 2 corresponds to the 5-α epimer of 20-hydroxyecdysone.

4. DISCUSSION

This study demonstrates that ecdysteroid hormones present in schistosomes are released into the sera and urine of infected hosts. This is true for experimental rodent hosts as well as for primates and man. These ecdysteroids are present in sera of infected rodents as early as 6 days post-infection. The time course of the ecdysteroid titer shows a good correlation with the susceptibility or the innate resistance of the host to schistosome infection. The ecdysteroid level is maintained in hamsters whereas it decreases in rats. This important observation suggests that the concentration of ecdysteroids is an early biological parameter of parasite infection. The presence of ecdysteroids in urine and sera of infected vertebrates seems to be pertinent in the follow up of the disease. The time course of the ecdysteroid concentration might also be correlated with the viability of the parasites. To support this concept, the appreciation of ecdysteroid titer from urine of infected humans allows the detection of a dramatic decrease after antischistosome chemotherapy. In addition, gas chromatography and electron impact mass spectroscopy studies on the same human material demonstrate that two main ecdysteroid molecules are present: 20-hydroxyecdysone and 5-epi-20-hydroxyecdysone. Furthermore, other minor molecules which are immunoreactive have been detected, but their structures have not yet been identified. Moreover, these ecdysteroids can be detected even in the absence of parasitological markers, i.e., eggs in the stools, as stated above for *P. patas* monkeys.

From a clinical point of view, the presence of ecdysteroids in the sera and urine of infected humans is of practical interest because they can be used as a biological marker of parasite infection and thus palliate 3 drawbacks of parasitological diagnosis which are:

(i) No detection before the late egg-laying stage of the parasites;
(ii) Decrease or absence of egg laying in chronic infection;
(iii) Relative unreliability of the parasitological tests.

In addition, except for the classical parasitological tests, no other biological test allows an accurate determination of the efficiency of chemotherapy.

Together with new insights into host-parasite relationships (i.e., immunological system or endocrine system), this finding opens novel approaches for early detection of parasitic diseases and for monitoring the efficiency of therapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Drs M.A. Delaage and M. Hirn (IMMUNOTECH S.A., Marseille) for the generous gifts of anti-20-hydroxyecdysone antibodies and iodinated antigen for radioimmunoassay and Dr B. Sellin (CERMES Niamey, Nigeria) for serum and urine samples. The authors are indebted to Dr J.A. Hoffmann (Strasbourg) for providing facilities for this work and Dr G.

←

Fig.4. Mass spectrum of hexatrimethylsilylated natural compounds present in urine of patients infected with *S. mansoni*. (A) Total ion gas chromatogram: (a) total ion recording, (b) recording of ion fragment at *m/e* 561. (B) Mass spectra: (a) mass spectrum of hexatrimethylsilylated reference 20-hydroxyecdysone (reference from SIMES, Milan), (b) mass spectrum of endogenous ecdysteroid yielding peak 1 in the fragmentogram of part A (the mass spectrum of the endogenous ecdysteroid yielding peak 2 in the fragmentogram is not shown as it is identical to that of peak 1).

Teller (Strasbourg) for mass spectrometric analysis. This work was carried out with the aid of grant no. 2820016 from the Edna McConnell Clark Foundation, NY. This work was also supported by INSERM (U167) and CNRS (ERA 422).

REFERENCES

[1] Torpier, G., Hirn, M.H., Nirdé, P., De Reggi, M.L. and Capron, A. (1982) Parasitology 84, 123–130.

[2] Nirdé, Ph., De Reggi, M.L., Torpier, G. and Capron, A. (1983) FEBS Lett. 151, 223–227.

[3] Smithers, S.R. and Terry, R.J. (1965) Parasitology 55, 695–700.

[4] Capron, A., Vernes, A., Biguet, J. and Tran Van Ky, P. (1967) Ann. Soc. Belg. Med. Trop. 47, 127–142.

[5] Bout, D., Dugimont, J.C., Carlier, Y. and Capron, A. (1976) in: Protides of the Biological Fluids (Peeters, H. ed) vol.24, pp.775–779, Pergamon Press, New York.

[6] Katz, N., Chaves, A. and Pellegrino, J. (1972) Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 14, 397–400.

[7] De Reggi, M.L., Hirn, M.H. and Delaage, M.A. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 1307–1315.

[8] Lafont, R., Somme-Martin, G., Mauchamp, B., Maume, B. and Delbecque, J.P. (1980) in: Developments in Endocrinology (Hoffmann, J.A. ed) vol.7, pp.45–68, Elsevier, Amsterdam, New York.

[9] Hetru, C., Nakatani, Y., Luu, B. and Hoffmann, J.A. (1983) Nouv. J. Chim. 7, 587–591.

[10] Morgan, E.D. and Woodbridge, A.P. (1974) Prog. Mass Spectrometry 9, 102–108.

Nous avons donc vérifié l'hypothèse de la présence d'hormones ecdystéroïdes dans le sérum et les urines des hôtes infestés par des schistosomes.

Quatre éléments principaux se dégagent de cette étude:

1/ La cinétique d'apparition des ecdystéroïdes sériques est dépendante du modèle expérimental: courbe croissante " en plateau" chez les hôtes permissifs, et courbe décroissante chez les hôtes semi-permissifs,

2/ Présence d'hormones ecdystéroïdes sériques dans des infestations chroniques, même dans le cas de l'absence d'oeufs dans les fèces,

3/ Disparition rapide des ecdystéroïdes urinaires chez des patients ayant subi une chimiothérapie parasitaire,

4/ Caractérisation, par spectrométrie de masse, de la 20-hydroxy-ecdysone comme composé urinaire majeur dans la schistosomiase. A cet égard, depuis cette publication deux autres ecdystéroïdes ont été identifiés. la forme épimère en 5α et le 3-oxo-20-hydroxy-ecdysone.

Dans le souci d'élargir ces résultats à d'autres groupes parasitaires, une étude a été entreprise chez des hôtes infestés par des némathelminthes: soit *Brugia malayi* dans une analyse sur rats *Mastomys natalensis* (souche Giessen GRA, fournie par l'institut de parasitologie de Giessen (RFA)), soit par d'autres filarioses comme *Wuchereria bancrofti*, dans le cas d'infestations humaines en zone d'endémie.

Cette étude fait l'objet de la communication suivante soumise à FEBS Letters.

ECDYSTEROIDS IN THE BIOLOGICAL FLUIDS OF VERTEBRATES INFECTED WITH *Brugia malayi*

NIRDE Philippe*, LUTSCH Charles, CESBRON Jean Yves and CAPRON André

Unité mixte INSERM (U167) - CNRS (URA 155), Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut PASTEUR, BP 245 - 59019 LILLE cédex- France. Telex 820 187 F.

SUMMARY

The invertebrate ecdysteroid hormones have been detected as early as 7 days post infection in the sera of rodents which had been infected with the filarial nematode *Brugia malayi*. The time course of these hormones exhibits four ecdysteroid pics which have to do with the molting processes of the worms within the host, and the release of circulating microfilariae by the females. The half-life of exogenous ecdysteroids in vertebrate sera lasts 40 minutes whereas, in the urine, two different kinetics appear with a half-life of 16 hrs and 260 hrs respectively. Moreover, through the combined use of two technics - HPLC and RIA - we demonstrate that the urines of infected human beings exhibit at least nine ecdysteroid molecules. Two of them were similar to those of the intermediate mosquito host *Aedes aegypti*. Besides, patients contained ecdysteroids in their urines which were not found in our previous studies on schistosomiasis.

Key words: Ecdysterone, Radioimmunoassay, HPLC, Filariasis, Nematode, Body fluids, kinetic

* To whom all correspondance should be addressed.

1 - INTRODUCTION.

The invertebrate ecdysteroid hormones have been first demonstrated in arthropods(1) where they were associated with the insects'moulting process. These hormones were detected in the nematode parasites, as the growth of this specie has involved a serie of evident moults(2)(3). The evidence of ecdysteroids within nematode parasites is well documented(4). Since we demonstrated that the human parasite *S.mansoni*(5)(6) produced the ecdysteroids which were released into the biological fluids of infected human beings(7), a particular interest has been devoted to this topic(8)(9). We are reporting herein the time course of the ecdysteroids - from the sera of rodents which have been infected with the nematode *B.malayi* - during the first year after infection. Thus, we demonstrate by radioimmunoassay (RIA) that the serum ecdysteroid titer can be correlated with the physiological events in the life of the worms.

The half-life of crude ecdysteroids within the sera and the urine of rodent host is also investigated after a single intraveinous injection. However, an important obstacle prevents the use of ecdysteroids within a human diagnostic test: the presence of hormones which are not parasite specific. In this respect, we demonstrate by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) andd RIA the presence of new ecdysteroid molecules in the urine of the infected human beings as compared to previous results on schistosomiasis.

2 - MATERIALS AND METHODS.

2.1. Infection of rodents.

Brugia malayi parasites were maintained in the rats Mastomys natalensis (GRA giessen strain) and in the mosquito *Aedes aegypti*. *M. natalensis* were infected with L3 larvae of *A.aegypti* by s.c. injection as in (10)

2.2 Injection of ecdysteroids

Ecdysone and 20-hydroxy-ecdysone were purchased from Sigma (St Louis, USA). Ecdysteroids were dissolved in an apyrogenous 0.9% NaCl solution, and filtered through a 0.22µm millex[R] membrane. Rodents were anaesthetized, placed in sterile conditions, and gently injected with 10^{-6} M ecdysteroids into the dorsal vein of the penis. The animals were then kept in metabolites cages.

2.3 Serum and urine sample.

The rodents were bled through the retro-orbital venous plexus on a given day following infection (or at a given time after ecdysteroid injection). After each blood collection, a counting chamber method determined the density of the circulating microfilaremiae as in (9) . Human sera, and urines samples were a generous gift of Dr. BARBIER Michel (PARIS).

2.4 Ecdysteroid assay.

400 µl of blood or 150 ml of urine samples for ecdysteroids were extracted as in (6). A radioimmunoassay (RIA) was performed within coated tubes which have been purchased from Immunotech (Marseille, France). For this, 100 µl ecdysteroid extract and 400 µl of ^{125}I-ecdysone were

filled into the coated tubes, and incubated for 24hr at 4°C.

2.5 HPLC analysis.

The urine extracts were analyzed by HPLC (Waters) on a reverse Novapack phenyl column (Waters) with an elution rate of $1ml.min^{-1}$. Solvent A is 10% acetonitrile in water, and solvent B, 10% water in acetonitrile. Gradients were performed as follow with 4 successive steps: Step 1: B (0%) in isocratic conditions for 2 minutes. Step 2: a linear gradient from 0% to 11 of B (11% - final step) for 16.47 min followed by isocratic conditions of B (11%) for another 3min. Step 3: a linear gradient from 11 to 19% of B (19% -final conditions) for 20.53 min followed by isocratic conditions of B (19%) for 10 min. Step 4: is a linear gradient of B from 19% to 30% (final step) of B for 10 min. followed by an isocratic elution of 30% B for 11 min. Step 5 involved the washing of the system with 100% acetonitrile, and equilibration to the initial conditions within one hour.

3. RESULTS.

Fig.1 shows the ecdysteroid titer in the blood and urine in the rodents after exogenous ecdysteroids had been injected. The sera exhibits an exponential curve with a half-life of 0.66 hr (i.e 40 minutes). The mathematical expression of the decrease of exogenous ecdysteroids in the sera of vertebrates is: $C_t = C_0\ e^{-1.058t}$, with C_0 the amount of ecdysteroids at time 0, and C_t the amount of ecdysteroids at t time. In contrast, the decrease of the hormones in the urine of the rodents is the superposition of two exponential curves. The first one has a half-live of 16hrs and its mathematical expression is $C_t = C_0.e^{-0.635t}$. The second one has a half-live of 260 hrs and an equation: $C_t=C_0.e^{-0.049t}$. A linear representation of the curves $\log(C_t)=f(t)$ (data not shown) confirmed these two exponential curves.

Fig.2 exhibits the time course of the ecdysteroids in the sera of *M.natalensis* infected with the nematode *Brugia malayi*. The ecdysteroid hormones are to be found in the serum of rodents as early as 7 days following infection. Four ecdysteroid pics can be detected during this infection. On day 42, and day 71 after infection, serum ecdysteroids were detected whereas no circulating microfilaria were detectable. In contrast, on

day 159 and on day 195 following infection the pics of the ecdysteroid hormones were correlated with the apparition of the two microfilarial pics. Finally, the ecdysteroid pics precede the microfilarial ones.

Whereas B.malayi parasites were used for academic researches human beings were mostly infected with W.bancrofti, a nearly allies specie, in natural conditions. Fig.3 shows the urine HPLC profile of human beings infected with *Wuchereria bancrofti*, and the HPLC profile of *uninfected Aedes aegypti* - the intermediate mosquito host - performed in similar conditions. Nine ecdysteroids pics can be detected in the urines using HPLC together with RIA. The elution times for these immunoreactive molecules were as follow. Five unknown pics have been recorded in the urine samples. The elution time is 9,12,13,32 and 44 minutes respectively. Four other immunoreactive pics were eluted at 16.90, 18.05, 20.45, and 23.45 minutes. They have been identified on the basis of comigration in HPLC system as 20-hydroxy-ecdysone, Inokosterone, Makisterone and ecdysone respectively with respect to the elution time of the standards molecule run in the same conditions. During the first 8 minutes of elution, no immunoreactivity can be detected by the ecdysteroid assay. From one patient to another, the ecdysteroids vary from 15 to 215 pmol/ml. However, ecdysone remains the major pic into the chromatogram.

4. DISCUSSION.

This paper demonstrates that invertebrates rodent hosts infected with *B.malayi* released ecdysteroid hormones into their sera during the first year of infection. The detection of these ecdysteroids is possible as early as 7 days following infection. In addition, it is well known that the life cycle of a nematode, such as *B.malayi* involves a serie of molts within its definitive host which occur - for *B.malayi* - arround day 7 and arround day 32 after infection (11)(12). Thus, the describe event is concomitent with the molting process of the infective larvae within its definitive host . Moreover, these hormones were present on day 7 onwards, whereas a diagnosis based only on the filarial antigen detection in infected rodents is quite impossible during the first 50 days after

infection (13). The hypothesis would be that the lapsed time between the infection and the detection of ecdysteroids in the sera accounts for the time it takes a parasite population in spreading the biological fluids of the host with the hormones. Hence, as in schistosomiasis (7), sera ecdysteroids appear to be an early parameter of parasite infection. It has been demonstrated by the *in-vitro* studies with another nematode parasite Ascaris suum, that the hormonal pics appeared in the culture media just before the molts of the worms (14). In this study, we now have evidence that, when the sera ecdysteroid titer is assayed, these physiological events of a parasite can be noticed in the case of a natural infection . We have found - using intraveinous injection of ecdysteroids - that the half-life of these molecules into the sera of vertebrates lasts 40 minutes. This is in good agreement with a recent report which has demonstrated that after a subcutanous injection of ecdysone in mouse, this hormone was rapidly removed from the blood of the rodent, and most of it was eliminated by the animal within faeces as 14-deoxyecdysone (15). This rises the crucial question of the rate of production of these hormones by the parasite population if they do. In this respect, it has been previoulsy stated by Koolman and co-workers that the ecdysteroids found in the sera of patients infected with parasites is of a diet origin (16). Since the ecdysteroids molecules were synthetized in the invertebrates phylla, the hypothesis of a synthesis of ecdysteroids by the parasites themselves would have to be also considered (17). However, we have now evidence that the ecdysteroid hormones were present in several parasitic diseases, and infected human beings exhibit ecdysteroids in their biological fluids. On the other hand, from filariasis patients infected with a similar filarial specie (i.e. *W.bancrofti*), appreciable amount of urine can be collected for biochemical studies. The HPLC analysis of these urine samples exhibits 9 pics. Three of them were similar to those of the intermediate *Aedes aegypti* host. It must be emphasized here that the nematode parasites had not infected these larval mosquitoes. No valuable explanation to the apparent community of ecdysteroids between larval *Aedes aegypti* and the urine of patients can be given yet. The polar ecdysteroids have been identified as 20-hydroxy-ecdysone, inokosterone, makisterone and

ecdysone. The Inokosterone and the makisterone molecules were present in the urine of patients with filariasis but not in patients with schistosomiasis as compared to previous results (7). Thus, we now have clear evidence that ecdysteroid molecules could be different from one parasitic disease to another. It became reasonable to hope that within a same parasitic specie the excreted ecdysteroids would be differents. Together with the early apparition of these hormones into the sera or urine of the infected patients, the ecdysteroids appear to be a precious biological parameter of parasite infection and must be use in control of therapy efficiency as well as in diagnosis.

ACKOWLEDGEMENTS: The authors are indebted to Dr. BARBIER Michel (International hospital of PARIS University) for the human sera, and urine samples. We are faithfull to GAZET Jean Pierre and HENRY Didier for technical assistance. The authors also thank Miss GURY Isabelle for reading this manuscript. This work was supported by **INSERM** (U167) and **CNRS** (UA 155)

LEGENDS

Figure 1: Half-life of exogenous ecdysteroids injected in the sera and in the urines of rodents.

The animals received a single intravenous injection of an equimolecular amount of ecdysone and 20-hydroxy-ecdysone. The final hormonal molarity was 10^{-6}M. Samples (500µl) were assayed for ecdysteroids (n=6).

Figure 2: Time course of ecdysteroids from sera of *M.natalensis* - infected with the nematode *B.malayi*- during the first year following infection.

Blood sample were analyzed for ecdysteroid assay and circulating microfilaremiae. Each value is the mean of 4 determinations

Figure 3: HPLC profile of both the urine of patients from endemic area infected with filariasis, and *Aedes aegypti* extracts.

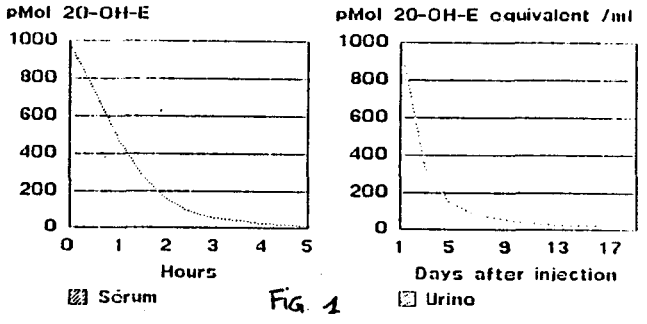


Fig. 1

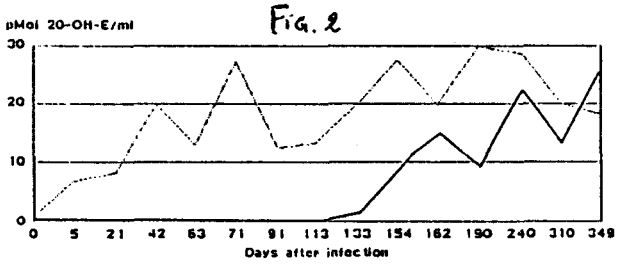


Fig. 2

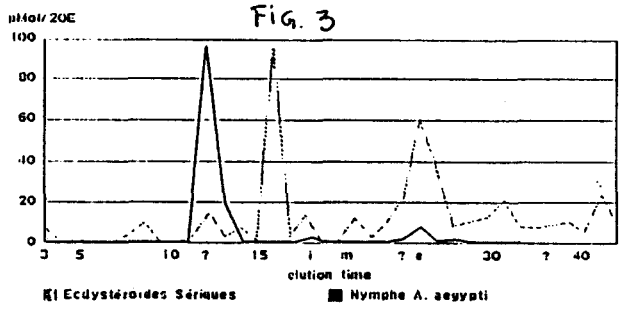


Fig. 3

REFERENCES

(1) BUTENANDT, A and KARLSON, P. (1954), Z. Naturforsh. **9b**: 389-391.
(2) ROGERS, W.P. (1973), Parasitology **67**: 105-113.
(3) HORN, D.H.S., WILKIE, J.S. AND THOMPSON, J.A. (1974), Experiencia **30**: 1109-1110.
(4) REES, H.H., MERCER, J.G.(1986), in Advances in invertebrate Reproduction 4 (M. Porchet, Andries J.C. & Dhainaut A. Eds), Elsevier Science Publishers, Amsterdam - New York pp 173-186.
(5) TORPIER, G., HIRN, M.H., NIRDE, P., DE REGGI, M.L. and CAPRON, A. (1982), Parasitology **84**: 123-130.
(6) NIRDE, P., TORPIER, G., DE REGGI, M.L. and CAPRON, A.(1983), F.E.B.S. Letters **151(2)**:223-227.
(7) NIRDE, P., DE REGGI, M.L., TSOUPRAS, G., TORPIER, G., FRESSANCOURT, P. and CAPRON, A. (1984), F.E.B.S. Letters **168(2)**:235-240.
(8) NIRDE, P., DE REGGI, M.L. and CAPRON, A. (1986), J. Chem. Ecol. **12(8)**: 1863-1884.
(9) KOOLMAN, J. MOELLER, H. (1986), Insect Biochem. **16**:287-291.
(10) SäNGER, I., LäMMLER, G., KIMMING, P. (1981), Acta Trop. **38**: 277-288.
(11) ASH, L.R.; RILEY, J.M. (1970), J. Parasitol. **56**: 969-973.
(12): ASH, L.R. (1973), J. Parasitol. **59(3)**: 442-447.
(13) LUTSCH, C., CESBRON, J.Y., ZAHNER, H., AND CAPRON, A. (1987), Parasitol. Res. **74**:191-195.
(14) MERCER, G.J.; MUNN, A.E.; ARME, C. and REES, H.H. (1987), Molec. Biochem. Parasitol. **26**:225-234.
(15) LAFONT, R.; GIRAULT, J.P. and KERB, U. (1988), Biochem. Pharmacol. **37(6)**:1174-1177.
(16) KOOLMAN, J., WALTER, J, and ZAHNER H.(1984) in Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones (J. Hoffman & M. Porchet Eds), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 323-330.
(17) BOTTJER, K.P.; WHISENTON L.R. and WEINSTEIN, P. (1984), J. Parasitol. **70(6)**: 986-987.

Nous avons démontré que la présence des ecdystéroïdes sériques et urinaires n'était pas propre aux schistosomiases. Egalement présentes dans les filarioses expérimentales et humaines, ces modèles parasitaires permettent de mettre en évidence de nouvelles molécules d'ecdystéroïdes qui pourraient être spécifiques de ces parasites. La nature chimique de ces hormones nouvelles pour les filarioses reste à être étudiée.

La présence d'hormones ecdystéroïdes dans le sang et l'urine de l'hôte parasité nous a conduit à rechercher le devenir de ces hormones dans les principaux organes d'un hôte vertébré infesté. Pour des raisons de commodité l'étude à été menée sur des hamsters infestés par des schistosomes. Les hamsters infestés depuis 40 jours ont subit une chimiothérapie au Praziquantel[R] (30mg/kg, dose unique per os). A J2, J4, J7, les hamsters sont sacrifiés par dislocation cervicale, les différents organes (foie, testicules, reins, poumons et cerveau) sont broyés et les ecdystéroïdes sont extraites aux solvants organiques (hexane/méthanol/eau; 6/2/1; vol/vol/vol). L'analyse des ecdystéroïdes est effectuée à la fois en chromatographie sur couche mince, et par HPLC-RIA. Les résultats, non publiés sont consignés dans le tableau suivant:

	HEXANE			METHANOL		
ORGANE	J2	J4	J7	J2	J4	J7
Foie	80	138	12	533	1470	174
Rein	11	23	2	195	38	12
Cerveau	14	12	4	196	38	3
Poumon	70	12	29	28	116	20
Testicule	28	24	1	306	61	4

(Résultats exprimés en pico mole de 20-OH-ecdysone équivalent pour 100 mg de protéine).

Ces résultats montrent la présence d'hormones ecdystéroïdes polaires (méthanol soluble) mais aussi apolaires (hexane soluble) dans les organes analysés, ce qui était alors un élément nouveau. Tous les organes étudiés contiennent à des degrés divers des ecdystéroïdes. Le foie accumule les hormones polaires et apolaires jusqu'à J4 post-thérapie.

CHAPITRE VI

DISCUSSION

I - ECDYSTEROIDES PARASITAIRES.

I.1. LES ECDYSTEROIDES DE *SCHISTOSOMA MANSONI.*

Les quantités importantes d'hormones ecdystéroïdes, renfermées dans les schistosomules, la forme infestante du parasite *S.mansoni*, doivent être imputées à une contamination par l'hôte intermédiaire plutôt qu'à une synthèse endogène par le parasite lui-même.

D'une part, les schistosomules mécaniques ne sont âgés que de 2 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 inactives. Dans de telles conditions, il est peu probable qu'il existe chez la forme primaire du parasite des mécanismes permettant d'effectuer la synthèse endogène de telles quantités hormonales.

Par ailleurs, il a été récemment démontré que des organes de certains gastéropodes (les "dorsal bodies") étaient capables de synthétiser des ecdystéroïdes (Revue JOOSSE, 1988). Un fait qui n'exclut pas la présence de telles hormones chez l'hôte intermédiaire de *Schistosoma*. Nos analyses HPLC-RIA d'hépato-pancréas et d'hémolymphe de *Biomphalaria glabrata* confirment qu'ils contiennent à la fois l'ecdysone et la 20-OH-ecdysone (**HERBERT** et **NIRDE**, non publié). Ces résultats confortent l'hypothèse d'une réserve hormonale véhiculée par les schistosomules et qui servirait au parasite pour son développement dans les premiers jours d'infestation.

L'augmentation très importante, par un facteur 5, des quantités d'hormones ecdystéroïdes au stade J11 peut faire penser à une production endogène par le parasite lui-même puisque l'hôte vertébré définitif qui l'héberge n'en synthétise pas. La détection de la seule molécule d'ecdysone à ce stade parasitaire qui est caractérisé par des processus tégumentaires, conforte l'hypothèse évoquée page 39 selon laquelle l'ecdysone ne serait pas une pro-hormone, mais bien une hormone à part entière impliquée dans la crise mitotique de l'épiderme. Chez *S.mansoni*, ce pic d'ecdysone présent à

ce stade crucial du développement parasitaire peut être relié à trois événements biologiques:

- Migration et développement de la forme juvénile. Pendant la migration du parasite des poumons vers le foie, WILSON démontre que le parasite est l'objet de transformations morphologiques du parasite (réduction de taille, de l'amplitude des mouvements d'élongation et de contraction) et de la perte, pour les parasites déjà installés dans le foie, de leur capacité à migrer (**WILSON** et al 1978).

- Modifications de paramètres métaboliques du parasite qui arrive dans le foie (**LAWSON** et al. 1980). La mesure des quantités d'azote contenues dans le jeune schistosome, de la consommation d'O_2, de l'activité lactate déshydrogénases (LDH), montre une augmentation rapide de tous ces paramètres dès que le parasite atteint le système porte-hépatique. Ces événements, dont les auteurs ne peuvent expliquer l'origine sur des critères biologiques, sont initiés entre le 10ème et le 11ème jour après l'infestation.

- Modifications des membranes de *S.mansoni*. La technique de cryodécapage a permis de révéler un phénomène de desquamation membranaire assimilable à une mue présent à J11 (**TORPIER** et al. 1982).

Ces trois observations se situent au moment où apparait un pic d'ecdysone chez le parasite. Or, il est maintenant bien établi chez les invertébrés que l'ecdysone et la 20-OH-E ont un rôle morphologique et qu'un pic hormonal précède toujours l'événement biologique (**TRUMAN** et al.1981). Pour expliquer en toute rigueur de tels quantités hormonales chez les schistosomes J11, deux hypothèses sont envisageables: soit une accumulation d'ecdystéroïdes d'origine alimentaire de l'hôte vers le parasite, soit une synthèse d'ecdystéroïdes par le parasite lui même. Cependant, nos connaissances actuelles de ces hormones chez les insectes indiquent que chez les arthropodes même si leur alimentation contient des phyto-ecdystéroïdes, ils synthétisent eux même leurs ecdystéroïdes. Par ailleurs,

l'analyse des liquides biologiques de l'hôte vertébré sain est négative dans le test d'ecdystéroïde en RIA. Il faut bien admettre dans ces conditions, même en l'absence de preuves directes, que les parasites invertébrés seraient capables de synthétiser cette hormone. La preuve rigoureuse sera fournie par une expérimentation *in vitro*, lorsqu'on observera l'apparition d'ecdysone radioactive à partir d'un précurseur radio-marqué.

Par analogie avec à la fois la physiologie des autres familles parasitaires, notamment chez les nématodes où les mues parasitaires sont caractérisées par une augmentation de l'ecdysone intra-parasitaire (**FLEMING**, 1985), et nos observations sur les schistosomes, la période J11 pourrait être considérée comme une mue des schistosomes.

Le **stade adulte** est défini comme étant la période à laquelle les vers femelles commencent la ponte. Les schistosomes adultes contiennent des hormones ecdystéroïdes dont les proportions en ecdysone et en 20-OH-ecdysone varient en fonction de la localisation anatomique des parasites mais pas en fonction de leur sexe. La somme des ecdystéroïdes, des mâles plus celles des femelles, est identique quelque soit la localisation des vers chez l'hôte vertébré. Une démonstration directe de la présence d'ecdystéroïdes chez *S.mansoni* est fournie par les travaux de BASCH (**BASCH** 1986). Ils visualisent, au sein même des parasites, par des techniques immuno-cytochimiques la présence d'hormones ecdystéroïdes. Nous n'avons pu reproduire ces résultats au laboratoire, ni en microscopie optique, ni en microscopie électronique. La difficulté de fixer avec un anticorps de petites molécules (comme l'ecdysone, poids moléculaire 480) et d'obtenir sur des coupes histologiques un complexe - anticorps anti-ecdysone/ ecdysone - stable qui résiste aux divers lavages est responsable de nos échecs. Ceci pose le problème de l'affinité de l'anticorps anti-ecdysone pour son substrat, donc de la structure spatiale de l'immunogène initial. Nous verrons ultérieurement que cette question est importante.

I.2 LES ECDYSTEROIDES DE *FASCIOLA HEPATICA*.

Le parasite *Fasciola hepatica* est un trématode digénique hermaphrodite. Trois molécules intra-parasitaires ont une immuno-réactivité vis-à-vis d'anticorps anti-ecdysone. L'ecdysone et la 20-OH-ecdysone ont été

caractérisées par HPLC, la troisième molécule, plus polaire que la 20-OH-ecdysone n'a pas été caractérisée.

I.3. LES ECDYSTEROIDES DANS LES AUTRES PARASITOSES.

Chez les autres parasites, notamment chez les nématodes et les cestodes, des ecdystéroïdes ont été identifiés (*Panagrellus redivivus*, **ROGERS** (1973) - *Ascaris*, **HORN** et al.(1974) - *Aphelenchus avenae*, *Haemonchus contortus*, **DENNIS** et al. (1977) - *Dirofilaria immitis*, **MENDIS** et al. (1983), *Parascaris equorum*, **O'HANLON** et al. 1987, Revues: **KOOLMAN** et al.(1984) - **DAVEY** 1988). Des ecdystéroïdes exogènes agissent sur ces parasites, *in vitro*, à des concentrations variant de 10^{-2} à 10^{-11}M (revue: **REES** et al.(1984)). FLEMING et collaborateurs ont montré une corrélation étroite entre les pics d'ecdystéroïdes et les mues L3 et L4 de nématodes en culture *in vitro* (**FLEMING**, 1985). Dans leurs expériences, des conjugués ont été dosés pendant les quinze premiers jours de culture du parasite avec des pics à J6 et J9, suggérant un rôle des ecdystéroïdes dans l'embryogenèse et dans la formation des tannins de l'oeuf de ces parasites (**FLEMING**, 1985, 1987).

I.4. ROLE DES ECDYSTEROIDES PARASITAIRES.

En dehors des effets morphologiques où du rôle potentiel des ecdystéroïdes dans la reproduction des parasites (vitellogenèse, gamétogenèse), aucun rôle biologique pour ces hormones n'est décrit dans la littérature. La présence de S.O.D chez *schistosoma mansoni* et son étroite relation avec les ecdystéroïdes parasitaires serait une première fonction pour ces hormones dans un modèle parasitaire. Il faut noter que la présence d'enzymes SOD a été décrite dans d'autres modèles parasitaires : *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium*[1], *Entemoeba histolotica*, *Leishmanies*, *Trypanosomes*, *Hymenolepis diminuta*, *Monieza expansa*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Fasciola hepatica* (Revue: **DOCAMPO R.** et **MORENO S.N.J.** 1984). Chez *S.mansoni*, bien que nous n'ayons pu affiner la caractérisation de cette enzyme, le comportement électrophorétique de la SOD est différente pour le parasite et pour l'hôte infesté. Cette différence a été

1: Une attention particulière pour le protozoaire *Plasmodium berghei* qui possède une SOD distincte de celle de l'hôte infesté (**FAIRFIELD** et al.1983).

expérimentalement confirmée depuis par d'autres équipes [2]. Quoi qu'il en soit, il est plus opportun d'adopter l'idée d'un rôle physiologique des ecdystéroïdes du à une balance hormonale plutôt que par la présence individuelle des hormones elles-mêmes.

I.5. LES ANTICORPS ANTI-HORMONES.

L'une des acquisitions les plus surprenantes de ces travaux sur les hormones ecdystéroïdes parasitaires, est l'observation d'une action cytotoxique d'anticorps anti-ecdysone vis-à-vis des schistosomes. En d'autres termes, nous apportons des éléments expérimentaux qui ouvrent de nouvelles perspectives dans l'approche immunologique : 1/ Possibilité d'utiliser des anticorps non pas dirigés contre des épitopes protéiques mais dirigés contre des carbohydrates, même de petite taille, 2/ Utilisation d'anticorps dirigés non pas contre des molécules permanentes à la surface du parasite mais contre des structures excrétées par un métazoaire voire une cellule. En ce qui concerne les schistosomes, en dehors de l'observation au microscope de la perte du tégument externe du parasite, nous n'avons aucun élément expérimental expliquant les mécanismes d'action de ces anticorps.

2: Utilisation de la SOD des schistosomes à des fins vaccinales.

II - ECDYSTEROIDES EXCRETEES.

II.1 DEMI-VIE D'ECYSTEROIDES COMMERCIALES.

II.1.1 Dans le sérum.

La présence des schistosomes dans le système vasculaire de l'hôte nous a conduit à étudier le comportement des ecdystéroïdes dans ce compartiment biologique.

La courbe de disparition d'un mélange d'ecdysone et de 20-OH-ecdysone commerciale injecté par voie sanguine à des hamsters sains est une exponentielle vraie. Le temps de demi-vie de ces deux hormones est de l'ordre de 45 minutes.

Des travaux récents sur la cinétique de disparition de l'ecdysone exogène chez la souris ont été rapportés mais avec des routes d'injection différentes des nôtres (sous-cutanée dorsale et intra-péritonéale) (**LAFONT** et al. 1988). Dans ces expériences, l'ecdysone tritiée est rapidement éliminée de l'animal. Dix minutes après l'injection, une fraction de l'ecdysone passe transitoirement dans le foie de l'animal puis une heure après l'injection l'hormone est pratiquement absente du foie pour être principalement intestinale. L'analyse en HPLC des ecdystéroïdes intestinaux et fécaux montre que 65% de l'ecdysone a été convertie en 14-déoxy-ecdysone, vraisemblablement par la flore bactérienne intestinale. Dans le sang, l'ecdysone n'est détectable que pendant les 30 minutes qui suivent l'injection confirmant ainsi la présence brève de l'ecdysone dans ce compartiment.

II.1.2 Dans les urines.

La courbe représentative de l'élimination dans les urines du mélange ecdystéroïde est la résultante de deux exponentielles. L'une a une demi-vie brève de 16h, l'autre à demi-vie longue de 11 jours.

Ces résultats suggèrent au moins deux destinées pour l'ecdysone: une absorption puis un relargage de l'hormone.

Par analogie avec les métabolismes de molécules exogènes, l'hypothèse d'un cycle entéro-hépatique peut expliquer nos résultats.

La première cinétique correspondrait à la rétention des ecdystéroïdes dans les cellules intestinales et les cellules hépatiques. La deuxième partie de la courbe correspondrait au relargage de l'ecdysone par ces cellules.

Ce relargage devrait conduire l'ecdysone du foie au rein via le sang. Un tel schéma aurait dû mettre en évidence une exponentielle bi-phasique dans le sérum. Cette deuxième cinétique n'a pas été appréhendée dans nos délais d'observation.

Il ne faut pas perdre de vue le fait que des expériences dites "de charge" ont été effectuées en utilisant des doses non physiologiques d'hormones[3]. Tout produit ayant son seuil de toxicité nous ne sommes pas certains d'avoir travaillé sous ce seuil. Effectivement, nous avons observé que des injections d'ecdysone à 10^{-4}M et 10^{-3}M provoquent la mort des hamsters par anurie et que certains d'entre eux présentaient des troubles neurologiques.

Quoi qu'il en soit, ces expériences permettent d'accéder à un ordre de grandeur du temps de demi-vie des hormones ecdystéroïdes dans le sérum et les urines de vertébrés.

3: En prenant pour référence, les taux sériques d'hormones ecdystéroïdes observés dans une infestation naturelle.

II-2. CINETIQUE DES ECDYSTEROIDES PARASITAIRES CHEZ L'HOTE.

II-2.1 CHEZ LES RONGEURS

II-2.1.1 Infestation par des Trématodes.

II-2.1.1.1 Ecdystéroïdes sériques.

Des hamsters infestés par le parasite *Schistosoma mansoni* présentent précocement, dès le sixième jour d'infestation, des carbohydrates sériques immunoréactifs avec des anticorps anti- ecdysone.

Chez cet hôte permissif pour la schistosomiase, la forme générale de la cinétique est une courbe "en plateau". D'autres groupes ont confirmés cette cinétique en plateau, notamment celui de KILICI (Marseille - non publié).

En revanche, chez un hôte semi-permissif comme le rat, les ecdystéroïdes sériques diminuent progressivement dès la période 6-10 jours après l'infestation quelque soit la charge parasitaire. Ceci suggère que les parasites se développent anormalement et que leurs fonctions physiologiques sont altérées.

Si l'on considère les ecdystéroïdes comme une molécule clé de la physiologie des trématodes, ces observations pourraient apporter un paramètre supplémentaire à la notion de susceptibilité vis-à-vis d'une infestation parasitaire.

L'hypothèse séduisante serait que le parasite ne pourrait trouver chez son hôte définitif les précurseurs indispensables à la synthèse de ses ecdystéroïdes. En conséquence, il y aurait des taux insuffisants de protéines parasitaires ecdystéroïde-induites. Sachant que certaines d'entre-elles sont impliquées dans les mécanismes de défense des vers, le parasite ne pouvant faire face à l'environnement hostile de l'hôte serait rejeté.

A cet égard, les résultats obtenus dans les expériences de transferts passifs effectués par CIOLI (CIOLI et al. 1977) pourraient être interprétés de cette façon. Dans ce cas, l'absence de bons précurseurs hormonaux chez le rat pourrait être responsable de la dégénérescence des parasites et de

leur rejet effectif par les mécanismes immunologiques; phénomène progressif et réversible, puisqu'un nouveau transfert chez un hôte permissif permet aux parasites de reprendre un développement normal. Il n'est pas certain que les mécanismes immunologiques du rat soient seuls entièrement responsables du rejet naturel des parasites. Des travaux récents montrent que des rats thyroïdéctomisés ne sont plus capables de rejeter la population parasitaire et deviennent en quelque sorte des hôtes permissifs (**KNOPF** et al. 1980, 1985).

II-2.1.1.2 Ecdystéroïdes tissulaires.

Chez des hamsters infestés par *S.mansoni*, des ecdystéroïdes sont détectables dans le foie, les testicules, les reins, les poumons et le cerveau. Les autres tissus n'ayant pas été analysés. Le foie contient la majorité des ecdystéroïdes excrétées. Ces résultats confortent l'hypothèse d'un cycle hépatique de l'ecdysone évoqué précédemment.

Deux groupes d'hormones y sont présentes: les ecdystéroïdes polaires (méthanol soluble) et apolaires (hexane soluble) mais l'identification chimique n'a pas été poursuivie.

Après chimiothérapie au Praziquantel[R] qui agit sur les téguments du parasite, globalement, la cinétique des ecdystéroïdes présente un pic à +J4 post-thérapie. Ce sont les quantités très importantes d'ecdystéroïdes contenues dans le foie qui gouvernent l'allure générale de la cinétique. En rapprochant cette courbe à la cinétique de disparition des schistosomes après une chimiothérapie au Praziquantel[R], où la lyse des vers est effective à +J4 (**MOLONEY** et al. 1987), l'augmentation brutale des ecdystéroïdes tissulaires à cette date pourrait être indirectement liée à cette lyse parasitaire. Plus exactement, on pourrait considérer que le parasite accroit sa production d'hormones ecdystéroïdes afin d'augmenter le taux de ses protéines ecdysone-induites impliquées dans ses mécanismes de défense.

Cette augmentation importante et transitoire d'ecdystéroïdes suivie d'une diminution correspondrait en quelque sorte à une réaction ultime de défense du parasite pour contre-carrer un mécanisme biologique qui tendrait à le détruire.

Ce concept pourrait être également valable pour les cinétiques sériques.Des dosages d'ecdystéroïdes circulantes effectués sur des rats en cours de vaccination confortent ce concept (**BOULANGER** et al. 1988, résultats non publiés): Les rats effectivement vaccinés en fin d'expérimentation présentent ce type de cinétique alors que des rats témoins ou des rats dont l'immunisation est inefficace présentent la cinétique caractéristique des ecdystéroïdes sériques chez des animaux semi-permissifs telle que nous l'avons décrite précédemment

Il est, me semble t-il, plus important de considérer l'allure générale des cinétiques de présence[4] des ecdystéroïdes que d'attacher une importance excessive au temps exact auquel se situe le pic hormonal résultant de la lyse des parasites.

II-2.1.2. Infestation par des Nématodes.

II-2.1.2.1 *Brugia malayi.*

Des rats *Mastomys natalensis* infestés par *B.malayi* présentent des ecdystéroïdes dans leur sérum dès la fin de la première semaine après infestation. Cette apparition est effective trois mois avant la présence de la microfilarémie circulante.

Pendant la première année après l'infestation où nous avons suivi l'évolution du taux hormonal, quatre pics d'ecdystéroïdes sériques sont observables. Ils correspondent aux deux mues larvaires des filaires , L3-L4, ainsi qu'aux deux poussées de ponte des microfilaires. En toute rigueur, les pics d'ecdystéroïdes précédent les pics de microfilarémie circulante, fait qui est en accord avec la notion: "variations du taux d'ecdystéroïdes - effets biologiques".

Dans ce modèle nématode, la cinétique d'apparition des ecdystéroïdes sériques peut être globalement assimilée à une "courbe en plateau", comme l'est celle des ecdystéroïdes sériques d'un modèle permissif infesté par des trématodes.

4: Pris au sens large, c'est à dire aussi bien une cinétique d'apparition que de disparition.

La cinétique des antigènes circulants dosés par la technique 2S-IRMA[5] (LUTSCH et al.1987) n'est pas superposable à celle des ecdystéroïdes. L'apparition des antigènes circulants est beaucoup plus tardive que les hormones parasitaires et se situe autour du 50ème jour post-infestation. Le dosage des ecdystéroïdes, possible dès le 7ème jour, semble être aussi dans les filarioses un excellent marqueur biologique précoce de l'infestation.

II-2.1.2.2 Infestation par *Dipetalonema vitae*

La présence d'ecdystéroïdes dans le sérum de hamsters infestés par *D.vitae* indique que les ecdystéroïdes sériques ne sont pas restreintes aux seules filaires *B.malayi.*

Néanmoins, un certain nombre de différences "apparentes" existent puisque chez *D.vitae* les ecdystéroïdes n'ont pu être détectées qu'à la période de ponte des microfilaires (J63).

"Apparentes" car l'évolution de notre technique d'analyse des hormones ecdystéroïdes, à la fois nouvelle génération d'anticorps anti- ecdysone et nouvelle technique de dosage (tubes coatés), ne permet pas de comparer les résultats. Bien qu'il me soit impossible de refaire avec cette nouvelle technique tous les dosages déjà effectués, ces différences pourraient être interprétables. En effet, la génération actuelle d'anticorps reconnait mieux la famille ecdystéroïde. Sachant que les sérums renferment des molécules polaires et apolaires (libres ou conjuguées) on peut raisonnablement penser que l'ancien dosage ne se positivait que pour des taux relativement plus élevés d'ecdystéroïdes, donc ne détectait les molécules qu'aux périodes des pics hormonaux.

5:."two-site immunoradiometric assay", dosage radio-immunologique simultané de 2 épitopes

II-2.2 CHEZ LES PRIMATES.

II-2.2.1 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 concernant les ecdystéroïdes sériques chez les rongeurs sont parfaitement transposables aux primates *Patas patas*.

La courbe d'apparition des ecdystéroïdes sériques est de même type que celle observée chez des rongeurs "permissifs", c'est-à-dire une courbe en plateau avec rétention d' ecdystéroïdes. Cependant, le "plateau" est atteint plus tardivement que chez les rongeurs, peut être en raison du volume beaucoup plus important du compartiment sérique chez un primate.

Fait particulièrement intéressant, la détection d'hormones ecdystéroïdes sériques est possible même en l'absence d'oeufs dans les fèces. Bien que le rôle des ecdystéroïdes dans la reproduction des schistosomes ne soit pas expérimentalement démontré, cette observation pourrait suggérer que l'ecdysone, au delà d'une certaine concentration, exercerait un effet régulateur sur la ponte des parasites femelles. A cet égard, les travaux de **CHEEVER** (et al.1972) montrent qu'une forte infestation du singe Rhésus par 500 à 600 cercaires provoque à terme une diminution du nombre d'oeufs émis dans les fèces comparativement à des singes infestés par seulement 100 cercaires. Par ailleurs, il existe de nombreuses expériences biologiques réalisées chez les insectes où en augmentant les taux en hormones ecdystéroïdes on inhibe les mécanismes biologiques qui sont normalement connus comme étant induits par ces hormones.

II-2.3. CHEZ L'HOMME

L'ensemble des travaux effectués sur les ecdystéroïdes, nous conduit a considérer les ecdystéroïdes, en dehors de toutes considérations financières, comme un marqueur biologique d'infestation par des helminthes.

II-2.3.1 PATIENTS INFESTES PAR DES TREMATODES.

II-2.3.1.1. Cinétique de disparition des ecdystéroïdes urinaires.

L'analyse d'urines de jeunes bilharziens, infestés par le parasite *Schistosoma haematobium*, révèle la présence d'hormones ecdystéroïdes. Après traitement par une chimiothérapie spécifique (Oltipraz^R) les ecdystéroïdes urinaires diminuent de manière significative dès le 4ème jour après la chimiothérapie.

Dans cette situation humaine, nous retrouvons l'allure générale d'une cinétique décroissante d'ecdystéroïdes résultant d'une lyse parasitaire comme nous l'avons décrit pour les modèles expérimentaux. Le protocole expérimental et les difficultés de collecte des urines en brousse ne permettent pas de sérier l'apparition du pic hormonal caractéristique de la destruction des parasites par l'oltipraz^R. Ce pic se situe avant J+4 dans cette expérimentation humaine.

Les vertébrés ne synthétisent pas d'hormones ecdystéroïdes et dans notre contexte pathologique seuls les parasites en possèdent. Il faut donc admettre qu'une source possible d'ecdystéroïdes sont les parasites eux-mêmes. D'autres auteurs, ayant initialement obtenus des dosages négatifs alors que nous présentions nos premières cinétiques chez l'homme, ont émis l'hypothèse d'une interférence avec les ecdystéroïdes d'origine alimentaire. Dans ce cas, pour atteindre les taux très importants retrouvés chez les malades et compte tenu du temps de demi-vie de la molécule chez les vertébrés, l'alimentation devrait contenir une quantité importante d'ecdystéroïdes. Ce concept d'ecdystéroïdes d'origine alimentaire n'explique pas les différences observées entre les taux hormonaux sériques de sujets sains et parasités.

La présence d'hormones ecdystéroïdes dans les sérums humains soulèvent deux remarques:

1/ Sur un plan conceptuel, nous apportons la première démonstration d'une excrétion d'hormones ecdystéroïdes par un invertébré dans une situation naturelle. En tenant compte des remarques précédentes, on

pourrait alors, dans un contexte général, redonner une définition appropriée des ecdystéroïdes parasitaires: sont-elles des hormones ou des phéromones?

Je serai tenté de dire, que ce sont des hormones lorsqu'elles sont intra-parasitaires et des phéromones lorsqu'elles sont excrétées: En effet, la notion "d'hormone" fait référence à des molécules biochimiques synthétisées par une glande sécrétoire et agissant spécifiquement sur un tissu cible: c'est le cas des hormones parasitaires lorsqu'elles sont impliquées dans les processus morphologiques du vers. La notion de "phéromone" fait référence à des molécules biologiques synthétisées par un individu et agissant à distance sur un autre individu: Cela pourrait être le cas des hormones sériques dans leur effet sur la ponte des parasites femelles.

2/ Le modèle parasitaire pose le problème de la production des hormones ecdystéroïdes par les parasites: alors que les dosages "instantanés" au niveau parasitaire indiquent des taux de l'ordre de 10^{-12} à 10^{-15}M, l'expérience révèle uniquement chez les patients des taux urinaires et sériques de 10^{-9}M pour des volumes liquidiens d'au moins 5 litres. Si l'on tient compte du temps de demi-vie de la molécule de 16 h qui correspond à son élimination effective, comment expliquer des niveaux de synthèse aussi considérables?. Dans l'hypothèse d'ecdystéroïdes d'origine alimentaire comment expliquer que seuls les patients parasités contiennent des hormones en aussi grande quantité? Cette inadéquation entre les taux hormonaux, faibles dans le parasite et importants dans les liquides biologiques de l'hôte infesté, reste le problème le plus énigmatique de ce travail.

II-2.3.1.2. Polarité et identification chimique des ecdystéroïdes circulantes.

Le sérum représente un milieu biochimique particulièrement riche en molécules de toutes natures (enzymes, acides gras, esters gras, lipoprotéines...). Dans un tel environnement et compte tenu des fonctions hydroxyles des ecdystéroïdes pouvant être impliquées dans une réaction chimique, la présence d'ecdystéroïdes apolaires n'est pas surprenante.

Cependant, on observe une discordance entre la polarité des ecdystéroïdes sériques telle qu'elle apparait par les seules extractions aux solvants organiques et le R_f en gel de silice identique à l'ecdysone.

Ce fait expérimental a pu être observé tout au long de notre étude sur les ecdystéroïdes parasitaires excrétées, et cette anomalie est restée jusque là inexpliquée: pourquoi un passage sur support de silice modifie t-il la polarité et la réponse RIA des ecdystéroïdes ?.

Sachant que la silice n'est pas chimiquement inerte, l'hypothèse serait que les conjugués d'ecdystéroïdes présents dans les liquides biologiques de vertébrés seraient clivés au contact de la silice, ou, que le contact avec la silice déplacerait l'équilibre thermodynamique en faveur de la restitution du noyau ecdystéroïde libre. Chez les vertébrés, on sait que les conjugués stéroïdiens d'esters d'acides gras sont hydrolysables en chromatographie sur couche mince. Il pourrait en être de même au moins pour les conjugués d'acides gras des ecdystéroïdes.

Dans ce cadre, il n'est pas étonnant de voir apparaître dans une analyse poussée des ecdystéroïdes sériques, où des gel de silice sont utilisés, une majorité de noyau ecdysone comme l'indique l'étude de KOOLMAN. Cette équipe a effectivement caractérisé récemment par spectrométrie de masse la présence de molécules d'ecdysone dans le sérum de malades (**KOOLMAN** et al. 1986).

Compte tenu des observations précédentes, on peut simplement dire qu'il existe dans le sérum de ces malades parasités des conjugués d'ecdystéroïdes dont le noyau de base (core ecdystéroïde) est l'ecdysone.

En conséquence, l'extraction méthanolique seule, que nous utilisons, permet d'extraire tous les ecdystéroïdes sériques, qu'ils soient polaires ou apolaires. Par contre, l'utilisation de deux solvants organiques (méthanol-hexane) dont l'un extrait des molécules apolaires ou lipidiques, et l'analyse de la seule fraction méthanolique conduit à un résultat RIA négatif pour le sérum.

Historiquement, il faut savoir que le développement simultané du dosage des ecdystéroïdes et des hormones juvéniles a conduit les équipes de

recherche à effectuer ces deux dosages à partir du même échantillon biologique. L'extraction organique comprenait deux solvants: l'hexane pour l'extraction des hormones juvéniles apolaires et le méthanol pour l'extraction des ecdystéroïdes. Lorsqu'une seule des deux molécules était étudiée, ce mode d'extraction était utilisé et la phase organique "inintéressante" était jetée....d'où la publication, par d'autres équipes, de résultats différents des nôtres.

Dans les urines de bilharziens, la polarité des ecdystéroïdes résultant des extractions organiques et l'analyse des R_f sur gel de silice sont concordantes. Le pic majeur correspond à de la 20-OH-E. Ce fait est confirmé par l'analyse au spectrophotomètre de masse des ecdystéroïdes urinaires.

Compte tenu de l'important volume d'urine initial et de la concentration de l'échantillon pour l'analyse, il a été possible de mettre en évidence, dans cette même analyse au spectromètre de masse, trois autres ecdystéroïdes existant sous forme de traces dans une situation naturelle: Le 2-oxo-20-hydroxy-ecdysone ou le 3-oxo-20-hydroxy-ecdysone et le 5épi-20-hydroxy-ecdysone (résultats non publiés). En fait, l'analyse en chromatographie en phase gazeuse indique que d'autres molécules sont présentes mais l'identification chimique exacte n'a pas abouti.

Dans les infections par schistosomes, le dosage urinaire de la 20-hydroxy-ecdysone serait un excellent marqueur de l'infestation.

L'ensemble de ces résultats semble indiquer que les ecdystéroïdes parasitaires ne seraient pas présentes sous forme ecdysone ou 20-OH-E dans le sérum des malades, et vraisemblablement dans les tissus dont certains comme le foie sont riches en acide gras, mais liées à des structures apolaires de l'hôte. Au niveau rénal il y aurait restitution du "core ecdystéroïde" qui serait éliminé par les voies naturelles alors que le greffon chimique serait recyclé chez l'hôte vertébré.

II-2.3.2. PATIENTS INFESTES PAR DES NEMATODES.

Les sérums et les urines de patients atteints de filarioses[6] contiennent des ecdystéroïdes.

L'extraction organique d'extrait urinaire par l'hexane et le méthanol indique la présence d'ecdystéroïdes polaires comme c'est la cas pour les urines de bilharziens

L'analyse par H.P.L.C. et RIA des urines de filariens sur une extraction méthanolique révèle la présence de huit ecdystéroïdes polaires dont quatre molécules co-migrent avec la 20-hydroxy-ecdysone, l'inokostérone, la makistérone et l'ecdysone. Au moins quatre ecdystéroïdes polaires sont détectables mais l'identification chimique de ces molécules n'a pas été poursuivie. D'une façon générale, l'identification chimique des ecdystéroïdes n'est définitivement assurée que par une caractérisation par plusieurs techniques physico-chimiques (spectre IR, UV, spectrométrie de masse). Des expériences antérieures ont montrées que l'analyse HPLC d'ecdystéroïdes d'origine biologique, sur plusieurs phases différentes et avec des molécules acétylées, ne permet pas d'identifier avec certitude des molécules qui sont co-éluées avec les standards de référence (**GAILLET**, 1985). Toutefois, une co-élution avec un standard de référence indique que l'ecdystéroïde étudieé à une probabilité non négligeable d'être identique à ce standard.

Fait particulier, au moins deux des ecdystéroïdes urinaires sont co-éluées avec les ecdystéroïdes de l'insecte vecteur de la filariose: *Aedes aegypti*. La présence de tels marqueurs biologiques dans les urines de sujets filariens pourrait conduire à la mise au point d'un test diagnostic différentiel entre notamment les schistosomiases et les filarioses. A priori, il ne serait pas surprenant de voir émerger dans une étude plus détaillée des ecdystéroïdes urinaires ou sériques, dans différentes parasitoses, des hormones parasitaires spécifiques d'espèce.

Les autopsies de rongeurs ont démontrées que ces hormones étaient présentes, en particulier dans les testicules de l'hôte infesté. Il est difficile

6: Le diagnostic d'une filariose est établi sur les plans cliniques et parasitologiques.

de ne pas rapprocher ces faits des observations épidémiologiques mettant en évidence l'hypogonadisme de jeunes bilharziens mâles (**FAYEZ** et al.1973, **ABDEL-KADER** et al. 1972). Il serait cependant hasardeux d'essayer de trouver une corrélation directe entre le taux global en ecdystéroïdes et la pathologie. Nous avons vu que cette famille hormonale comporte plusieurs molécules et principalement des conjugués. Bien que la structure des hormones ecdystéroïdes ait quelques vagues analogies avec les hormones sexuelles humaines, il existe néanmoins des groupes fonctionnels et une structure caractéristique des ecdystéroïdes que des sites de reconnaissance protéique savent distinguer (récepteurs, anticorps, enzymes). Vouloir impliquer **directement** des ecdystéroïdes dans ces mécanismes de reconnaissance spécifique me semble hâtif. L'orientation thématique devra obligatoirement faire référence aux différents ecdystéroïdes présentes dans le milieu analysé et mettre en évidence une variation entre un seuil de présence d'un type particulier d'ecdystéroïdes et les désordres endocrines observés chez l'hôte. L'action première des hormones ecdystéroïdes se situant au niveau de l'ADN génomique (**GRONEMEYER** et al. 1980, **ASHBURNER** 1980), l'étude des interactions directes de ces hormones sur l'ADN génomique de l'hôte vertébré semble être plus indiquée.

L'effet biologique des hormones ecdystéroïdes sur le métabolisme des hydrates de carbone des mammifères a été rapporté depuis deux décennies. Cependant, les expérimentations publiées sont effectuées en absence de données pharmacologiques importantes de cette hormone d'invertébré chez un vertébré. Notamment, ces travaux ne tiennent pas compte du temps de demi-vie de cette famille hormonale dans un contexte particulier. Aussi, les résultats doivent être pris avec les réserves d'usage.

L'interaction entre les ecdystéroïdes et le métabolisme du glucose a été étudiée en utilisant des injections péritonéales de 0.5 mg/kg de 20-hydroxy-ecdysone (20-OH-E), soit une concentration finale chez une souris de 10^{-6}M, c'est-à-dire plus de mille fois plus que les taux d'ecdystéroïdes rencontrés dans une situation naturelle comme une parasitose. Dans ces conditions, l'injection de la 20-OH-E seule n'a aucun effet sur la glycémie de la souris saine. En revanche, l'injection de la 20-OH-E deux heures avant celle de glucagon diminue de 50% l'hyperglycémie sanguine provoquée par le glucagon. La 20-OH-E stimulerait aussi la gluconéogenèse (**YOSHIDA** et al. 1971). De même, les ecdystéroïdes diminuent le taux d'AMP cyclique et des

protéines Kinases-cAMP dépendantes au niveau du foie de souris (CATALAN et al. 1979).

CONCLUSIONS

Le parasitisme est un état d'équilibre entre le parasite et l'hôte qui doit l'héberger. Plus précisément, cet équilibre s'établit entre le système immunitaire du vertébré qui tend à tuer puis à rejeter la population parasitaire et le parasite qui doit se maintenir chez son hôte en évitant de le tuer.

L'adaptation d'un parasite, comme le schistosome, pour son hôte vertébré s'est affinée tout au long de ces 250 millions dernières années. Elle est initiée par le choix même de l'hôte définitif qui doit permettre et assurer aux parasites un développement physiologique normal. L'infestation de l'hôte définitif par un passage transcutané des cercaires est une sélection mécanique qui permet de distinguer deux familles de vertébrés: les hôtes permissifs et les hôtes non permissifs vis-à-vis de l'invasion par le parasite. Dans le cas des hôtes permissifs émerge une nuance selon la capacité qu'a, ou non, l'hôte définitif à rejeter totalement sa population parasitaire après une infestation. La notion de semi-permissivité et de permissivité au sens actuel de ses termes a été adoptée. Les immunologistes ayant très largement contribués à l'étude de l'interface hôte-parasite, la notion de semi-permissivité fut naturellement associée à l'existence de mécanismes immunologiques démontrés principalement *in vitro*, capables de tuer le parasite. Mais s'est-on soucié de savoir si chez ces hôtes dits semi-permissifs et indépendamment des mécanismes immunologiques qu'ils mettent en place, le parasite était dans un environnement favorable à son évolution?

Chez les vertébrés, comme chez les invertébrés, le système hormonal est démontré comme étant un élément primordial de la coordination des grandes fonctions biologiques d'un individu. Pour les hormones ecdystéroïdes, les études entreprises depuis plus de trente ans démontrent leur rôle capital dans le développement des invertébrés, principalement les insectes. Plus récemment, la synthèse d'hormones ecdystéroïdes non métabolisables, appelées improprement des anti-hormones, et leur utilisation expérimentale ont conduit à une disrégulation des fonctions endocrines des insectes et à leur mort; argument en faveur de l'importance des hormones ecdystéroïdes dans la physiologie de ces invertébrés et en l'absence de tous mécanismes immunologiques.

Les schistosomes sont aussi des invertébrés. A ce titre nous venons de démontrer qu'ils contiennent plusieurs hormones ecdystéroïdes identifiées sur la base des analyses HPLC et RIA comme étant l'ecdysone et la 20-hydroxy-ecdysone. Comme chez les insectes, ces hormones sont présentes à tous les stades du développement parasitaire et sont sujettes à des variations qualitatives et quantitatives pendant l'évolution du parasite chez son hôte définitif.

Sur le plan morphologique, la présence d'ecdysone est nécessaire au parasite pour accomplir sa mue au 11ème jour après l'infestation. Cet événement morphologique est également observé chez d'autres invertébrés où les crises cuticulaires sont sous la dépendance d'ecdystéroïdes. De même, sur le plan biochimique la présence d'enzymes comme les SOD sont sous le contrôle des hormones ecdystéroïdes. Sachant que ces protéines ecdystéroïdes-induites peuvent jouer un rôle important dans les mécanismes d'évasion du parasite, on conçoit que l'absence d'hormones ecdystéroïdes au sein du parasite conduit à leur dégénérescence. Du point de vue du biologiste, la semi-permissivité serait l'absence des bons précurseurs hormonaux, chez l'hôte définitif, indispensables au parasite pour sa physiologie.

Les parasites, notamment les schistosomes, quittent leur hôte intermédiaire avec des quantités importantes d'hormones ecdystéroïdes (ou des précurseurs). Après pénétration des cercaires chez l'hôte définitif et pendant les premiers jours qui suivent, ce stock doit assurer aux parasites une autonomie totale et un développement normal dans son nouvel habitat. Le jour d'apparition des hormones sériques, identique chez l'hôte permissif et semi-permissif, suggère qu'une "synthèse" de ses propres ecdystéroïdes à partir de précurseurs présents chez son hôte vertébré doit être initiée pendant cette période.

En plus du fait que la présence des hormones ecdystéroïdes a été étendue à la famille des plathelminthes trématodes, l'étude d'un modèle parasitaire comme les schistosomes, a permis de démontrer l'existence de deux données fondamentales: i) La possibilité qu'à un organisme biologique d'excréter des hormones ecdystéroïdes, ii) La faculté qu'ont des anticorps anti-hormones de tuer l'organisme métazoaire qui contient et qui excréte cette hormone.

La situation exceptionnelle que représente la présence d'une hormone d'invertébré chez l'homme parasité conduit à exploiter cette particularité à des fins cliniques. Dans les bilharzioses, comme dans les filarioses, le dosage sérique ou urinaire des ecdystéroïdes parasitaires permet d'évaluer l'efficacité thérapeutique d'une chimiothérapie. L'existence de marqueurs ecdystéroïdes, spécifiques d'un groupe parasitaire, ouvrirait la voie vers un nouveau moyen de diagnostic d'une infection parasitaire à un stade précoce de la maladie. "Stade précoce" où généralement les lésions organiques causées par les parasites sont mineures et réversibles, mais surtout "stade précoce" où les parasites sont plus sensibles aux agressions par des substances chimiques ou biologiques. Cette particularité est valable pour les schistosomiases (apparition en fin de 1ère semaine d'infestation) comme pour les filarioses (apparition aussi en fin de 1ère semaine d'infestation) à un stade où les antigènes circulants ne sont pas détectables par les méthodes diagnostiques. Cette efficacité du contrôle thérapeutique pourrait être suivie à la fois par la disparition des ecdystéroïdes urinaires ou sériques mais aussi par l'apparition d'un pic sérique consécutif au traitement.

L'ensemble de ces travaux, concernant les ecdystéroïdes parasitaires, est un tremplin permettant d'orienter les recherches sur une première fonction physiologique de ces hormones dans un contexte biologique en dehors de leur rôle quasi probable dans la morphogenèse parasitaire. La présence d'enzymes, comme les superoxides dismutases (SOD), dans les schistosomes est un fait particulièrement intéressant dans le contexte des mécanismes utilisés par le parasite pour échapper à une des formes de la réponse immune de son hôte (éosinophiles et macrophages). Nos travaux préliminaires sur les relations entre les SODs et les ecdystéroïdes montrent que ces enzymes sont inductibles par cette famille hormonale.

Cependant, un certain nombre de domaines thématiques reste sans réponse. A cet égard, la démonstration directe de la production d'hormones ecdystéroïdes par des invertébrés parasites reste à faire et satisferait trois curiosités :

- Le premier point est fondamental et capital. Il consisterait à connaître le précurseur réel des ecdystéroïdes chez les schistosomes. La réponse permettrait de mettre un terme à l'hypothèse d'une origine possible

d'ecdystéroïdes d'origine alimentaire pour le parasite. Cette question permettrait d'aborder le lieu de synthèse de l'ecdysone parasitaire et par voie de conséquence déboucherait sur la mise en évidence de nouvelles cellules productrices d'ecdysone. Ce type d'étude, bien que difficile reste accessible à un groupe de recherche spécialisé. En revanche les séquences de la biosynthèse des ecdystéroïdes chez des métazoaires parasites semblent inaccessibles pour au moins deux raisons importantes: i) difficulté du modèle parasitaire, ii) physiologie et anatomie présentant encore de nombreuses lacunes. Il faut rappeler que ce chapitre n'est pas encore clos chez les insectes alors que le modèle expérimental est beaucoup plus accessible et qu'il existe des cultures cellulaires (disques imaginaux, cellules Kc). Par analogie avec ce type de travaux menés sur un modèle insecte, il faudrait plusieurs milliards de schistosomes pour posséder des quantités suffisantes de matériel biologique.

- L'autre lacune est l'absence d'une identification chimique, par spectrométrie de masse, de la totalité des ecdystéroïdes excrétées (sériques et urinaires) dans les principales parasitoses d'intérêt médical. Il est certes vrai que notre étude montre la difficulté d'analyser des spectres de masse en l'absence de standards de référence, mais une telle analyse permettrait de connaître à la fois l'identité de ces molécules apolaires et polaires qui sont présentes dans le sérum ou les urines de patients et de posséder les hormones spécifiques à telle ou telle parasitose.

- Le mécanisme d'action des anticorps anti-hormones est totalement inconnu. Cette observation nouvelle sous-entend qu'il est possible d'obtenir une cytotoxicité avec des anticorps dirigés à la fois contre des structures non protéiques comme des hormones mais en plus contre des molécules présentes temporairement à la surface de métazoaires. Il est concevable de penser que ce concept soit applicable à une cellule qui excrète un métabolite. Cette notion, importante par les conséquences pratiques qu'elle recèle, devra faire l'objet d'une investigation plus vaste comprenant aussi bien des modèles métazoaires que protozoaires, mais également différentes cibles moléculaires qui permettront de mieux sérier le mécanisme d'action de ces anticorps. En ce qui concerne la schistosomiase, il semble évident qu'une immuno-prophylaxie ne devra pas s'appuyer sur un seul concept mais sur une stratégie qui consistera à atteindre simultanément plusieurs cibles parasitaires.

Sur le plan phyllogénétique enfin, les ecdystéroïdes ne semblent plus se limiter aux invertébrés supérieurs mais se présentent bien comme une famille hormonale commune à ce phylum.

BIBLIOGRAPHIE

A:

ABDEL-KADER, M.M; ABDEL AZIZ, M.T.; GOBBA, S.; GIRGIS, M.; FAYEZ, M.; EL SHEIKH, A.; EL GENGEHY, M.T. (1972) Acta Paediatr. Acad. Sci. Hung. **13(4)**: 359-365. Biochemical and endocrinological studies in parasite-infected patients with and without infantilism.

AGUI, N.; GRANGER, N.A.; GILBERT, L.I.; BOLLENBACHER, W.E. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76(11)**: 5694-5698. Cellular localization of the insect prothoracicotropic hormones: in-vitro assay for a single neurosecretory cell.

ASHBURNER, M. (1980) Nature **285**: 435-436. Chromosomal action of ecdysone.

ATKINSON, K.H.; ATKINSON, J. (1980) Nature **283**: 478-479. Biochemical basis for the continous copulation of the female *Schistosoma mansoni.*

B:

BARRABES, A.; DUONG, T.H.; COMBESCOT, C. (1979). C. R. Soc. Biol., **176**: 153-156. Effet de l'administration d'implants de testostérone ou de progestérone sur l'intensité de la parasitose expérimentale à *Schistosoma mansoni* du hamster doré femelle.

BARRABES, A.; DUONG, T.H.; REYNOUARD, F.; COMBESCOT, C. (1980). Annales de parasitologie (Paris), **55(6)**: 671-677. La parasitose expérimentale à *Schistosoma mansoni* du hamster doré. Etude de l'effet, sur l'intensité du parasitisme et sur le taux d'anticorps circulants après administration d'estradiol, de testostérone ou de progestérone.

BASCH, P.F. (1986) Comp. Biochem. Physiol. A., **83(1)** : 199-202. Immunocytochemical localization of ecdysteroids in the live history stages of *Schistosoma mansoni.*

BATAILLON, E. (1894) Revue Bourguignone de l'enseignement supérieur, **4**: 607-622.

BENNETT, J.L.; BUEDING, E. (1971). Comp. Biochem. Physiol., **39A (4)**: 857-867. Localization of biogenic amines in *Schistosoma mansoni.*

BENNETT, J.L.; BUEDING, E. (1973). Molec. Pharmacol., **9**: 311-319. Uptake of 5-hydroxytryptamine by *Schistosoma mansoni.*

BENNETT, J.L.; BUEDING, E.; TIMMS, A.R.; EMGSTROM, R.G. (1969). Molec. Pharmacol., **5(5)**: 542-545. Occurence and levels of 5-OH-tryptamine in *S.mansoni.*

BENNETT, J.L.; TRUMAN, J.W. (1985). Science, **229 (4708)**: 58-60. Steroid-dependent survival of identifiable neurons in cultured ganglia of the moth *Manduca sexta.*

BERG, E. (1953). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **80**: 83-85. Effect of castration in male mice of *S.mansoni.*

BERG, E. (1957). Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., **51(4)**: 353-358. Effect of castration and testosterone in male mice on *Schistosoma mansoni.*

BESSON, M.T.; CORDIER, G.; QUENNEDEY, B.; QUENNEDEY, A.; DELACHAMBRE, J. (1987). Cell Tissue Kinetics, **20(4)**: 413-425. Variability of ecdysteroid-induced cell cycle alterations in Drosophila Kc sublines.

BEYDON, P.; LAFONT, R. (1983). J. Insect Physiol., **29**: 529-533. Feedback inhibition of ecdysone production by 20-OH ecdysone in *Peris brassicae* pupae.

BOLLENBACHER, W.E.; AGUI, N.; GRANGER, N.A.; GILBERT, L.I. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **76(10)**: 5148-5152. In vitro activation of insect prothoracic glands by the prothoracicotropic hormone.

BOLLENBACHER, W.E.; GOODMAN, W.; VEDECKIS, U.; GILBERT, L.I. (1976). Steroids, **27**: 309-324. The in vitro synthesis and secretion of α-ecdysone by the ring glands of the fly, *Sarcophaga bullata.*

BOLLENBACHER, W.E.; SMITH, S.L.; WIELGUS, J.J.; GILBERT, L.I. (1977). Nature, **268**: 660-663. Evidence for an α-ecdysone cytochrome P450 mixed function oxidase in insect fat body.

BOLLENBACHER, W.E.; VEDECKIS, W.; GILBERT, L.I.; O'CONNOR, J.D. (1975). Dev. Biol. **44**: 46-53. Ecdysone titers and prothoracic gland activity during larval pupal development of *Manduca sexta.*

BOLLENBACHER, W.E.; ZVENKO, H.; KUMARAN, A.K.; GILBERT, L.I. (1978). Gen. Comp. Endocr., **34**: 169-179. Changes in ecdysone content during post embryonic development of the was moth *Galleria mellonella.*

BORST, D.W.; ENGELMANN, F. (1974). J. Exp. Zool., **189**: 413-418. In vitro secretion of α-ecdysone by prothoracic glands of a hemimetabolous insect, *Leucophae maderae.*

BRIGGS, M.H. (1972). Biochim. Biophys. Acta, **280**: 481-485. Metabolism of steroid hormones by schistosomes.

BRUMPT, E. (1936). Annales Parasitol., **XIV, n°6**: 341-351. Action des hôtes définitifs sur l'évolution et sur la sélection des sexes de certains helminthes hébergés par eux: Expériences sur des schistosomes.

BUEDING, E.; FISHER, J. (1982). J. Parasitol., **68** : 208-212. Metabolic requirements of schistosomes.

BUTENANDT, A.; KARLSON, P. (1954). Z. Naturforsch., **9b**: 389-391. Uber die isolierung eines Metamorphosehormons des Insekten in kristalliersierter Form.

BUTTNER, A. (1950). Annales de Parasitol., **XXV, n°4**: 297-307. Labilité particulière du sexe chez *S.mansoni* (Plathelminthe, trématode). Essai d'interprétation.

C:

CAPRON, A.; DESSAINT, J.P. (1987). in: Immune response in parasitic infections: Immunology, Immunopathology, and Immunoprophylaxis. Volume II: Trematodes and cestodes - E.J.L. Soulsby (Ed.) - CRC Press, Boca Raton, Florida. pp 1-33. Immunology of schistosomiasis.

CAPRON, A.; DESSAINT, J.P.; CAPRON, M.; BAZIN, H. (1975). Nature, **253**: 474-475. Involvement of specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *S.mansoni* schistosomules.

CARDINALI, D.P.; VACAS, M.I.; RITTA, A.M. (1981). Experientia, **37**: 203-204. A biphasic effect of estradiol on serotonin metabolism in rat pineal organ culture.

CATALAN, R.E.; ARAGONES, M.D.; MARTINEZ, A.M. (1979). Biochem. Biophys. Res. Commun., **89(1)**: 44-49. Effect of ecdysterone on the cyclic AMP-Protein Kinase system in mouse liver.

CATTO, B.A. (1981). Exp. Parasitol., **51**: 152-157. *Schistosoma mansoni:* Decarboxylation of 5 hydroxy tryptophan, L. Dopa and L. Histidine in adult and larval schsitosomes.

CATTO, B.A.; OTTESEN, E.A. (1979). Comp. Biochem. Physiol., **63(6)**: 235-242. Serotonin uptake in schistosomules of *Schistosoma mansoni.*

CHARLET, M.; GOLTZENE, F.; HOFFMANN, J.A. (1979). J. Insect Physiol. **25**: 463-466. Experimental evidence for a neuroendocrine control of ecdysone biosynthesis in adult females of *Locusta migratoria.*

CHEEVER, A.W.; POWERS, K.G. (1972). Bull. World Health Organization, **46**: 301-309. *Schistosoma mansoni* infection in Rhesus monkeys: Comparison of the course of heavy and light infections.

CHINO, H.; SAKURAI, S.; OHTAKI, J.; IKEKAWA, N.; MIYAZAKI, H.; ISHIBASCHI, M.; ABUKI, H. (1974). Science, **183**: 529-530. Biosynthesis of α-ecdysone by prothoracic glands in vitro.

CIANCIO, M.J.; WATSON, R.D.; BOLLENBACHER, W.E. (1986). Mol. Cell. Endocr., **44(2)**: 171-178. Competency of *Manduca sexta* prothoracic glands to synthesize ecdysone during development.

CIOLI, D.; BLUM, K.; RUPPEL, A. (1978). Exp. Parasitol., **45**: 74-80. *Schistosoma mansoni:* Relationship between parasite age and time of spontaneous elimination from the rat.

CIOLI, D.; DENNERT, G. (1976). J. Immunol., **117**: 59-65. The course of *Schistosoma mansoni* infection in thymectomized rats.

CIOLI, D.; KNOPF, P.; SENFT, A.W. (1977). Int. J. Parasitol., **7**: 293-294. A study of *Schistosoma mansoni* tranferred into permissive and non-permissive hosts.

CLARK, A.J.; BLOCK, K. (1959). J. Biol. Chem., **234(10)**: 2583-2588. Function of sterols in *Dermes vulpinus.*

CLAYTON, R.B. (1964). J. Lipid Res., **5**: 3-19. The utilization of sterols by insects.

CLEGG, J.A.; SMITHERS, S.R. (1968). Parasitology **58**: 111-128. Death of schistosome cercariae during penetration of the skin - II. Penetration of mamalian skin by *Schistosoma mansoni.*

CLOUGH, E.R. (1981). J. Parasitol., **67(4)**: 535-539. Morphology of reproductive organs and ogenesis in bisexual and unisexual transplants of mature *Schistosoma mansoni* females.

D:

DAVEY, K.G. (1988). In: Endocrinology of selected invertebrate types - H. Laufer & R.G.H. Downer (Eds) - Alan R. Liss Inc, New-York. pp 63-86. Endocrinology of nematodes.

DAVIES, P.; JACKSON, H. (1970). Parasitology, **61**: 167-176. Experimental studies on the chemosterilization of *Schistosoma mansoni.*

DELBECQUE, J.P.; LANZREIN, B.; BORDEREAU, C.; IMBODEN, H.; HIRN, M.; O'CONNOR, J.D.; NOIROT, C.; LUSHER, M. (1978). Gen. Comp. Endocr., **36**: 40-47. Ecdysone and ecdysterone in physogastric termite queens and eggs of *Macrotermes bellicosus and Macrotermes subhyalinus.*

DENIS, R.D.W. (1977) Int. J. Parasitol. **7**: 181-188. On ecdysone binding proteins and ecdysone like material in nematodes.

DOCAMPO, R.; MORENO, S.N.J. (1984). In: Free radicals in Biology. VOL. VI . W.A. Pryor (Ed.), Academic Press - New York. pp 243-288. Free-radical intermediates in the antiparasitic action of drugs and phagocytic cells.

E - F:

FAHRBACH, S.E.; TRUMAN, J.W. (1987). J. Neurobiol. **18(6)**: 497-508. Possible interactions of a steroid hormones and neural inputs in controlling the death of an identified neuron in the moth *Manduca sexta.*

FAIRFIELD, A.S.; MESHNICK, S.R.; EATON, J.W. (1983). Science, **221**: 764-766. Malaria parasites adopt host cell superoxide dismutase.

FALLON, A.; HAGEDORN, H.H.; WYATT, G.R.; LAUFER, H. (1974). J. Insect Physiol., **20**: 1815-1823. Activation of vitellin synthesis in the mosquito *Aedes aegypti* by ecdysone.

FAYEZ, M.; EL SHEIK, A.; AZIZ, S. (1973). J. Egypt. Med. Ass., **56(3)**: 207-214. Pituitary gonadal axis in parasited patients with and with no infantilism.

FEYEREISEN, R. (1977). C.R. hebd. Séanc. Acad. Sci., PARIS, **D 284**: 1831-1834. Cytochrome P450 et hydroxylation de l'ecdysone en ecdystérone chez *Locusta migratoria in vitro.*

FEYEREISEN, R. (1980). In: Progess in Ecdysone Research, (J.A. Hoffmann, Ed.) - Developments in Endocrinology, VOL. 7 Elsevier North Holland Biomedical Press. Ecdysteroid-protein interactions: Specificity of the ecdysteroid binding protein from *Locusta migratoria* haemolymph.

FEYEREISEN, R.; DURST, F. (1978). Eur. J. Biochem., **88**: 37-47. Ecdysterone biosynthesis: A microsomal cytochrome P450 linked ecdysone 20-monooxygenase from tissues of the african migratory locust.

FLEMING, M.W. (1985). Exp. Parasitol., **60(2)**: 207-210. *Ascaris sum*: A role of ecdysteroids in molting.

FLEMING, M.W. (1985). J. Exp. Zool., **233(2)**: 299-303. Steroidal enhancement of growth in parasitic larvae of *Ascaris sum* : A validation of a bioassay.

FLEMING, M.W. (1987). Comp. Biochem. Physiol., **87(3)**: 803-805. Ecdysteroids during embryonation of eggs of *Ascaris sum.*

FRIPP, P.I. (1947). Exp. Parasitol., **21**: 380-390. Histochemical localization of esterase activity in schistosomes.

G:

GAILLET, N. (1985). Thèse de Doctorat de Biologie et Physiologie animales. Lille N° 1285. Mise en évidence et rôle physiologique des ecdystéroïdes chez les néreïdiens (annelides polychètes).

GERASIMOVA, N.G., LEUTSKAYA, Z.K. (1983). Helminthologica, **20**: 81-88. On synthesis of steroids in helminths.

GIRARDIE, A. (1970). Bull. Soc. Zool., **95**: 783-802. Neurosécrétions cérébrales chez les acridiens.

GOLTZENE, F.; LAGUEUX, M.; CHARLET, M.; HOFFMANN, J.A. (1978). Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. **359**: 1427-1434. The follicule cell epithelium of maturing ovaries of *Locusta migratoria*: A new biosynthetic tissue.

GRONEMEYER, H.; PONGS, O. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**: 2108-2112. Localization of ecdysterone on polytene chromososmes of *Drosophila melanogaster.*

H:

HACHLOW, W. (1931). Arch. Entw. Mech. Org., 125: 26-49. Zur Entwicklungsmechanik der schmetter Linge.

HAGEDORN, H.H. (1983). In: Endocrinology of insects - Alan R. Liss, New-York. pp 271-304. The role of ecdysteroids in the adult insect.

HAGEDORN, H.H.; O'CONNOR, J.D.; FUCHS, M.S.; SAGE, B.; SCHLAGER, D.A.; BOHM, M.K. (1975). Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 72: 3255-3259. The ovary as a source of ecdysone in an adult mosquito.

HAMSPHIRE, F.; HORN, D.H.S. (1966). Chem. Commum., 2: 37-38. Structure of crustecdysone, a crustacean molting hormone.

HANAOKA, K.; HAGEDORN, H.H. (1980). In: Progress in Ecdysone research (J.A. Hoffmann, Ed.), Elsevier Amsterdam. pp 467-480. Brain hormone control of ecdysone secretion by the ovary in a mosquito.

HANAOKA, K.; OHNISHI, E. (1974). J. Insect Physiol., 20: 2375-2384. Changes in ecdysone titre during pupal adult development in the silkworm, *Bombyx mori.*

HETRU, C.; HORN, D.S. (1980). in: Progress in ecdysone research - J.A. Hoffmann (Ed.). Elsevier, Amsterdam. pp. 13-28.

HETRU, C.; LAGUEUX, M.; LUU, B.; HOFFMANN, J.A. (1978). Life Sci., 22: 2141-2154. Adult ovaries of *Locusta migratoria* contain the sequence of biosynthetic intermediates for ecdysone.

HETRU, Charles (1981). Thèse de Doctorat (Strasbourg). Contribution à l'étude de la voie de biosynthèse de l'ecdysone.

HIGASHI, G.I.; KREINER, P.W.; KEIRNS, J.J.; BITENSKY, M.W. (1973). Life Sci., **13**: 1211-1220. Adenosine 3'-5' cyclic monophosphate in *Schistosoma mansoni.*

HIRN, M.H.; HETRU, C.; LAGUEUX, M.; HOFFMANN, J.A. (1979). J. Insect Physiol., **25**: 255-261. Prothoracic gland activity and blood titers of ecdysone and ecdysterone during the last instar of *Locusta migratoria.*

HIRUMA, K. (1980). Gen. Comp. Endocr. **41**: 392-399. Possible role of juvenile hormone in the prepupal stages of *Mamestra brassicae.*

HIRUMA, K.; SHIMADA, H.; YAGI, S. (1978). J. Insect Physiol., **24**: 215-220. Activation of the prothoracic gland by juvenile hormone and prothoracicotropic hormone in *Mamesta brassicae.*

HOFFMANN, J.A.; CHARLET, M. (1985). Ann. Sci. Natur. Zool., **7**: 215-228. Les ecdystéroïdes chez les invertébrés.

HOFFMANN, J.A.; KOOLMAN, J.; BEYLER, C. (1975). C.R. Acad. Sci., Paris, **280**: 733-736. Rôles des glandes prothoraciques dans la production d'ecdysone au cours du dernier stade larvaire de *Locusta migratoria.*

HOFFMANN, J.A.; KOOLMAN, J.; KARLSON, P.; JOLY, P. (1974). Gen. Comp. Endocr., **22**: 90-97. Molting hormone titer and metabolic fate of injected ecdysone during the firth larval instar and in adult of *Locusta migratoria.*

HOFFMANN, J.A.; LAGUEUX, M.; HETRU, C.; KAPPLER, C.; GOLTZENE, F.; LANOT, R.; THIEBOLD, J. (1986). In: Advances in vertebrate reproduction 4. (M. Porchet, J.C. Andries & A. Dhainaut, Eds.) - Elsevier, Amsterzdam, New-York. pp 9-21. Role of ecdysteroids in reproduction of insects: A critical analysis.

HOFFMANN, J.A.; LAGUEUX, M.; HIRN, M.; DE REGGI, M.L.; GOLTZENE, F.; FEYEREISEN, R. (1976). Coll. Int. CNRS, Lille, pp 359-365. Evolution du taux des ecdysteroides chez les imagos mâles et femelles de *Locusta migratoria*.

HOFFMANN, J.A.; LAGUEUX, M.; HIRN, M.; DE REGGI, M.L.; GOLTZENE, F.; FEYEREISEN, R. (1975). Coll. Int. CNRS, LILLE. (M. Durchon Ed.), N° 215, CNRS PARIS. pp 359-365. Evolution du taux des ecdystéroïdes chez les imagos mâles et femelles de *Locusta migratoria*.

HORN, D.H.S.; WILKIE, J.S.; THOMSON, J.A. (1974). Experientia, **30**: 1109-1110. Isolation of ecdysone from the parasitic nematode *Ascaris lumbricoïdes*.

HUBBER, R.; HOPPE, W. (1965). Chem. Ber., **98**: 2403-2423. Zur chemie des Ecdysons. VI. Die Kistral und Molekùl. Strukturanalyse des Insekten verpuppungs hormons Ecdyson mit des automatiscerten Flatmolekùl methode.

I:

ICHIKAWA, M.; ISHIZAKI, H. (1963). Nature, **198**: 308-309.

ISAAC, R.E.; REES, H.H.; GOODWIN, J.W. (1981). Chem. Comm. 594-595. Isolation of ecdysone 3-acetate as a major ecdysteroid from the developping egg of desert locust.

ISHIZAKI, H.; SUZUKI, A. (1984). In: Biosynthesis, Metabolism and mode of action of invertebrate hormones. (J.A. Hoffmann & M. Porchet Eds.). Springer verlag, Berlin, New-York. pp 63-77. Prothoracicotropic hormones of *Bombyx mori*.

ITOH, K.; UENO, K.; NATORI, S. (1985). Biochem. J., **227(2)**: 683-688. Induction of selective phosphorylation of a fat body protein of *Sarcophaga bullata* peregrina larvae by 20-hydroxyecdysone.

ITOH, K.; UENO, K.; NATORI, S. (1986). J. Biochem., **100(2)**: 493-498. Identification of 30-kDa fat body protein of *Sarcophaga bullata* peregrina larvae selectively phosphorylated in the presence of 20-hydroxyecdysone as ribosomal protein S6.

J:

JOOSSE, J. (1988). Endocrinology of selected invertebrate types - H. Laufer & R.G.H Downer Eds. - Alan R. Liss Inc, New-York. pp 89-140. The hormones of molluscs

KAPLANIS, J.N.; WEIRICH, G.F.; SVOBODA, J.A.; THOMPSON, M.J.; ROBBINS, W.E. (1980). In: Progress in ecdysone research, J.A. Hoffmann (Ed.). Elsevier, Amsterdam. pp.163-186.

KARLSON, P. (1956). Ann. Sci. Natur. Zool., **18**: 125-136. Chemische Unterschungen über die Metamorphose Hormone der Insekten.

KARLSON, P.; HOFFMEISTER, H. (1963). Z. Physiol. Chem., **331**: 298-300. Zur Biogenese des Ecdysone - I - Um Wanderlung von cholesterin in Ecdyson.

KASSCHAU, M.R.; MANSOUR, T.E. (1982). Nature **296**: 66-58. Serotonin-activated adenylate cyclase during early development of *Schistosoma mansoni.*

KERB, U.; SCHULZ, G.; HOCKS, P. (1966). Helv. Chim. Acta, **49**: 1601-1606. Zur Synthese des Ecdysones. IV. Die synthese des natürlichen Haütungshormones.

KING, D.S. (1972). Gen. Comp. Endocr., **Suppl. 3**: 221-227. Metabolism of α-ecdysone and possible immediate precurssors by insects in vivo and in vitro

KING, D.S.; BOLLENBACHER, W.E.; BORST, D.W.; VEDECKIS, W.; O'CONNOR, J.D.; ITTYCHERIAH, P.I.; GILBERT, L.I. (1974). Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **71**: 793-796. The secretion of α-ecdysone by the prothoracic glands of *Manduca sexta in vitro.*

KING, D.S.; BOLLENBACKER, W.E.; BORST, D.W.; VEDECKIS, W.; O'CONNOR, J.D.; ITTYCHERIAH, P.I.; GILBERT, L.I. (1974). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **71**: 793-796. Secretion of α-ecdysone by the protoracic gland of *Manduca sexta* in vitro.

KING, D.S.; MARKS, E.P. (1974). Life Sci., **15**: 147-154. The secretion and metabolism of α-ecdysone by cockroach (*Leucophae maderae*) tissues in vitro.

KING, D.S.; SIDALL, J.B. (1969). Nature, **221**: 955-956. Conversion of α-ecdysone to β-ecdysone by crustaceans and insects.

KING, D.S.; SIDALL, J.B. (1974). In: Invertebrate Endocrinology and Hormonal Heterophylly. (W.T. Brudette Ed.), Springer-Verlag, New-York. pp 147-152. Biosynthesis and inactivation of ecdysone.

KNOPF, P.M.; LINDEN, T. (1985). J. Parasitol., **71(4)**: 422-426. Completion of *Schistosoma mansoni* life cycle in thyroidectomized rats and effects of thyroid hormone replacement therapy.

KNOPF, P.M.; SOLIMAN, M. (1980). Int. J. Parasitol., **10**: 197-204. Effects of host endocrine gland removal on the permissive status of laboratory rodents to infection by *Schistosoma mansoni.*

KOOLMAN, J. (1982). Insect Biochem., **12**: 225-250. Ecdysone metabolism.

KOOLMAN, J.; MOELLER, H. (1986). Insect Biochem. **16**: 287-291. Diagnosis of major helminthe infections by RIA detection of ecdysteroids in urine and serum.

KOOLMAN, J.; REUM, L.; KARLSON, P. (1979). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.,**600**: 1351-1355. 26-hydroxy-ecdysone, 20,26-dihydroxy-ecdysone and inokosterone, metabolites of ecdysone in the blowfly *Calliphora vicina*.

KOOLMAN, J.; SCHELLER, K.; BODENSTEIN, D. (1979). Experientia, **35**: 134-135. Ecdysteroids in the adult male blowfly *Calliphora vicina*.

KOOLMAN, J.; WALTER, J.; ZAHNER, H. (1984). In: Biosynthesis, Metabolism and mode of action of invertebrate Hormones (J.A. Hoffmann & M. Porchet Eds.), Springer verlag, Berlin. pp 323-330. Ecdysteroids in helminths.

KOPEC, S. (1922). Biol. Bull., **42**: 323-342. Studies on the necessity of the brain for the induction of insect metamorphosis.

L:

LAFONT, R.; BEYDON, P. SOMME-MARTIN, G.; BLAIS, C. (1980). Steroids, **36**: 185-207. High performance liquid chromatography of ecdysone metabolites applied to the cabbage butterfly, *Pieris brassicae*.

LAFONT, R.; GIRAULT, J.P.; KERB, U. (1988). Biochem. Pharmacol., **37(6)**: 1174-1177. Excretion and metabolism of injected ecdysone in the white mouse.

LAFONT, R.; KOOLMAN, J. (1984). In: Biosynthesis, Metabolism and Mode of action of invertebrate hormones (J.A. Hoffmann & M. Porchet Eds.), Springer Verlag Berlin. pp 196-226. Ecdysone metabolism.

LAFONT, R.; MAUCHAMP, B.; PENNETIER, J.L.; TARROUX, P.; DE HYS, L.; DELBECQUE, J.P. (1975). Experientia, **31**: 1241-1242. The α and β ecdysone levels in the insect haemoplymph. Correlation with developmental events.

LAGUEUX, M.; HARRY, P.; HOFFMANN, J.A. (19841). Molec. Cell. Endocr., **24**: 325-338. Ecdysteroids are bound to vitellin in newly laid eggs of *Locusta*.

LAGUEUX, M.; SALL, C.; HOFFMANN, J.A. (1981). Amer. Zool., **21**: 715-726. Ecdysteroids during embryogenesis in *Locusta migratoria*.

LAWSON, J.R.; WILSON, R.A. (1980). Parasitology, **81**: 325-336. Metabolic changes associated with the migration of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni* in the mammalian host.

LEHMANN, M.; KOOLMAN, J. (1986). Biol. Chem. Hoppe-seyler, **367(5)**: 387-393. The influence of forskolin on the metabolism of ecdysone and 20-hydroxyecdysone in isolated fat body of the blowfly *Calliphora vicina*.

LOEB, M.J.; BRANDT, E.P.; GIEBULTOWICZ, J.M.; WOODS, C.W. (1986). In: Advances in invertebrate Reproduction - 4. (M. Porchet, J.C. Andries & A. Dhainaut Eds.). Elsevier Amsterdam. pp 93-100. Endocrine regulation of the testes and of the spermatogenesis in insects.

LOEB, M.J.; WOODS, C.W.; BRANDT, E.P.; BORDOVEC, A.B. (1982). Science, **218**: 896-897. Larval testes of the tobacco budworm: A new source of insect ecdysteroïds.

LUTSCH, C.; CESBRON, J.Y.; ZAHNER, H.; CAPRON, A. (1987). Parasitol. Res., **74**: 191-195. Detection of circulating and urinary antigens in *Mastomys natalensis* experimentally infected with *Brugia malayi, Brugia pahangi or Litomosoïdes carinii.*

M :

MANGOLD, B.L.; DEAN, D.A. (1983). Amer. J. Trop. Med. Hyg., **32**: 785-789. Autoradiographic analysis of *Schistosoma mansoni* migration from skin to lungs in naïve mice.

MANSOUR, T.E. (1967) Fed. Proceed., **26(4)**: 1179-1185. Effect of hormones on carbohydrate metabolism of invertebrates.

MANSOUR, T.E. (1979). Sciences, **205**: 462-469. Chemotherapy of parasite worms: New biochemical strategies.

MANSOUR, T.E. (1984). Adv. Parasitol., **23**: 1-36. Serotonin receptors in parasitic worms.

MANSOUR, T.E.; SUTHERLAND, E.W.; RALL, T.W.; BUEDING, E. (1960). J. Biol. Chem., **235**: 466-471. The effect of serotonin on the formation of adenosine 3'-5' phosphate by tissue particles from the liver fluke, *Fasciola hepatica.*

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. (1969). J. Biol. Chem., **244(22)**: 6049-6055. Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein).

MENDIS, A.H.W., ROSE, M.E.; REES, H.H.; GOODWIN, T.W. (1983). Mol. Biochem. Parasitol., **25** : 61-71. Analysis of ecdysteroids in different stages of *Hymenolepis diminuta.*

MIZOGUCHI, A.; ISHIZAKI, H. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci, USA, **79** : 2716-2730. Prothoracic glands of saturnï moth *Samia cynthia ricini* possesses a circadian clock controlling gut purge timing.

MOLONEY, N.A.; HINCHCLIFFE, P.; WEBBE, G. (1987). Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., **81** : 247-254. Loss of resistance to reinfection with *Schistosoma japonicum* in mice after treatment with Praziquantel.

MONTPIED, P.; SOBRIER, M.L.; CHAPEL, S.; COUDERC, J.L.; DASTUGUE, B. (1988). Biochem. Biophys. Acta, **949(1)** 79-86. 20-hydroxyecdysone induces the expression of one beta-tubulin gene in Drosophila Kc cells.

N:

NAKANISHI, K.; KOREEDA, M.; SASAKI, S.; CHANG, M.L.; HSU, H.Y. (1966). Chem. Comm., **915**:

NIGG, H.N.; SVOBODA, J.A.; THOMPSON, M.J.; DUTKY, S.R.; KAPLANIS, J.N.: ROBBINS, W.E. (1976). Experientia, **32** :32 438-439. Ecdysone 20-hydroxylase from the midgut of the tobacco horn-worm *Manduca sexta*.

NIMMO-SMITH, R.H.; RAISON, G.G. (1968). Comp. Biochem. Physiol., **24**: 403-416. Mono-amine oxidase activity of *Schistosoma mansoni*.

NIRDé, Ph. (1982). Thèse de Doctorat de Biochimie Appliquée. Lille N° 1010. Hormones de *Schistosoma mansoni* et intezrface hôte parasite.

NIRDé, Ph. (1986). J. Autom. Chem. **3(1)** : 28-31. Treatment of superoxide dismutase by a regression method.

NIRDé, Ph. DE REGGI, M.L.; TSOUPRAS, G.; TORPIER, G.; FRESSANCOURT, P.; CAPRON, A. (1984). F.E.B.S.O Letters, **168(2)**: 235-240. Excretion of ecdysteroids as a marker of parasite infection.

NIRDé, Ph.; DE REGGI, M.L.; CAPRON, A. (1986). J. Chem. Ecol., **12(8)**: 1863-1884. (Review). Fundamental aspects and potential role of ecdysteroids in schistosomes: An update overview.

NIRDé, Ph.; TORPIER, G.; CAPRON, A.; DELAAGE, M.A.; DE REGGI, M.L. (1984). In: Biosynthesis, Metabolism and mode of action of Invertebrate hormones. (J.A. Hoffmann & M. Porchet Eds.) Springer verlag, Berlin. pp 331-337. Ecdysteroids in Schistosomes and host-parasite relationship.

NIRDé, Ph.; TORPIER, G.; DE REGGI, M.L.; CAPRON, A. (1983). F.E.B.S. Letters, **151(2)**: 223-227. Ecdysone and 20-hydroxy-ecdysone: New hormones for the Human parasite *Schistosoma mansoni.*

O:

OHANLON, G.M.; HOWARTH, O.W.; REES, H.H. (1987). Biochem. J., **248(1)**: 305-307. Identification of ecdysone 25-O-β-D-glucopyranoside as a new metabolite of ecdysone in nematode *Pascaris equorum.*

OHNISHI, E.; MIZUNO, T.; CHATANI, F.; IKEKAWA, N.; SAKURAI, S. (1977). Science, **197**: 66-67. 2-deoxy-α-ecdysone from ovaries and eggs of the silkworm *Bombyx mori.*

OHNISHI, E.; MIZUNO, T.; IKEKAWA, N.; IKEDA, J. (1981). Insect Biochem., **11**: 155-159. Accumulation of 2-deoxy-ecdysteroids in ovaries of the silkworm *Bombyx mori.*

P:

PHILLIPS, S.M.; REID, W.A.; BRUCE, J.I.; HEDLUNG, K.; COLVIN, R.C.; CAMPELL, R.; DIGGS, C.L.; SADUN, E.H. (1975). Cell. Immunol., **19**: 99-116. The cellular and humoral response to *Schistosoma mansoni* infections in inbred rats. I. Mechanisms during initial exposure.

PONGS, O. (1984). In: Biosynthesis, Metabolism and mode of action of Invertebrate hormones. (J.A. Hoffmann & M. Porchet Eds.), Springer Verlag, Berlin. pp 285-292. Ecdysteroid-related puffs and genes in *Drosophila melanogaster.*

PORCHERON, P.; CARUELLE, J.P.; BAEHR, J.C.; CABSIER, P. (1984). In: Biosynthesis, Metabolism and mode of action of invertebrate hormones. J.A. Hoffmann and M. Porchet (Eds.). pp 234-244. Ecdysteroids and integuments in locusts.

PORCHET, M.; GAILLET, N.; SAUBER, F.; CHARLET, M.; HOFFMANN, J.A. (1984). In: Biosynthesis, Metabolism and mode of action of Invertebrate hormones (J.A. Hoffmann & M. Porchet Eds), Springer Verlag, Berlin. pp 346-348. Ecdysteroids in annelids.

Q - R:

REES, H.H.; MENDIS, A.H.W. (1984). In: Biosynthesis, Metabolism and mode of action of Invertebrate hormones (J.A. Hoffmann & M. Porchet Eds.), Springer Verlag, Berlin. pp 328-345. The occurence and Possible physiological Significance of Ecdysteroids during Nematode and Cestode development.

RICHARDS, G.; LEPESANT, J.A. (1984). In: Biosynthesis, Metabolism and mode of action of Invertebrate hormones. (J.A. Hoffmann & M. Porchet Eds.), Springer Verlag, Berlin. pp 273-284. Ecdysteroid Regulation of the major transcripts of *Drosophila melanogaster* larval salivary glands.

ROBERT, A.; STRAMBI, A.; STRAMBI, C.; GONELLA, J. (1986). Life Sci., **39(26)**: 2617-2622. Opposite effects of ecdysone anf 20-hydroxyecdysone on in vitro uterus mobility of a tsetse fly.

ROBINSON, E.J. (1957). J. Parasitol., **43**: 59-61. A possible effect of testosterone on the development of *Schistosoma mansoni.*

ROBINSON, E.J. (1959). J. Parasitol., **45**: 295-299. Further studies on the effect of abnormal host metabolism on *S. mansoni.*

ROGERS, W.P. (1973). Parasitology **67**: 105-113. Juvenile and moulting hormones from nematodes.

ROGERS, W.P. (1982). The nature of parasitism, Academic Press. New-York.

ROMER, F.; EMMERICH, H.; NOWOOK, J. (1974). J. Insect Physiol., **20**: 1975-1987. Biosynthesis of ecdysone in isolated prothoracic glands and oenocytes of *Tenebrio molitor in vitro.*

S:

SABHA, G.H.; MALEK, E.A.; (1977). Am. J. Trop. Med. Hyg., **26(2)**: 331-333. Unisexual infection with *S.haematobium* in the white mouse.

SAVAKIS, C.; DEMETRI, G.; CHERBAS, P. (1980). Cell, 22: 665-674. Ecdysteroïd-inducible polypetides in a drosophila cell line.

SHAW, J.R. (1977). Exp. Parasitol., **41**: 54-65. *Schistosoma mansoni*: Pairing in vitro and development of females from single sex infections.

SHAW, J.R.; MARSHALL, I.; ERASMUS, D.A. (1985). Exp Parasitol, **42**: 14-20. *S.mansoni*: In vitro stimulation of vitelline cell development by extracts of male worms.

SHIMIZU, J.; MORIBAYASHI, A.; AGUI, W. (1985). Appl. Ent. Zool., **20**: 56-61. In vitro analysis of spermiogenesis and testicular ecdysteroids in the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*.

SMITH, W.A.; BOLLENBACHER, W.E.; COOPER, D.Y.; SCHLEYER, H.; WIELGUS, J.J.; GILBERT, L.I. (1979). Mol. Cell. Endocr., **15**: 111-133. Ecdysone 20-monooxygenase: Characterization of an insect cytochrome P450 dependent steroid hydrolase.

SMITH, W.A.; COMBEST, W.L.; GILBERT, L.I. (1986). Mol. Cell. Endocr., **47**: 25-33. Involment of cyclic-AMP-dependent protein Kinase in prothoracicotropic hormone-stimulated ecdysone synthesis.

T:

TAKEMOTO, T.; OGAWA, S.; NISHIMOTO, N. (1967). Yakuga Zasshi, **87**: 325. Studies on the constituents of *Achyrantis radix*. IV. Isolation of ecdysterone from the radix of *Achyrantis obtusifolia*.

TORPIER, G.; HIRN, M.H.; NIRDé, P.; DE REGGI, M.L.; CAPRON, A. (1982). Parasitology, **84**: 123-130. Detection of ecdysteroids in the human trematode *Schistosoma mansoni*.

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

TSOUPRAS, G.; HETRU, C.; LUU, B.; CONSTANTIN, E.; LAGUEUX, M.; HOFFMANN, J.A. (1983). Tetrahedron **39(10)**: 1789-1796. Identification and metabolic fate of ovarian 22-adenosine monophosphoric ester of 2-deoxyecdysone in ovaries and eggs of an insect, *locusta migratoria.*

TSOUPRAS, G.; HETRU, C.; LUU, B.; LAGUEUX, M.; CONSTANTIN, E.; HOFFMANN, J.A. (1982). Tetrahedron Letters, **23(19)**: 2045-2048. The major conjugates of ecdysteroids in young eggs and in embryos of *Locusta migratoria.*

V:

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

W - X - Y:

WATSON, R.D.; CIANCIO, M.J.; GUNNAR, W.P.; GILBERT, L.I.; BOLLENBACHER, W.E. (1985). J. Insect Physiol., **31**: 487-494. Regulation of insect prothoracic glands: Existence of a haemolymph stimulatory factor in *Manduca sexta.*

WATSON, R.D.; WHISENTON, L.R.; BOLLENBACHER, W.E.; GRANGER, N.A. (1986). Insect Biochem., **16**: 149-155. Interendocrine regulation of the corpora allata and prothoracic gland of *Manduca sexta.*

WEBB, R.A. (1988). In: Endocrinology of selected invertebrate types. (H. Laufer & R.G.H. Downer Eds.), Alan R. Liss Inc., New-York. pp 31-62. Endocrinology of acoelomates.

WEEKS, J.C.; TRUMAN, J.W. (1986). J. Neurobiol., **17(3)**: 249-267. Steroid control of neuron and muscle development during the metamorphosis of an insect.

WEIRICH, G.F.; SVOBODA, J.A.; THOMPSON, M.J. (1984). In: Biosynthesis, Metabolism and mode of action of Invertebrate hormones. (J.A. Hoffmann & M. Porchet Eds.), Springer Verlag, Berlin. pp 227-233. Ecdysone 20-Monooxygenase

WIGGLESWORTH, V.B. (1934). Nature, **125**: 726. Factors controlling moulting and metamorphosis in an insect.

WILLIG, A.; REES, H.H.; GOODWIN, T.W. (1971). J. Insect Physiol., **17**: 2317-2326. Biosynthesis of insect moulting hormones in isolated ring glands and whole larvae of *Calliphora*.

WILSON, R.A.; COULON, P.S. (1986). Parasitol., **92**: 83-100. *Schistosoma mansoni*: Dynamics of migration through the vascular system of the mouse.

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

YOSHIDA, T.; OTAKA, T.; UCHIYAMA, M.; OGAWA, S. (1971). Biochem. Pharmacol., **20**: 3263-3268. Effect of ecdysterone on hyperglycelia in experimental animals.

TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS 5

INTRODUCTION. 13

CHAPITRE I MODELES EXPERIMENTAUX.

I - 1 - LES SCHISTOSOMIASES. 19

I.1.1. GENERALITES 19

I.1.1.1. LE CYCLE PARASITAIRE. 19

I.1.1.2. ASPECTS CLINIQUES 22

I.1.2. INTERFACES HOTE-PARASITE. 23

I.1.2.1. HOTES SUSCEPTIBLES ET HOTES RESISTANTS. 23

Les hôtes permissifs 24

Les hôtes semi-permissifs 25

I.1.2.2. INFLUENCE DE LA PHYSIOLOGIE DE L'HOTE DEFINITIF SUR LE DEVELOPPEMENT PARASITAIRE 25

- Effet de la castration 26
- Effets d'hormones exogènes 26
- Effets de l'ablation de glandes endocrine de l'hôte 27

I.1.2.2.3. Stéroides métabolisés par *S.mansoni* 28

I.1.2.3. INFLUENCE DES PARASITES ENTRE EUX 28

I.1.3. LES NEUROTRANSMETTEURS. 29

Les Amines Biogènes 29
Les estérases. 30

I - 2. LES ECDYSTEROIDE CHEZ LES INSECTES. 31

I.2.1. GENERALITES 31

I.2.1.1. Rappels biologiques 31
I.2.1.2. Les hormones ecdysteroïdes 32

I.2.2. LES ECDYSTEROIDES CHEZ LA LARVE 35

I.2.2.1. Biosynthèse de l'ecdysone. 35
I.2.2.1.1. Initiation de la biosynthèse 37

I.2.2.2. Biosynthèse de la 20-OH-ecdysone 38
I.2.2.3. Rôles biologiques des ecdystéroïdes chez la larve 40

I.2.3. LES ECDYSTEROIDES CHEZ L'ADULTE 43

I.2.3.1. Biosynthèse de l'ecdysone ovarienne 44
I.2.3.1.1. Initiation de la biosynthèse 46

I.2.3.2. Rôles biologiques des ecdystéroïdes chez l'adulte 48

I.2.4. METABOLITES DES ECDYSTEROIDES. 48

CHAPITRE II : CALCULS INFORMATISES DES RESULTATS. 51

II.1. DOSAGE DES HORMONES ECDYSTEROIDES. 52

II.1.1. NECESSITE D'UN DOSAGE AUTOMATIQUE 52

II.1.2. ARCHITECTURE DU PROGRAMME 52

II.1.2.1. Courbe de référence 53
II.1.2.2. Interpolations linéaires 53
II.1.2.2.1. Etude mathématique d'une interpolation linéaire 53
II.1.2.3. Gestion de la bibliothèque de données 56

II.1.3. SOFTWARE 56

II.1.4. REALISATION PRATIQUE. 58

II.2. DOSAGE DE L'ENZYME SUPEROXIDE DISMUTASE 59

II.2.1. NECESSITE DE L'OUTIL INFORMATIQUE. 59

II.2.2. MODELE MATHEMATIQUE DU DOSAGE 59

II.2.2.1. Applications aux systèmes d'équations 61

II.2.3. DOSAGE DE LA SOD 62

II.2.3.1. Regression linéaire 62
II.2.3.2. Regression polynomiale. 64
II.2.3.3. Limites du modèle mathématique 65

II.2.4. SOFTWARE 66

II.2.5. PERTINANCE DU MODELE MATHEMATIQUE. 67

TRAITEMENT DU DOSAGE DE LA SOD PAR UNE METHODE DE REGRESSION 68

CHAPITRE III - NAISSANCE D'UNE THEMATIQUE. 72

DETECTION D'ECDYSTEROIDES CHEZ LE TREMATODE HUMAIN *Schistosoma mansoni.* 73

CHAPITRE IV - LES ECDYSTEROIDES PARASITAIRES 85

ECDYSONE AND 20-OH-ECDYSONE: DE NOUVELLES HORMONES POUR LE PARASITE HUMAIN PARASITE *SCHISTOSOMA MANSONI.* 87

ASPECTS FONDAMENTAUX ET ROLES POTENTIELS DES ECDYSTEROIDES DES SCHISTOSOMES: REVUE. 95

CHAPITRE V - LES ECDYSTEROIDES EXCRETEES 119

L'EXCRETION D'ECDYSTEROIDES COMME MARQUEUR D'UNE INFESTATION PARASITAIRE 121

DES ECDYSTEROIDES DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES DE VERTEBRES INFESTES PAR BRUGIA MALAYI 128

CHAPITRE VI : DISCUSSION 136

I. LES ECDYSTEROIDES PARASITAIRES. 137

I.1. LES ECDYSTEROIDES DE *SCHISTOSOMA MANSONI* 137
I.2. LES ECDYSTEROIDES DE *FASCIOLA HEPATICA* 137
I.3. LES ECDYSTEROIDES DANS LES AUTRES PARASITOSES 140
I.4. ROLES DES ECDYSTEROIDES PARASITAIRES 140
I.5. LES ANTICORPS ANTI-HORMONES 141

II. LES ECDYSTEROIDES EXCRETES. 142

II.1. DEMI-VIE D'ECDYSTEROIDES COMMERCIALES

II.1.1. Dans le sérum 142
II.1.2. Dans les urines 142

II.2. CINETIQUE DES ECDYSTEROIDES PARASITAIRES CHEZ L'HOTE 144

II.2.1. Chez les rongeurs 144

II.2.1.1. Infestation par des trématodes 144

II.2.1.1.1 Ecdystéroïdes sériques 144
II.2.1.1.2 Ecdystéroïdes tissulaires 145

II.2.1.2. Infestation par des nématodes. 146

II.2.1.2.1 *Brugia malayi* 146
II.2.1.2.2 *Dipetalonema vitae.* 147

II.2.2. Chez les primates 148

II.2.2.1 Chez le singe Patas patas 149

II.2.3. Chez l'homme 148

II.2.3.1. Patients infestés par des trématodes. 149

II.2.3.1.1. Cinétique de disparition des ecdystéroïdes urinaires. 149

II.2.3.1.2. Polarité et identification chimiques des ecdystéroïdes circulante 150

II.2.3.2. Patients infestés par des nématodes. 153

CONCLUSIONS 155

CONCLUSIONS GENERALES 156

BIBLIOGRAPHIE. 162

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 162

TABLES DES MATIERES 186

ANNEXE 192

Résumé 212

ANNEXE I:

La disquette 5'1/4 fournie avec le manuscrit est prête à l'emploi dans un système micro-ordinateur PC compatible (MS-DOS).

Cette disquette est formatée en 360 Ko, et comprend les programmes de dosage des ecdystéroïdes (soit par dialyse à l'équilibre, soit par tubes coatés) ainsi que les fichiers nécessaires au fonctionnement sous DOS. Par mesure de sécurité, tous les programmes sources sont ineffaçables, sauf par des informaticiens compétents.

La disquette est divisée en 2 parties logiques: La racine et les répertoires. Par analogie avec un livre, la racine serait la première page de la couverture de ce livre et les répertoires les différents chapitres à l'intérieur du livre. La présente disquette contient dans sa racine les fichiers AUTOEXEC.BAT et COMMAND.COM ainsi que les fichiers systèmes IO et BIOS. Un répertoire est déjà présent, celui qui contient les programmes et qui est appelé PROGRAM. La racine et ce répertoire **ne doivent pas être modifiés**. En conséquence, pour faire des duplicatas qui fonctionnent correctement, il faut utiliser le programme utilitaire "COPYWRIT" ou la commande "DISKCOPY".

Pour l'accès aux dosages radio-immunologiques, introduire la disquette dans le lecteur d'un système PC compatible et fermer le compartiment de la disquette. Pupitrer au clavier la lettre correspondant au nom du lecteur suivie du caractère ":". Pour un lecteur A, l'instruction est **A:**

Valider votre instruction en appuyant sur la touche "ENTREE" ou "ENTER" ou "RETURN" de votre clavier d'ordinateur. Cette touche fait passer l'instruction du clavier d'ordinateur vers son unité centrale qui exécutera la commande.

Pupitrer ensuite la commande AUTOEXEC puis valider votre entrée. Cette commande appelle le menu principal qui est dans la racine de la disquette et permet d'accéder aux programmes de dosage.

A ce stade, l'écran doit afficher le menu qui comporte 3 options notées de A à C.

A - pour faire un calcul de la quantité d'ecdystéroïdes à partir d'une dialyse à l'équilibre,

B - pour effectuer un calcul issu des tubes coatés,

C - pour quitter le programme après utilisation.

Après votre choix, A ou B, le logo Philippe NIRDE s'affiche puis le système demande si votre PC est connecté à une imprimante. Répondre N si votre ordinateur ne possède pas d'imprimante. Toutes les autres possibilités seront interprétées par le PC comme un système possédant une imprimante et le système identifiera automatiquement la sortie correspondante. Vous êtes maintenant dans le programme.

Le menu principal se présente sous la forme suivante:

```
Dosage Radio-Immunologique
Philippe NIRDE - Copyright 1987

Courbe de Référence                          1
Calculs de la quantité d'hormone             2
Rappeler une manip. ancienne                 3
Gestion des Répertoires                      4
Fin d'interrogation                          5

                    Réponse :
```

Au niveau de tous les menus de ce programme, l'option 5 permet de toujours revenir au niveau supérieur.

1/ **COURBE DE REFERENCE** (choix N°1):

Cette option permet l'accès à un menu de gestion de la courbe de référence qui permet à l'utilisateur:

1- De lire une courbe de référence existante

2- D'introduire une nouvelle courbe

3- De calculer les B/T correspondant à une incubation d'une courbe de référence.

2/ **CALCULS DE LA QUANTITE D'HORMONES** (choix N°2).

Cette option permet d'accéder aux calculs des quantités hormonales contenues dans un échantillon après incubation.

3/ **RAPPELER UNE MANIP. ANCIENNE** (Choix N°3).

Cette partie du programme permet de reprendre une expérience déjà effectuée (et enregistrée), soit pour l'imprimer si le système antérieur ne comprenait pas d'imprimante, soit calculer les quantités hormonales si la courbe de référence n'était pas prête, soit modifier les paramètres de l'échantillon (poids, dilution, homogénat) si une erreur a été commise lors de l'entrée de ces données.

4/ **GESTION DES REPERTOIRES** (Choix N°4).

Cette option permet de créer des "chapitres" sur la disquette comme nous l'avons expliqué précédemment. Cette possibilité est utile car elle permet sur une même disquette d'avoir un répertoire pour chaque expérience. Ces répertoires contiennent chacun leur propre courbe de référence et les dosages effectués dans les même conditions que la courbe de référence. Il est conseillé de ne pas donner de suffixe au nom des répertoires (Ceci pour permettre leur "listing" à l'écran). Un suffixe en "nomenclature informatique" correspond aux caractères alphanumériques qui suivent le premier point (au sens graphique) rencontré dans le nom d'un

répertoire ou d'un fichier. Par exemple, le mot TUB est considéré comme un suffixe dans "ECDY.TUB" parce qu'il est placé après un point alors que le nom "ECDY-TUB" ne comporte pas de suffixe.

I.1 - COURBE DE REFERENCE.

I.1.1. Lecture d'une courbe.

Pour lire une courbe référence sur la disquette, il faut indiquer au système le chemin qu'il doit prendre pour accéder à la courbe de référence. C'est à dire, lui indiquer le nom du lecteur et le bon "chapitre" ou répertoire.

A l'écran, les questions suivantes vous seront demandées:

QUESTION) "Sur quelle unité se trouve votre fichier ? "

L'ordinateur attendra que vous lui indiquiez le nom de l'unité où est enregistrée votre courbe de référence. Les réponses possibles pour les systèmes simples sont :

A pour le lecteur de disquette
B pour le lecteur de disquette
C pour un disque dur à l'intérieur du PC et non accessible physiquement par l'utilisateur.

REPONSE)- Répondre par la lettre correspondant à la configuration de votre PC. L'ordinateur comprendra indifféremment les lettres minuscules ou majuscules.

Le système affichera alors tous les répertoires contenus sur cette unité magnétique. Ils sont repérables sur un listing écran grâce à la façon dont ils sont écrits. Un répertoire PROGRAM sera listé PROGRAM <DIR> alors qu'un fichier PROGRAM sera listé PROGRAM

QUESTION) "Dans quel répertoire, si non 'RETURN' : ? "

L'ordinateur vous demande maintenant de lui indiquer le nom du "chapitre" ou du répertoire où se trouve votre courbe de référence.

REPONSE) Si la courbe de référence est dans le répertoire \DIALYSE la réponse pupitrée au clavier sera DIALYSE.

La courbe de référence apparaitra alors sur l'écran et si une imprimante existe vous pourrez conserver une trace écrite de cette courbe dans votre cahier de manip.

Pour ma part, après avoir "essuyé les plâtres" avec ce programme, j'ai adopté le principe qui consiste à créer un répertoire dont le nom commence toujours par les 4 premiers caractères du mois en cours, suivi par 4 autres caractères qui indiquent le jour de l'incubation et le type de dosage (DL pour dialyse et TB pour tubes coatés).

I.1.2 Introduction d'une nouvelle courbe.

Avant d'utiliser cette partie de programme, il vous faut les treize points qui constituent la courbe de référence: abscisse et ordonnée correspondantes.

QUESTION) "1 er point de la courbe: Valeur du B/T ? : "

REPONSE) Pupitrer la valeur du B/T en notation décimale. Par exemple 0.65 ou 0.650 ou .650 mais pas 0,65 (car l'ordinateur est anglo-saxon...). Valider le nombre par 'RETURN'. L'entrée des valeurs s'effectue en commençant par la partie de la courbe correspondant aux concentrations les plus faibles, donc aux B/T les plus élevés.

QUESTION) "log (Conc. mol. en Ecdys.) : ? "

REPONSE) Introduire la concentration correspondante d'ecdystéroïde. Par exemple -10.3 si c'est le point N°1 de la courbe. La valeur est le LOG de la concentration.

QUESTION) "Confirmation (O/N) ? "

REPONSE) Si votre réponse est erronnée répondre N pour NON, une seule lettre suffit, pour confirmer votre entrée concernant un point de la courbe. Toutes autres réponses sera considérée par le programme pour un OUI.

Après l'entrée des 13 points constituant votre courbe de référence, l'ordinateur vous demandera :

Question) "Coated tubes Ref : ? "
"Courbe entrée le : ? "
"Origine pour : ? "

La première question est relative au lot de vos "tubes ecdysone" (ou de vos Ag et AC dans le cas d'une dialyse) pour vous permettre de les identifier.

Réponse) L'origine de votre courbe de référence est normalement de :

-10.3 mais il existe des cas où votre courbe est déplacee vers les plus fortes concentrations, et cette option permet d'entrer la bonne courbe dans toutes les situations. Si l'origine semble incompatible avec un dosage d'hormones ecdystéroïdes, le programme le signalera et vous demandera de confirmer votre valeur si vous voulez la maintenir.

Ensuite, le listing de la courbe sera affiché sur l'écran, et si vous le désirez sur l'imprimante, avant l'enregistrement sur disquette.

I.1.3 Incubation de la courbe étalon.

Il y a des moments où le matériel a été "emprunté" et il nous fait cruellement défaut. Pour pallier cet inconvénient cette option remplacera votre calculatrice et calculera les B/T.

II.1 Calcul de la quantité d'hormones.

Le dosage à l'aide des tubes coatés est caractérisé par le fait que l'expérimentateur compte d'abord tous ces tubes pleins, puis tous les tubes vides. Ceci conduit à obtenir un premier listing numéroté, par exemple, de 1 à 100 qui correspond aux coups totaux (T) puis un deuxième listing aussi long que le premier correspondant aux coups liés (B). Le programme s'est adapté à cette particularité. Il demandera d'abord les CPM totaux puis les CPM liés, dans l'ordre d'apparition des CPM totaux.

Question) "Nombre de tubes à compter : ? "

REPONSE) Le programme est prévu pour des manip. n'excédants pas 100 échantillons. Votre réponse sera un nombre entre 1 et 100 inclus. Si une manip. comporte plus de 100 tubes, vous devez la fractionner en lot de 100 tubes au plus.

Ce pré-requis permet d'accéder à l'entrée de vos données expérimentales.

Question) " x èm Sample : CPM TOTAUX ? " ZZZZZZ

REPONSE) L'ordinateur affiche le nombre de CPM du tube précédent, x-1, et vous demande le nombre de coups dans votre tube numéro x. Entrer la valeur correspondante. Si le nombre de coups totaux de cet échantillon numéro x est le même que le précédent, x-1, pour n'avez pas à pupitrer ce même nombre ZZZZZ. En appuyant sur 'RETURN', le programme comprendra que ZZZZZ est également la valeur ce CPM du tube numéro x. Ce rappel de la valeur précédente sera utile aux utilisateurs qui ne comptent pas individuellement les CPM totaux pour chaque échantillon. Personnellement, je leur conseille vivement de compter chaque tube expérimental car des différences peuvent apparaitre d'un tube à l'autre.

Sur le bord droit de l'écran sera affiché les CPM totaux moyens. Cette valeur est donnée a titre indicatif pour détecter d'emblée les tubes qui sont à refaire.

Après chaque entrée numérique, l'ordinateur vous demandera de confirmer votre valeur avant de passer à l'échantillon suivant.

La fin de l'entrée des CPM totaux amène l'utilisateur à entrer les CPM correspondants aux CPM liés.

Question) "x èm Sample - CPM Totaux = ZZZZZ "

"CPM Liés : ? "

REPONSE) Pour permettre un repérage plus aisé, le programme affichera pour l'échantillon numéro x, la valeur de CPM totaux que vous lui avez déjà donnée. Il vous demandera ensuite d'entrer, pour cet échantillon la valeur de CPM liés. Entrer cette valeur. Ensuite vous entrerez le nom de l'échantillon (12 caractères au maximum) et vous confirmerez l'ensemble de ces nouvelles données.

Question) "Replicate : ? "

REPONSE) Cette question permet de connaitre le nombre de "duplicata" pour un même échantillon. Cette valeur aura son importance à l'affichage final des résultats car c'est grâce à elle que l'ordinateur calculera la quantité moyenne d'hormone contenu dans un échantillon. Si vous avez des double, répondre 2; si vous avez "tripliquez" votre manip, répondre 3.

BU LILLE

Question) "Titre de l'expérience "

" Incubation du (N° journée - date normale) : ? "

Réponse) Le titre de l'expérience est une donnée importante pour l'ordinateur car c'est à partir de cette donnée qu'il va automatiquement attribuer un nom à votre fichier qu'il enregistrera par la suite. Les cinq premiers caractères du titre seront retenus pour la constitution du fichier informatisé. Par exemple, si on pupitre le titre:

Sérum de sujets bilharziens

le titre du fichier correspondant commencera par : SERUM

Le problème apparait si le même jour j'ai une expérience dont le titre est :

Sérum de sujets Filariens

Dans ce dernier cas, le fichier informatisé commencera aussi par SERUM et il ne pourra pas être enregistré sur ma disquette. Pour tourner cette anomalie, il est préférable de donner comme titre:

F - Sérum de sujets Filariens

qui conduira à un début de nom de fichier FSERU

distinct du précédent.

En ce qui concerne la date, il est souhaitable de l'indiquer d'abord en nombre de jours écoulés depuis le début de l'année puis en clair. Ce qui donnera pour un 16 Décembre : 350 - 16 Décembre.

Question) " N° x: Homogénat = 2.50 " ?

REPONSE) Cette question est relative aux paramétres expérimentaux concernant l'échantillon N° x.

Homogénat correspond au volume de tampon dans lequel a été remis en suspension votre échantillon après évaporation à sec. Ce volume est exprimé en centaine de microlitres. Par exemple, entrer 2.50 pour 250 µl de tampon, entrer 0.50 pour 50 µl de tampon. Ici, cette valeur de l'homogénat est pré-programmée à 250 µl de tampon, c'est pour cela que l'ordinateur affiche 2.50.

Si pour **TOUS** vos échantillon vous avez la **MEME** valeur d'homogénat faire suivre ce nombre d'un astérisque. Par exemple 2.50*. Ceci évite de rentrer une longue suite de nombres identiques.

Si vos valeurs D'HOMOGENAT sont différentes, entrer les nombres correspondant au fur et à mesure qu'ils sont demandés par l'ordinateur.

QUESTION) " N° x : Poids = 1.00 ? "

REPONSE) Comme pour l'homogénat, le poids est exprimé en centaine de milligrammes. 1.00 indique que le poids de l'échantillon est 100 mg, 0.20 signifiera que l'échantillon pèse 20 mg. Ici également, l'astérisque en fin de nombre évite d'entrer une même valeur pour **tous** les autres échantillons qui suivent.

Après l'entrée de ces différents paramètres, le calcul est effectué et l'ordinateur affiche les résultats d'abord sur l'écran, puis les imprime si une imprimante est reliée au système. Le nom code de votre expérience est affiché sur le coin supérieur gauche de l'écran en vidéo inversée. Ce sera le nom du fichier relatif aux calculs en cours. Le suffixe correspond à l'année où est faite votre expérience précédée de la lettre C. Ce suffixe devrait vous permettre de différencier vos fichiers RIA des autres fichiers pouvant être sur votre disquette (ou sur disque dur) issus d'autres logiciels.

Dans les autres parties du programme les questions sont clairement posées et ne pose aucune difficulté si vous prenez le temps de lire correctement ce qui vous est demandé.

Par courtoisie, il est demandé aux utilisateurs de ce programme de bien vouloir mentionner dans la rubrique "remerciements" de leurs articles scientifiques la provenance et l'auteur de ce programme. Merci.

Liste des instructions BASIC du programme ecdystéroïdes.

```
10 CLS
20 ON ERROR GOTO 7640
30 PRINT "Le système est-il connecté à une imprimante ?"
40 X$=INPUT$(1)
50 IF ASC(X$)=78 OR ASC(X$)=110 THEN FLAGNO=1 ELSE FLAGNO=0
60 CLS
70 '------------------------ Programme ecdysteroids ------------------------
80 '                          Philippe NIRDE - 1987
90 DIM C$(25),DIAL$(50),G$(100),H$(5),N$(100),P$(100),R$(25),T$(10),BT(100,10)
,G(100),P(3,100),PU(100),Q(100),R(125),T(100),U(100),WIDE(2)
100 OPEN "O",#1,"SCRN:"
110 ECRAN=1
120 WIDTH #1,80
130 IF FLAGNO=1 THEN 230
140 IMPRN=2
150 PRINT "Allumer l'imprimante..."
160 OPEN "O",#2,"LPT1:"
170 WIDTH #2,100
180 PRINT "1 - Impression normale              2 - Impression condensée";
190 X$=INPUT$(1)
200 IF VAL(X$)<>2 THEN 230
210 PRINT #2,CHR$(15)
220 LPRINT CHR$(15)
230 MEMTP=62
240 J1=1
250 CLS
260 DEVICE=ECRAN
270 A$=""
280 KEY OFF
290 COLOR 0,7,0
300 LOCATE 1,22:PRINT #DEVICE,"                                    "
310 LOCATE 2,22:PRINT #DEVICE,"  Dosage Radio-Immunologique        "
320 LOCATE 3,22:PRINT #DEVICE,"  Philippe NIRDE - Copyright 1987   "
330 LOCATE 4,22:PRINT #DEVICE,"                                    "
340 COLOR 7,0,0
350 Y=8
360 LOCATE Y,10
370 PRINT "Courbe de Référence";TAB(60);"1"
380 LOCATE Y+2,10
390 PRINT "Calculs de la quantité d'hormone";TAB(60);"2"
400 LOCATE Y+4,10
410 PRINT "Rappeler une manip. ancienne ";TAB(60);"3"
420 LOCATE Y+6,10
430 PRINT "Gestion des Répertoires";TAB(60);"4"
440 LOCATE Y+8,10
450 COLOR 15,0,0
460 PRINT "Fin d'interrogation ";TAB(60);"5"
470 COLOR 7,0,0
480 LOCATE Y+14,30
490 PRINT "Réponse : ";
500 A$=INPUT$(1)
510 LOCATE Y+14,40
520 PRINT A$
530 LOCATE Y+13,20
540 IF VAL(A$)>0 AND VAL(A$)<6 THEN 610
550 PRINT "Vous n'avez pas utilisé de nombre....."
560 SOUND 150,10
570 LOCATE 23,20
580 PRINT "(Appuyer sur une touche pour continuer)"
590 A$=INPUT$(1)
600 GOTO 250
610 CLS
620 A=VAL(A$)
630 ON A GOSUB 910,2100,3510,650,4990
640 GOTO 250
650 CLS
660 PRINT "1 - Affichage des Répertoires     2 - Création d'un Répertoire
 - Sortir";
670 X$=INPUT$(1)
680 IF VAL(X$)<1 OR VAL(X$)>2 THEN 900
690 IF VAL(X$)=1 THEN 840
700 CLS
710 PRINT "Unité sur laquelle doit être créer le nouveau répertoire "
720 X$=INPUT$(1)
730 INPUT "Nom du Répertoire ";X1$
740 CLS
750 PRINT "Création du répertoire ";X1$;" sur ";X$;":  ?"
760 PRINT "Confirmation (O/N) ";
770 XX$=INPUT$(1)
780 IF ASC(XX$)=78 OR ASC(XX$)=110 THEN 700
790 CLS
800 PRINT "Création de ";X$+":"+"ç"+X1$+"  en cours..."
810 CHDIR X$+":"+"ç"
820 MKDIR X$+":"+X1$
830 GOTO 860
840 PRINT "Nom de l'unité disque à afficher ";
850 X$=INPUT$(1)
860 FILES X$+":"
870 LOCATE 23,1
880 PRINT "Appuyer sur une touche pour continuer....";
890 X$=INPUT$(1)
900 RETURN
910 '------------------------ courbe de référence ------------------------
920 CLS
930 Y=6
940 COLOR 15,0,0
950 PRINT #DEVICE,TAB(20);"                                    "
960 PRINT #DEVICE,TAB(20);"  GESTION DE LA COURBE DE REFERENCE "
970 PRINT #DEVICE,TAB(20);"                                    "
980 COLOR 7,0,0
990 LOCATE Y,10
1000 PRINT "Lecture de la courbe";TAB(60);"1"
1010 LOCATE Y+2,10
1020 PRINT "Introduction d'une nouvelle courbe de Référence";TAB(60);"2"
1030 LOCATE Y+4,10
1040 PRINT "Incubation de la courbe étalon";TAB(60);"3"
1050 LOCATE Y+8,10
1060 COLOR 15,0,0
1070 PRINT "Retour au MENU PRINCIPAL";TAB(60);"5"
1080 COLOR 7,0,0
1090 LOCATE Y+10,49
1100 PRINT "Réponse : ";
1110 A$=INPUT$(1)
1120 IF VAL(A$)<1 OR VAL(A$)>5 THEN 920
1130 A=VAL(A$)
1140 ON A GOTO 1150,1420,8040,920,2090
1150 CLS
1160 PRINT #DEVICE,TAB(35);"Lecture de la courbe";
1170 GOSUB 5190
1180 CLS
1190 PRINT #DEVICE,TAB(15);"Lecture de la courbe sur le répertoire ";NAMT$
1200 PRINT #DEVICE," "
```

```
1210 FOR I=113 TO 125
1220 PRINT #DEVICE,USING "                    point  ##    -   #.####  ";I-112,
R(I)/1000
1230 NEXT I
1240 PRINT #DEVICE," "
1250 PRINT #DEVICE,"Coated tubes Ref. : ";NOM$
1260 PRINT #DEVICE,"Courbe entrée le  : ";DTE$
1270 PRINT #DEVICE,"Origine pour      : ";"log(C) = ";ORIGINE
1280 PRINT #DEVICE," "
1290 PRINT #DEVICE,STRING$(WIDE(DEVICE),CHR$(5))
1300 IF DEVICE=IMPRM THEN PRINT#DEVICE,CHR$(12)
1310 IF FLAGNO=0 THEN 1340
1320 X1$=INPUT$(1)
1330 GOTO 2050
1340 IF FLAGIMPRM=1 THEN 2050
1350 PRINT "Avez vous allumé votre imprimante "
1360 X1$=INPUT$(1)
1370 DEVICE=IMPRM
1380 IF ASC(X1$)=78 OR ASC(X1$)=110 THEN 2050
1390 FLAGIMPRM=1
1400 CLOSE #3
1410 GOTO 1160
1420 ' Introduction d'une nouvelle courbe
1430 CLS
1440 FLAGREF=0
1450 DEVICE=1
1460 PRINT #1,TAB(30);"Nouvelle COURBE de REFERENCE"
1470 PRINT #1," "
1480 FOR I=1 TO 13
1490 PRINT I;" èm point de la courbe :"
1500 PRINT "Valeur du B/T : ";R$(I);
1510 PU(I)=VAL(R$(I))
1520 INPUT ;R$(I)
1530 IF VAL(R$(I))=0 THEN R$(I)=STR$(PU(I))
1540 IF VAL(R$(I))=0 THEN LOCATE ,1: BEEP: GOTO 1500
1550 R(I)=VAL(R$(I))*1000
1560 LOCATE ,40
1570 INPUT "log (Conc. mol. en Ecdys.) : ";C$(I)
1580 LOCATE ,40
1590 X1$="o"
1600 PRINT "Confirmation (O/N) "
1610 X1$=INPUT$(1)
1620 IF LEN(X1$)=0 THEN 1660
1630 IF ASC(X1$)<>78 OR ASC(X1$)<>110 THEN 1660
1640 CLS
1650 GOTO 1490
1660 NEXT I
1670 INPUT "Date : ";DTE$
1680 INPUT "Coated tubes Réf. : ";NOM$
1690 PRINT "Origine de la courbe pour log (C) = ";ORIGINE;
1700 INPUT X$: PRINT " "
1710 IF VAL(X$)=0 THEN 1690
1720 ORIGINE=VAL(X$)
1730 IF ORIGINE>0 THEN BEEP: PRINT "ERREUR, ce nombre doit être négatif...":X$
=INPUT$(1):ORIGINE=0:GOTO 1690
1740 IF ORIGINE<-12 THEN 1760
1750 IF ORIGINE > -9 THEN 1760 ELSE 1810
1760 BEEP
1770 PRINT  "Vous avez une courbe de référence  qui me semble bizarre !!"
1780 PRINT "Vous maintenez votre origine (O/N) "
1790 X$=INPUT$(1)
1800 IF ASC(X$)=79 OR ASC(X$)=111 THEN 1810 ELSE 1690
1810 CLS
1820 PRINT #DEVICE,DTE$;TAB(20);"Coated tubes Réf. ";NOM$
1830 PRINT #DEVICE,STRING$(WIDE(DEVICE),CHR$(205))
1840 PRINT #DEVICE," "
1850 FOR I=1 TO 13
1860 PRINT #DEVICE, USING " ##   -     B/T :ç      ç      log (C)  = ç
I,R$(I),C$(I)
1870 NEXT I
1880 PRINT #DEVICE," "
1890 PRINT #DEVICE,"Origine pour log(C) = ";ORIGINE
1900 PRINT #DEVICE," "
1910 PRINT #DEVICE,STRING$(WIDE(DEVICE),CHR$(5))
1920 IF FLAGIMPRM=1 THEN 2050
1930 PRINT "Confirmation  (O/N) ";
1940 X1$=INPUT$(1)
1950 IF ASC(X1$)=78 OR ASC(X1$)=110 THEN 1450
1960 IF FLAGNO=0 THEN 1990
1970 X$=INPUT$(1)
1980 GOTO 2010
1990 FLAGIMPRM=1
2000 DEVICE=IMPRM
2010 IF FLAGUNITE=0 THEN GOSUB 7300
2020 GOSUB 5050                          'enregistrement courbe
2030 IF FLAGNO=1 THEN 2050
2040 GOTO 1820
2050 DEVICE=ECRAN
2060 CLOSE #3
2070 FLAGIMPRM=0
2080 GOTO 920
2090 RETURN
2100 '------------------------------ quantité d'hormone ----------------
2110 CLS
2120 Y=6
2130 COLOR 15,0,0
2140 PRINT #DEVICE,TAB(14);"
2150 PRINT #DEVICE,TAB(14);"  DOSAGE  D'ECDYSTEROIDES DANS 1 ECHANTILL
2160 PRINT #DEVICE,TAB(14);"
2170 COLOR 7,0,0
2180 LOCATE Y,10
2190 PRINT "Calculs de la quantité d'ecdystérone ";TAB(60);"1"
2200 LOCATE Y+8,10
2210 PRINT "Retour au MENU PRINCIPAL";TAB(60);"5"
2220 LOCATE Y+10,30
2230 PRINT "Réponse : ";
2240 A$=INPUT$(1)
2250 IF VAL(A$)<1 OR VAL(A$)>5 THEN 2110
2260 A=VAL(A$)
2270 PRINT #DEVICE,CHR$(12)
2280 ON A GOTO 2290,2110,2110,2110,3500
2290 IF FLAGREF=0 THEN GOSUB 5190
2300 DEVICE=ECRAN
2310 J1=1
2320 CLS
2330 PRINT #1,TAB(25);"Calculs de la quantité d'ecdystéroïdes"
2340 Y=3
2350 LOCATE Y,1
2360 'INPUT "CPM totaux : ";T(0)
2370 T=5000
2380 INPUT "Nombre de tubes a compter ";NBRETUBE
2390 IF NBRETUBE>100 THEN PRINT "100 tubes à la fois...":GOTO 2360
2400 TOTAL=0: CPMOYEN=0
```

```
2410 CLS: TOTAL=0:CPMOYEN=0
2420 FOR L=1 TO NBRETUBE
2430 PRINT #1,L;" èm Sample ";
2440 COLOR 0,7,0
2450 PRINT "CPM Totaux : ";T(L-1);
2460 COLOR 7,0,0
2470 INPUT T1$
2480 IF VAL(T1$)>0 THEN T(L)=VAL(T1$) ELSE T(L)=T(L-1)
2490 LOCATE ,52
2500 TOTAL=TOTAL+T(L)
2510 CPMOYEN=TOTAL/L
2520 PRINT "CPM Moyens : ";
2530 COLOR 0,7,0
2532 PRINT INT(CPMOYEN)
2540 COLOR 7,0,0
2550 LOCATE ,52
2560 PRINT "Confirmation : ?"
2570 X1$=INPUT$(1)
2580 IF ASC(X1$)=78 OR ASC(X1$)=110 THEN 2430
2590 NEXT L
2600 CLS
2610 FOR L=1 TO NBRETUBE
2620 PRINT #1,L;" èm Sample ";
2630 PRINT "CPM totaux = ";T(L)
2640 PRINT "CPM liés   : ";
2650 COLOR 0,7,0
2660 INPUT U(L)
2670 COLOR 7,0,0
2680 LOCATE ,52
2690 INPUT "Sample name ";N$(L)
2700 LOCATE ,52
2710 PRINT "Confirmation : ?"
2720 X1$="o"
2730 X1$=INPUT$(1)
2740 IF ASC(X1$)=78 OR ASC(X1$)=110 THEN 2620  ELSE 2750
2750 IF U(L)=0 THEN 2890
2760 R(L)=1000*(U(L)/T(L))
2770 GOTO 2900
2780 INPUT "N° de l'échantillon éronné : ";L
2790 PRINT U(L);" - CPM Liés  ";
2800 INPUT "Nouvelle valeur : ";T$
2810 IF VAL(T$)>0 THEN U(L)=VAL(T$)
2820 PRINT T(L);" - CPM Totaux ";
2830 INPUT T1$
2840 IF VAL(T1$)>0 THEN T(L)=VAL(T1$)
2850 PRINT "Sample name     : ";N$(L)
2860 INPUT N$
2870 IF ASC(N$)=13 THEN N$(L)=N$
2880 GOTO 2910
2890 R(L)=0
2900 NEXT L
2910 PRINT "Confirmation (O/N) : "
2920 X1$=INPUT$(1)
2930 IF ASC(X1$)=78 OR ASC(X1$)=110 THEN 2780
2940 CLS
2950 PRINT "Réplicate : ";
2960 X1$=INPUT$(1)
2970 LOCATE ,15
2980 PRINT X1$
2990 G=VAL(X1$)
3000 X1$=""
3010 INPUT "Titre de l'expérience ";T$(J1)
3020 INPUT "Incubation du (N° journée - date normale) : ";DTE$
3030 H$(1)="2.50*"
3040 H$(2)="1.00*"
3050 H$(3)="1.00*"
3060 K=1
3070 L=1
3080 P$(J1)="Homogénat"
3090 GOSUB 5710                          ' gestion des constantes
3100 PRINT "Confirmation ?"
3110 X1$=INPUT$(1)
3120 IF ASC(X1$)=78 OR ASC(X1$)=110 THEN 3060
3130 K=2
3140 L=1
3150 P$(J1)="Dilution"
3160 GOSUB 5710
3170 PRINT "Confirmation ?"
3180 X1$=INPUT$(1)
3190 IF ASC(X1$)=78 OR ASC(X1$)=110 THEN 3130
3200 K=3
3210 L=1
3220 P$(J1)="Poids/Volume"
3230 GOSUB 5710
3240 PRINT "Confirmation ?"
3250 X1$=INPUT$(1)
3260 IF ASC(X1$)=78 OR ASC(X1$)=110 THEN 3200
3270 CLS
3280 PRINT #1,"Je calcule ......"
3290 GOSUB 5900
3300 IF FLAGNO=0 THEN 3360
3310 CLS
3320 FLAGIMPRM=1
3330 DEVICE=ECRAN
3340 GOSUB 6150
3350 GOTO 3420
3360 IF FLAGIMPRM=1 THEN 3400
3370 DEVICE=IMPRM
3380 FLAGIMPRM=1
3390 GOSUB 6150
3400 DEVICE=ECRAN
3410 FLAGIMPRM=0
3420 PRINT #DEVICE,"Faut-il stocker sur disque A: ce dialyseur (O/N) ";
3430 X1$=INPUT$(1)
3440 IF ASC(X1$)=111 OR ASC(X1$)=79 THEN GOSUB 5380
3450 X1$=""
3460 CLS
3470 PRINT #1,"Y a t'il encore une série de tubes a compter? ";
3480 X1$=INPUT$(1)
3490 IF ASC(X1$)=79 OR ASC(X1$)=111 THEN 2320 ELSE GOTO 2110
3500 RETURN
3510 '------------------------------  Revoir 1 manip  ------------------
3520 CLS
3530 Y=6
3540 COLOR 15,0,0
3550 PRINT #DEVICE,TAB(22);"                                    "
3560 PRINT #DEVICE,TAB(22);"  RAPPEL D'UNE ANCIENNE MANIP.  "
3570 PRINT #DEVICE,TAB(22);"                                    "
3580 COLOR 7,0,0
3590 LOCATE Y,10
3600 PRINT "Effacer des fichiers";TAB(60);"1"
```

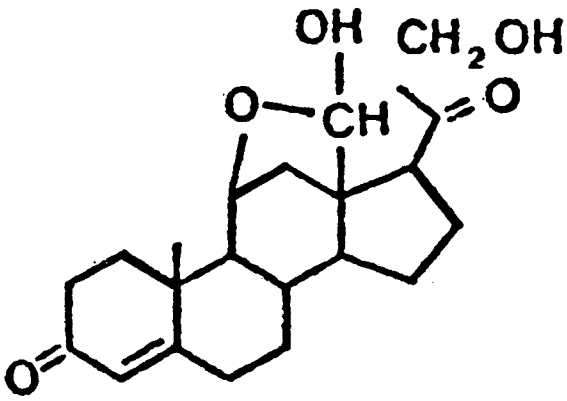
```
3610 LOCATE Y+2,10
3620 PRINT "Reprendre une ancienne manip.";TAB(60);"2"
3630 LOCATE Y+8,10
3640 COLOR 15,0,0
3650 PRINT "Retour au MENU PRINCIPAL";TAB(60);"5"
3660 COLOR 7,0,0
3670 LOCATE Y+10,30
3680 K=0
3690 PRINT "Réponse : ";
3700 A$=INPUT$(1)
3710 IF VAL(A$)<1 OR VAL(A$)>5 THEN 3520
3720 A=VAL(A$)
3730 K=0
3740 ON A GOTO 3760,3920,3520,3520,4980
3750 '------------------------ Effacer 1 fiche
3760 CLS
3770 GOSUB 6780
3780 PRINT "Voulez-vous effacer une fiche ? "
3790 X1$=INPUT$(1)
3800 IF ASC(X1$)<65 THEN 3910
3810 IF ASC(X1$)=79 OR ASC(X1$)=111 THEN 3830
3820 GOTO 3910
3830 LOCATE 23,1
3840 PRINT "Quel est le Fichier que vous voulez déléter ? ";
3850 INPUT KO$
3860 PRINT "Etes vous certains d'effacer ";KO$;" ?"
3870 X1$=INPUT$(1)
3880 IF ASC(X1$)=79 OR ASC(X1$)=111 THEN 3900
3890 GOTO 3910
3900 KILL UNITES+KO$
3910 GOTO 3520
3920 '------------------------------ Reprise manip
3930 DEVICE=ECRAN
3940 LIGNE=0
3950 Y=6
3960 CLS
3970 PRINT TAB(21);"Reprendre une ancienne expérience"
3980 LOCATE Y,10
3990 PRINT "Impression sur Imprimante";TAB(60);"1"
4000 LOCATE Y+2,10
4010 PRINT "Recalculer les Qté d'Ecd. avec la Nouvl courbe";TAB(60);"2"
4020 LOCATE Y+4,10
4030 PRINT "Modifier un paramètre (Hgt, Dil., Pds)";TAB(60);"3"
4040 LOCATE Y+8,10
4050 COLOR 15,0,0
4060 PRINT "Retour au MENU ";TAB(60);"5"
4070 COLOR 7,0,0
4080 LOCATE Y+10,30
4090 PRINT "Réponse : ";
4100 X1$=INPUT$(1)
4110 PRINT X1$
4120 IF VAL(X1$)<1 OR VAL (X1$)>5 THEN 3960
4130 A=VAL(X1$)
4140 CLS
4150 'si pas imprimante FLAGNO=1
4160 ON A GOTO 4210,4430,4560,3960,4180
4170 GOTO 3960
4180 DEVICE=ECRAN
4190 IF FLAGNO=0 THEN LPRINT CHR$(12)
4200 GOTO 3510
4210 '------------------------ Impression anc. manip
4220 DEVICE=ECRAN
4230 CLS
4240 GOSUB 6780
4250 LOCATE 22,1
4260 INPUT "Nom de votre fichier expérimental : ";EXPE$
4270 IF LEN(EXPE$)=0 THEN 4420
4280 GOSUB 7010
4290 IF FLAGREP=1 THEN 4360
4300 CLS
4310 PRINT "Je charge votre Manip....."
4320 GOSUB 6510
4330 PRINT "Manip. chargée"
4340 FLAGREP=1
4350 GOTO 4380
4360 SOUND 150,10
4370 PRINT "Manip. déjà chargée..."
4380 DEVICE=IMPRM
4390 GOSUB 6150
4400 GOSUB 7010
4410 DEVICE=ECRAN
4420 GOTO 3920
4430 '------------------------------------ recalculer
4440 GOSUB 6780
4450 INPUT "Nom de votre Fichier ";EXPE$
4460 IF LEN(EXPE$)=0 THEN 4550
4470 GOSUB 5190
4480 GOSUB 6510
4490 GOSUB 5900
4500 IF FLAGNO=1 THEN DEVICE=ECRAN : GOTO 4530
4510 PRINT "Allumer l'imprimante...."
4520 DEVICE=IMPRM
4530 GOSUB 7010
4540 GOSUB 6150
4550 GOTO 3920
4560 '------------------------------------ Modification paramètres
4570 CLS
4580 DEVICE=ECRAN
4590 GOSUB 6780
4600 BEEP
4610 INPUT "Nom du fichier a modifier ";EXPE$
4620 IF DEVICE=IMPRM THEN LPRINT CHR$(12)
4630 IF LEN(EXPE$)=0 THEN 3920
4640 GOSUB 5190                    'lecture courbe ref
4650 FLAGUNITE=1
4660 GOSUB 6510                    'chargement manip
4670 CLS
4680 PRINT #DEVICE,"N°    Total    Liés        Hgt     Dil.     Pds
mple name"
4685 PRINT #DEVICE,"                          100µl          100mg
     "
4690 PRINT #DEVICE,STRING$(80,CHR$(61))
4700 FOR I=1 TO NBRETUBE
4710 PRINT #DEVICE, USING "### - #####   #####     ####.##  #####.#  ## ##
     ç                ç";I,T(I),U(I),P(1,I),P(2,I),P(3,I),N$(I)
4720 IF I MOD 18<>0 THEN 4770
4730 X$=INPUT$(1)
4740 CLS
4750 PRINT #DEVICE,"N°  Total    Liés        Hgt     Dil.     Pds
le name"
4755 PRINT #DEVICE,"                          100µl          100mg
     "
4760 PRINT #DEVICE,STRING$(80,CHR$(61))
4770 NEXT I
4780 PRINT #DEVICE,STRING$(80,CHR$(61))
4790 PRINT "Modifications: Homogénat (1) - Dilution (2) - Poids (3) - F
```

```
(4) "
4800 X$=INPUT$(1)
4810 IF VAL(X$)<1 OR VAL(X$)>4 THEN 3920
4820 A=VAL(X$)
4830 IF A=4 THEN 4930
4840 FOR J=1 TO NBRETUBE
4850 H$(5)=STR$(P(A,J))
4860 PRINT #DEVICE,"Ligne N° ";J;": ";P(A,J);
4870 INPUT H$(5)
4880 IF H$(5)="*" OR VAL(H$(5))=0 THEN 4910
4890 IF INSTR(H$(5),CHR$(42))>1 THEN 4940
4900 P(A,J)=VAL(H$(5))
4910 NEXT J
4920 GOTO 4670
4930 GOTO 4490
4940 FOR L=J TO NBRETUBE
4950 P(A,L)=VAL(H$(5))
4960 NEXT L
4970 GOTO 4670
4980 RETURN
4990 '------------------------------ FIN ------------------------------
5000 CLOSE #1
5010 CLOSE #2
5020 CLOSE #3
5030 CLOSE #4
5040 SYSTEM
5050 '============================ enregistrement courbe REF
5060 IF FLAGUNITE=0 THEN GOSUB 7300
5070 OPEN "R",#3,UNITE$+"REF",96
5080 FIELD #3, 6 AS REF2$
5090 FOR I%=1 TO 16
5100 IF I%=14 THEN LSET REF2$=NOM$: GOTO 5150
5110 IF I%=15 THEN LSET REF2$=DTE$: GOTO 5150
5120 IF I%=16 THEN LSET REF2$=STR$(ORIGINE): GOTO 5150
5130 I=I%
5140 LSET REF2$=STR$(R(I))
5150 PUT #3,I%
5160 NEXT I%
5170 CLOSE #3
5180 RETURN
5190 '============================ Lecture courbe ref ecdysone
5200 IF FLAGREF=1 THEN 5370
5210 IF FLAGUNITE=0 THEN GOSUB 7300
5220 FILES UNITE$+"REF"
5230 OPEN "R",#3,UNITE$+"REF",96
5240 FIELD #3, 6 AS REF2$
5250 FOR I%=1 TO 16
5260 GET #3,I%
5270 IF I%=14 THEN NOM$=REF2$
5280 IF I%=15 THEN DTE$=REF2$
5290 IF I%=16 THEN ORIGINE=VAL(REF2$)
5300 I=I%+112
5310 IF I>125 THEN 5330
5320 R(I)=VAL(REF2$)
5330 NEXT I%
5340 CLOSE #3
5350 FLAGREF=1
5360 FLAGUNITE=0
5370 RETURN
5380 '============================ enregistrement MANIP
5390 EXPE$= MID$(T$(J1),1,10)
5400 GOSUB 7180
5410 CLS
5420 PRINT "Cette expérience est sauvegardée sous le label :";
5430 EXPE$=MID$(EXPE$,1,8)+".C"+MID$(DATE$,9,2)
5440 COLOR 15,0,0
5450 PRINT EXPE$
5460 COLOR 7,0,0
5470 IF FLAGUNITE=0 THEN GOSUB 7300
5480 OPEN"R",#4,UNITE$+EXPE$, MANIP
5490 FIELD #4, 7 AS E1$, 7 AS E2$, 6 AS E3$, 5 AS E4$, 7 AS E5$, 6 AS E
S E7$, 15 AS E8$
5500 LSET E1$=STR$(G)
5510 LSET E2$=STR$(NBRETUBE)
5520 LSET E5$=STR$(CPMOYEN)
5530 PUT #4,1
5540 FOR J%=2 TO NBRETUBE+1
5550 I%=J%-1
5560 LSET E1$=STR$(T(I%))
5570 LSET E2$=STR$(U(I%))
5580 LSET E3$=STR$(R(I%))
5590 LSET E4$=STR$(P(1,I%))
5600 LSET E5$=STR$(P(2,I%))
5610 LSET E6$=STR$(P(3,I%))
5620 LSET E7$=STR$(Q(I%))
5630 LSET E8$=H$(I%)
5640 PUT #4,J%
5650 NEXT J%
5660 IF FLAGNO=1 THEN 5680
5670 DEVICE=IMPRM
5680 DEVICE=ECRAN
5690 CLOSE #4
5700 RETURN
5710 '------------------------------ Gestion des constantes
5720 PRINT #1,"N° ";L;" : ";P$(J1);"=";H$(K);
5730 INPUT H$(5)
5740 IF H$(5)="*" THEN 5860
5750 IF VAL(H$(5))=0 THEN 5860
5760 H$(K)=H$(5)
5770 H$(5)=""
5780 IF INSTR(H$(K),CHR$(42))<>0 THEN 5860
5790 FOR J=L TO L+G-1
5800 P(K,J)=VAL(H$(K))
5810 NEXT J
5820 L=L+G
5830 IF L<=1 THEN 5720
5840 IF L=NBRETUBE+1 THEN 5890
5850 GOTO 5720
5860 FOR J=L TO NBRETUBE
5870 P(K,J)=VAL(H$(K))
5880 NEXT J
5890 RETURN
5900 '------------------------------ Régression linéaire
5910 FOR D=J1 TO J1+NBRETUBE-1
5920 G$(D)=""
5930 NEXT D
5940 IF ORIGINE=0 THEN ORIGINE=-10.3
5950 FOR D=J1 TO J1+NBRETUBE-1
5960 F=125
5970 IF R(D)<R(125) THEN 6070
5980 IF R(D)>R(F) THEN 6100
5990 F=F-1
6000 IF F>113 THEN 5980
6010 E=R(113)
6020 G$(D)="<"
6030 E=(((R(F-1)-E)/(R(F-1)-R(F))+F-114)*.3)+ORIGINE
6040 Q(D)=(1.1*P(1,D)*P(2,D)*10^(E+8))/P(3,D)
6050 NEXT D
6060 GOTO 6140
6070 E=R(125)
6080 G$(D)=">"
6090 GOTO 6030
6100 IF R(D)<R(F-1) THEN 6120
6110 GOTO 5990
```

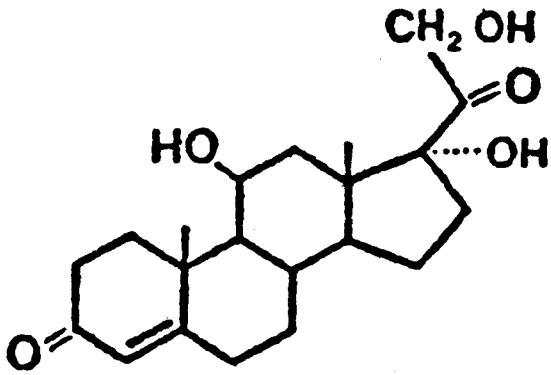
```
6120 E=R(D)
6130 GOTO 6030
6140 RETURN
6150 '------------------------------ Impression des résultats
6160 IF FLAGNO=1 AND DEVICE=2 THEN RETURN
6170 IF FLAGNO=1 THEN DEVICE=1
6180 PAGE=PAGE+1
6190 PRINT #DEVICE," "
6200 PRINT #DEVICE,"Le ";MID$(DATE$,4,2);"/";MID$(DATE$,1,2);"/";MID$(DATE$,7,
4);TAB(23);"ECDYSONE - Manip. du ";DTE$;" (";JOUR;" - ";MOIS$;")"
6210 PRINT #DEVICE," "
6220 PRINT #DEVICE,T$(J1);"   (CPM Totaux Moyens :";CPMOYEN;")";
6230 PRINT #DEVICE," "
6240 PRINT #DEVICE," N°   Total  Bound     Hgt     Dil.     Pds     B/T
pMol.     Moy.    Sample"
6245 PRINT #DEVICE,"                          x100µl          x100mg
     "
6250 PRINT #DEVICE,STRING$(80,205)
6260 PRINT #DEVICE," "
6270 IF G=0 THEN G=1
6280 FOR D=1 TO NBRETUBE
6290 IF D MOD G=0 THEN PRINT #DEVICE,USING "### - ####### ####### ##.##  #####
.#  ###.##  +#.#### ######.##ç ç######.#|ç              ç";D,T(D),U(D),P(1,D),
P(2,D),P(3,D),R(D)/1000,Q(D),G$(D),(MOYENNE+Q(D))/G,N$(D):LIGNE=LIGNE+1
6300 IF LEN(N$(D+1))=0 AND LEN(N$(D))<>0 THEN N$(D+1)=N$(D)
6310 IF D MOD G=0 THEN MOYENNE=0:GOTO 6350
6320 PRINT #DEVICE,USING                    "      ####### ####### ##.##  #####
.#  ###.##  +#.#### ######.##ç ç  ";T(D),U(D),P(1,D),P(2,D),P(3,D),R(D)/1000,Q
(D),G$(D):LIGNE=LIGNE+1
6330 MOYENNE=MOYENNE+Q(D)
6340 GOTO 6360
6350 PRINT #DEVICE,STRING$(80,32):LIGNE=LIGNE+1
6360 IF LIGNE MOD 10=0 AND FLAGNO=1 THEN X$=INPUT$(1):GOTO 6390
6370 IF FLAGNO=1 THEN 6430
6380 IF LIGNE MOD 56<>0 THEN 6430
6390 PRINT #DEVICE,CHR$(12)
6400 PRINT #DEVICE," N°   Total  Bound     Hgt     Dil.     Pds     B/T
pMol.     Moy.    Sample"
6405 PRINT #DEVICE,"                          x100µl          x100mg
     "
6410 PRINT #DEVICE,STRING$(80,205)
6420 PRINT #DEVICE," "
6430 NEXT D
6440 IF FLAGNO=0 THEN 6460
6450 X$=INPUT$(1)
6460 PRINT #DEVICE,STRING$(80,223)
6470 IF DEVICE=IMPRM THEN LPRINT CHR$(12)
6480 DEVICE=ECRAN
6490 LIGNE=0
6500 RETURN
6510 '------------------------------ Lecture d'1 fiche expérimentale
6520 FILES UNITE$+EXPE$
6530 CLS
6540 PRINT #1,"Loading your file ";EXPE$;"....";
6550 OPEN"R",#4,UNITE$+EXPE$, MANIP
6560 FIELD #4, 7 AS E1$, 7 AS E2$, 6 AS E3$, 5 AS E4$, 7 AS E5$, 6 AS E6$, 9 A
S E7$, 15 AS E8$
6570 GET #4,1
6580 G=VAL(E1$)
6590 NBRETUBE=VAL(E2$)
6600 CPMOYEN=VAL(E5$)
6610 FOR J%=2 TO NBRETUBE+1
6620 GET #4,J%
6630 I=J%-1
6640 T(I)=VAL(E1$)
6650 U(I)=VAL(E2$)
6660 R(I)=VAL(E3$)
6670 P(1,I)=VAL(E4$)
6680 P(2,I)=VAL(E5$)
6690 P(3,I)=VAL(E6$)
6700 Q(I)=VAL(E7$)
6710 N$(I)=E8$
6720 NEXT J%
6730 T$(1)=MID$(EXPE$,1,5)
6740 DTE$=MID$(EXPE$,6,3)+" / de "+" 19"+MID$(EXPE$,11,2)
6750 GOSUB 7010
6760 CLOSE #4
6770 RETURN
6780 '------------------------------ Affichage des fichiers
6790 CLS
6800 GOSUB 7300
6810 CLS
6820 IF ASC(UNITE$)>100 THEN 6790
6830 IF ASC(UNITE$)<96 AND ASC(UNITE$)>69 THEN 6790
6840 PRINT #DEVICE,TAB(25);"LISTING DE L'UNITE ";UNITE$
6850 ON ERROR GOTO 7640
6860 FILES UNITE$+"*.C**"
6870 X=CSRLIN
6880 LOCATE X-1,1
6890 PRINT #DEVICE,STRING$(80,CHR$(32))
6900 GOSUB 7550
6910 LOCATE 20,1
6920 PRINT STRING$(80,32)
6930 LOCATE 20,1
6940 PRINT "Est-ce bien sur ce fichier que ce trouve votre manip. ? "
6950 X$=INPUT$(1)
6960 LOCATE 20,1
6970 PRINT STRING$(80,32)
6980 LOCATE 20,1
6990 IF ASC(X$)=78 OR ASC(X$)=110 THEN 6790
7000 RETURN
7010 '------------------------------ Retrouver la date
7020  J=VAL(MID$(EXPE$,6,3))
7030 T$(J1)=MID$(EXPE$,1,5)
7040 T$(J1)="Titre abrégé: "+T$(J1)
7050 MOIS=J/30.5
7060 RESTORE 7170
7070 FOR I1=1 TO MOIS
7080 READ X$,P1
7090 NEXT I1
7100 READ MOIS$,P1
7110 JOUR=MOIS-INT(MOIS)
7120 JOUR=P1*JOUR
7130 IF JOUR-INT(JOUR)>.5 THEN JOUR=JOUR+1
7140 JOUR=INT(JOUR)+1
7150 IF J>213 THEN JOUR=JOUR-1
7160 RETURN
7170 DATA "Janvier",31,"Février",29,"Mars",31,"Avril",30,"Mai",31,"Juin",
uillet",31,"Aout",31,"Septembre",30,"Octobre",31,"Novembre",30,"Décembre",
7180 '------------------------------ Analyse string exp$
7190 FOR K=1 TO LEN(EXPE$)
7200 IF MID$(EXPE$,K,1)=CHR$(32) OR MID$(EXPE$,K,1)=CHR$(46) THEN 7230
7210 NEXT K
7220 GOTO 7270
7230 FOR K1=K TO LEN(EXPE$)-1
7240 MID$(EXPE$,K1,1)=MID$(EXPE$,K1+1,1)
7250 NEXT K1
7260 GOTO 7190
7270 MID$(EXPE$,LEN(EXPE$),1)=CHR$(32)
7280 EXPE$=MID$(EXPE$,1,5)+DTE$
7290 RETURN
7300 '------------------------------ Definition de l'unité
7310 Y=19
```

```
320 IF DEVICE=IMPRM THEN FLAGSOUSP=2 ELSE FLAGSOUSP=0
330 IF DEVICE=IMPRM THEN DEVICE=ECRAN
340 BEEP
350 GOSUB 7550
360 IF LEN(UNITES$)>0 THEN 7590
370 PRINT #DEVICE,"Sur quelle unité de trouve votre fichier ? ";
380 U$=INPUT$(1)
390 IF ASC(U$)<65 OR ASC(U$)>101 THEN 7350
400 IF ASC(U$)<97 AND ASC(U$)>70 THEN 7350
410 IF ASC(U$)>96 THEN U$=CHR$(ASC(U$)-32)
420 PRINT #DEVICE," ";U$;":"
430 FILES U$+":*"
440 LOCATE CSRLIN-1,1
450 INPUT "Dans quel répertoire, si non 'RETURN' : ";U1$
460 GOSUB 7550
470 IF LEN(U1$)<2 THEN U1$=":" ELSE U1$=":ç"+U1$+"ç"
480 UNITES=U$+U1$
490 PRINT #DEVICE,"Chemin d'accès à la courbe = ";UNITES;"  -  ";
500 PRINT "Confirmation (O/N)  ? ";
510 X$=INPUT$(1)
520 IF ASC(X$)=78 OR ASC(X$)=110 THEN 7370
530 IF FLAGSOUSP=2 THEN DEVICE=IMPRM
540 RETURN
550 LOCATE Y,1
560 PRINT #DEVICE,STRING$(239,CHR$(32));
570 LOCATE Y,1
580 RETURN
590 PRINT UNITES;"  est bien l'accès correcte  ? ";
600 X$=INPUT$(1)
610 IF ASC (X$)=78 OR ASC(X$)=110 THEN 7620 ELSE RETURN
620 GOSUB 7550
630 GOTO 7370
640 '------------------------- Gestion des erreurs
650 X=ERR
660 IF X<>53 THEN 7810
670 CLS
680 ESSAI=ESSAI+1
690 PRINT "Essai N° ";ESSAI
700 PRINT "Fichier inexistant sur cette unité ....!!!"
710 PRINT "Introduire la disquette correcte"
720 PRINT "et appuyer sur n'importe quelle touche pour continuer"
730 IF ESSAI>2 THEN 7760
740 X$=INPUT$(1)
750 RESUME
760 ESSAI=0
770 CLS
780 LOCATE 21,1:PRINT "Appuyer sur 'RETURN' pour revenir au menu"
790 RETURN
800 GOTO 10
810 IF X=55 THEN RESUME NEXT
820 IF X<>70 THEN 7870
830 PRINT "Disquette protégée en écriture....."
840 PRINT "Enlever la protection, S.V.P"
850 PRINT "Appuyer sur n'importe quelle touche lorsque vous serez prêt"
860 GOTO 7900
870 IF X<>71 THEN 7920
880 PRINT "Fermer la porte du lecteur ou introduire votre disquette... SVP"
890 PRINT "Appuyer sur n'importe quelle touche lorsque vous serez prêt"
900 X$=INPUT$(1)
910 RESUME
920 IF X<>11 THEN 7960
930 PRINT #DEVICE, "Math. ERR";
940 PRINT #DEVICE," "
950 RESUME NEXT
960 IF X>25 OR X<23 THEN 7970:BEEP: PRINT "ALLUMER l'imprimante..... ":RESUME
970 PRINT "Détection d'une ERREUR non Résolue par le programme : "
980 PRINT "ON DEVICE : ";ERDEV$;TAB(30);"ERR         :";ERDEV
7990 PRINT "ERR       : ";ERR;TAB(30);"ON ADDRESS  :";ERL
8000 PRINT "Appuyer sur une touche losrque vous serez prêt"
8010 X$=INPUT$(1)
8020 CLEAR
8030 GOTO 10
8040 '------------------- Incubation courbe REF
8050 C=0
8060 C=C+1
8070 CLS
8080 FLAGIMPRM=0
8090 PRINT #1,TAB(20);"Coated tubes "
8100 Y=3
8110 FOR I=1 TO 10
8120 IF I<>6 THEN 8180
8130 FOR PAGE=2 TO 23
8140 LOCATE PAGE,1
8150 PRINT STRING$(80,32)
8160 NEXT PAGE
8170 Y=-13
8180 LOCATE Y+I*3,1
8190 PRINT STRING$(80,32)
8200 LOCATE Y+I*3,1
8210 PRINT I;TAB(10);
8220 IF I=1 THEN 8230 ELSE PRINT T(I-1);
8230 INPUT "CPM Totaux : ";T$
8240 IF VAL(T$)>0 THEN T(I)=VAL(T$) ELSE T(I)=T(I-1)
8250 LOCATE Y+1+I*3,1
8260 PRINT STRING$(160,32)
8270 LOCATE Y+1+I*3,1
8280 PRINT TAB(10);
8290 INPUT "CPM Liés   : ";U(I)
8300 LOCATE Y+2+I*3,56
8310 PRINT "Confirmation "
8320 X1$=INPUT$(1)
8330 IF ASC(X1$)=78 OR ASC(X1$)=110 THEN SOUND 150,10: GOTO 8180
8340 NEXT I
8350 INPUT "Coated tubes Réf.: ";NOM$
8360 IF LEN(NOM$)<1 THEN 8380
8370 IF ASC(NOM$)>90 AND LEN(NOM$)>0 THEN NOM$=CHR$(ASC(NOM$)-32)
8380 INPUT "Date d'incubation: ";DTE$
8390 PRINT "Réplicate ";
8400 X$=INPUT$(1)
8410 IF VAL(X$)=0 THEN 8390 ELSE G=VAL(X$)
8420 CLS
8430 PRINT #DEVICE,"Coated tubes Réf. : ";NOM$;TAB(40);"Courbe De Référence i
 : ";DTE$
8440 PRINT #DEVICE," "
8450 PRINT #DEVICE," Lié          Total                          B/T          i
/T moy.   Sample"
8460 PRINT #DEVICE,STRING$(80,CHR$(205))
8470 ON ERROR GOTO 8710
8480 IF G=0 THEN G=1
8490 FOR J=1 TO 10 STEP G
8500 PRINT #DEVICE,USING "######      ########                          #.####";U
(J),T(J),U(J)/T(J)
8510 IF J MOD G=0 THEN 8520 ELSE 8530
8520 PRINT #DEVICE," "
8530 NEXT J
8540 PRINT #DEVICE,STRING$(80,CHR$(5))
8550 IF C/3-INT(C/3)=0 AND DEVICE=IMPRM THEN LPRINT CHR$(12)
8560 IF FLAGNO=1 THEN 8650
8570 IF FLAGIMPRM=1 THEN 8650
8580 X1$=""
8590 PRINT #DEVICE,"Confirmation (O/N) "
8600 X1$=INPUT$(1)
8610 IF ASC(X1$)=78 OR ASC(X1$)=110 THEN 8070
8620 DEVICE=IMPRM
```

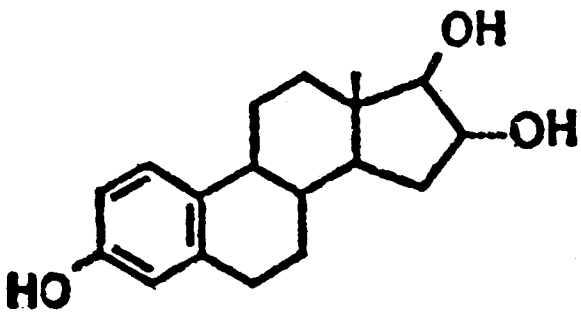
```
8630 FLAGIMPRM=1
8640 GOTO 8430
8650 DEVICE=ECRAN
8660 FLAGIMPRM=0
8670 PRINT #DEVICE,"Y-a-t'il une autre série de tubes (O/N) "
8680 X1$=INPUT$(1)
8690 IF ASC(X1$)=79 OR ASC(X1$)=111 THEN 8060
8700 RETURN
8710 X=ERR
8720 IF X<>11 THEN 8770
8730 PRINT #DEVICE, "Math. ERR";
8740 PRINT #DEVICE," "
8750 RESUME NEXT
8760 RESUME 8520
8770 PRINT ERR,ERL
8780 PRINT ".../..."
8790 X$=INPUT$(1)
8800 RESUME NEXT
9000 LPRINT CHR$(12)
```



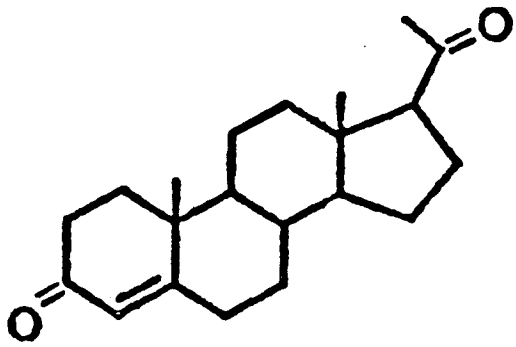
ALDOSTERONE



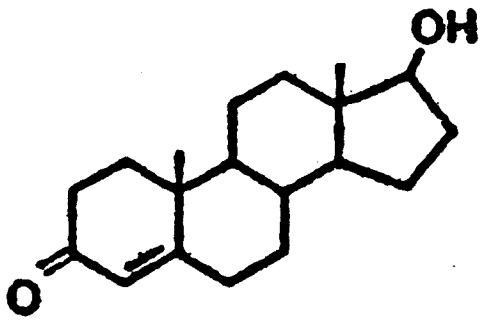
CORTISOL



OESTRIOL

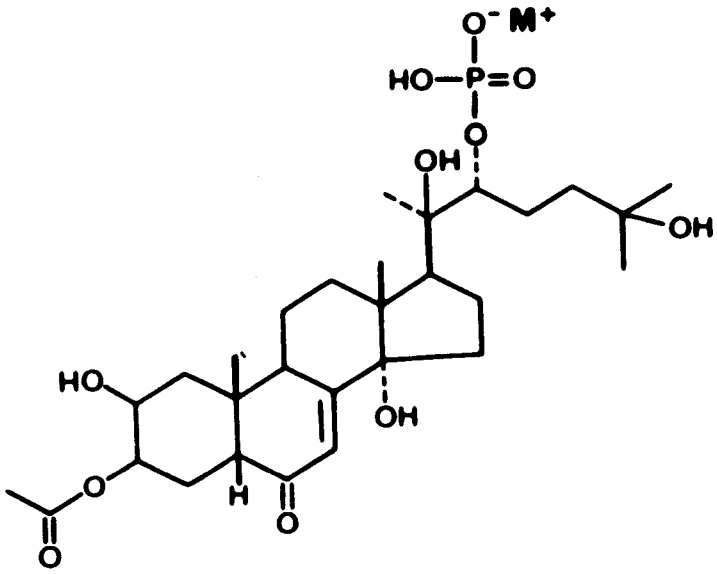


PROGESTERONE



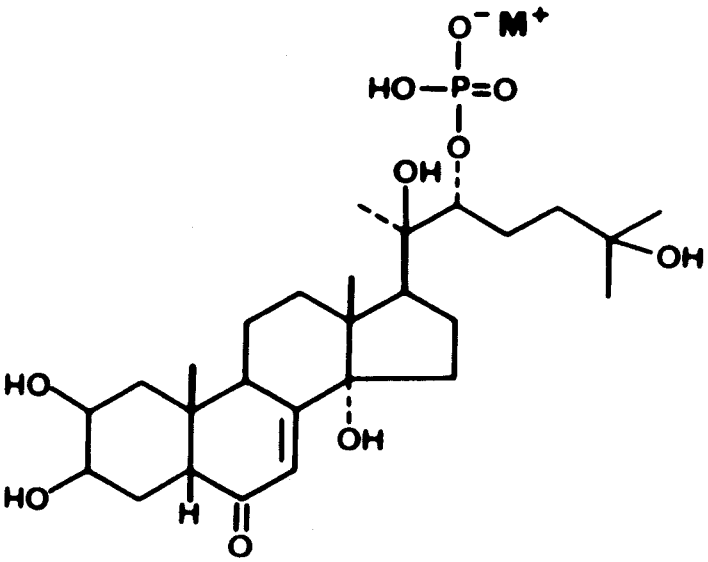
TESTOSTERONE

20-Hydroxyecdysone, 3 acétate, 22 phosphate.

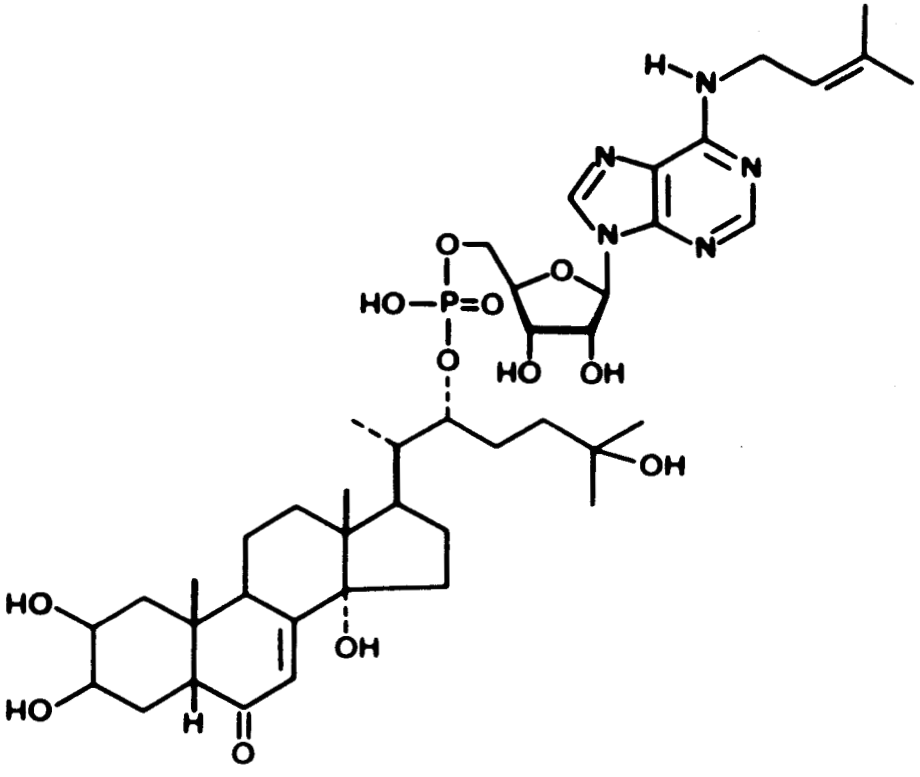


Ecdysone, 22 Phosphate

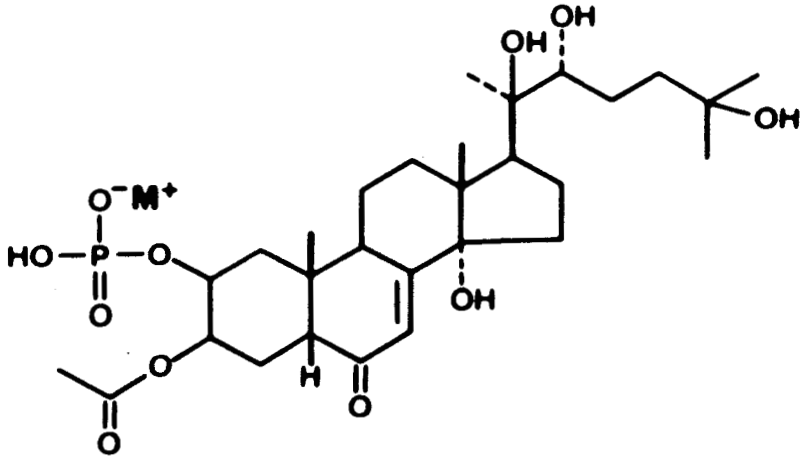
BU LILLE



Ecdysone, 22-N-(isopentyl)-adénosine-monophosphate



Ecdysone, 2 phosphate, 3 acétate.



RESUME

Le parasite humain Schistosoma mansoni posséde des hormones ecdystéroïdes: l'ecdysone et la 2Ø-hydroxy-ecdysone.

Ces deux hormones ont été détectées pendant deux grands moments biologiques de ce parasite bisexué: Pendant la phase exponentielle de croissance vers le stade adulte (jour 11 après l'infestation) et pendant la maturation sexuelle des adultes et la ponte des oeufs (jour 4Ø après l'infestation). La présence de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) est également démontrée ainsi qu'une corrélation entre l'activité enzymatique SOD et la 2Ø-OH-ecdysone présente dans le parasite. Au moins deux isoenzymes de la SOD sont présentes pendant toutes les phases de développement des schistosomes: la Mn-SOD et la $^{Cu}/_{Zn}$-SOD. Nous apportons la première évidence d'une cytotoxicité des anticorps anti-ecdystéroïdes vis-à-vis des jeunes schistosomules *in-vitro*. Des immunisations de hamsters et de souris avec des immunogènes ecdystéroïdes conduisent à la réduction de la charge parasitaire de ces rongeurs lorsqu'ils infestés par des schistosomes.

Les parasites excrètent leurs hormones ecdystéroïdes à la fois dans le sérum et les urines des hôtes infestés. La cinétique d'apparition des ecdystéroïdes sériques est en parfait accord avec la susceptibilité de l'hôte vis-à-vis d'une infestation par les schistosomes. C'est une apparition précoce, dès le 6ème après l'infestation pour la schistosomiase et dès le 7ème jour pour une filariose. Dans le cas d'une infestation par filaires (Brugia malayi) les pics d'ecdystéroïdes sériques sont corrélées à la fois aux mues parasitaires et à la ponte des microfilaires par les femelles. Les ecdystéroïdes sériques ont une nature apolaires alors que les hormones urinaires sont plus polaires. Dans la schistosomiase humaine, les ecdystéroïdes urinaires ont été caractérisées par spectrophotométrie de masse comme étant la 2Ø-OH-ecdysone et la 5-épi-2Ø-OH-ecdysone. Après chimiothérapie parasitaire, les ecdystéroïdes urinaires décroissent rapidement dès le 4ème jour après l'absorption du médicament. Dans la filariose humaine à *W.bancrofti*, les ecdystéroïdes urinaires ont été caractérisés sur la base d'analyses HPLC comme co-migrant avec la 2Ø-OH-ecdysone, l'ecdysone, l'inokostérone et la makistérone.

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE