

50376
1989
231

50376
1989
231

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

Année 1989

N° d'ordre : 439

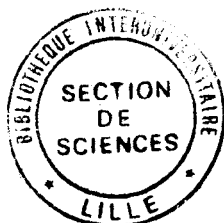
THÈSE DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ

présentée à l'Université de Lille I pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN BIOCHIMIE

par

Marylène HUBLART-SINSOILLIER



HYPOGONADISME ET TRYPANOSOMIASE AFRICAINE

Présentée le 17 Novembre 1989 devant la Commission d'Examen

JURY

Président : Professeur Marian JUTISZ
Rapporteurs : Professeur Nestor VAN MEIRVENNE
Professeur Jean-Paul DUPOUY
Examineurs : Professeur Arnold BOERSMA
Professeur Pierre DEGAND

Nos recherches ont bénéficié des aides financières

- * du programme spécial PNUD/Banque mondiale/OMS de recherche et de Formation concernant les Maladies tropicales (T 70 18123),
- * de la Commission des Communautés Européennes (TSD-146-F (MR)),
- * de la Fondation pour la Recherche Médicale Française,
- * et de l'UER de Médecine de l'Université de Lille II.

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

Ce travail a été réalisé à l'unité des Protéines Normales et Pathologiques (Unité I.N.S.E.R.M. N°16) dirigée par Monsieur le Professeur P. DEGAND.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur P.ROUSSEL d'avoir accepté de me recevoir pour mon stage de DEA et ensuite pour mon doctorat à l'unité.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur J.MONTREUIL pour m'avoir dispensé des enseignements de qualité au cours de mes études.

J'exprime tous mes remerciements,

à Monsieur le Professeur P.DEGAND

qui m'a accueillie dans son laboratoire et prodigué conseils et encouragements au cours de ces années de préparation de thèse.

à Monsieur le Professeur M. JUTISZ

dont la compétence en neuroendocrinologie est telle que je suis particulièrement honorée de le compter parmi mes juges.

à Monsieur le Professeur N. VAN MEIRVENNE

d'avoir accepté de juger ce travail qui n'a pu être réalisé que grâce à sa collaboration.

à Monsieur le professeur A. BOERSMA

qui m'a apporté aide et soutien durant ces années de thèse, vos conseils m'ont toujours été précieux.

à Monsieur le Professeur J.P. DUPOUY

d'avoir pris sur son temps temps pour juger ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement

Madame le Professeur L.MENDONÇA-PREVIATO pour ses qualités scientifiques et humaines durant les deux années que vous avez passées en France.

Monsieur D. TETAERT qui depuis mon DEA et durant toutes ces années de préparation de thèse a su m'apporter conseils et encouragements.

Monsieur le Professeur A. RACADOT ainsi que tout le personnel technique du laboratoire de biochimie endocrinologique USN A pour les dosages radioimmunologiques des gonadostimulines humaines.

Madame D. CROIX pour la réalisation et la mise au point des dosages radioimmunologiques des gonadostimulines sériques et hypophysaires de rats.

Monsieur G. TRAMU qui a contribué au travail de microscopie optique avec la participation de Monsieur PILLEZ.

Tous les membres de l'équipe qui à des titres divers m'ont accordé leur aide et leur amitié et qui par leur sympathie ont facilité mon intégration au sein du laboratoire.

Monsieur M. HUBLART, mon époux, qui a dactylographié cette thèse avec beaucoup de patience, de gentillesse et avec compétence. Je t'en remercie profondément.

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

1- PUBLICATIONS

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

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

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

- * Fonction endocrine et trypanosomiase africaine.

M.HUBLART, L.LAGOUCHE, A.RACADOT, A.BOERSMA, P.DEGAND,
F.NOIREAU, J.L.LEMESRE and A.TOUDIC (1988)

BULL. SOC. PATH. EX. 81. 468-476.

- * Presence of a lipophosphoglycan in two variants of Trypanosoma brucei brucei

M.HUBLART, D.TETAERT, L.MENDONÇA-PREVIATO and P.DEGAND
(1988)

BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMM. 153, 1257-1266.

- * Molecular heterogeneity of the isolated surface glycoprotein from variant AnTat 1.1 of Trypanosoma brucei brucei.

F.BOUTIGNON, M.HUBLART, V.GOMES, L.MENDONÇA-PREVIATO,
D.TETAERT, G.HUET-DUVILLIER and P.DEGAND.(1988)

BIOLOGY OF THE CELL. 64. 131-135.

- * Evidence of myristylated disulfide-linked dimer of variant surface glycoprotein of Trypanosoma brucei brucei.

M.HUBLART, L.MENDONÇA-PREVIATO, F.BOUTIGNON,
G.HUET-DUVILLIER and P.DEGAND.(1989)

COMP.BIOCHEM.PHYSIOL. 92B, 705-710.

- * Gonadotropic axis and Trypanosoma brucei gambiense infection

A.BOERSMA, F.NOIREAU, M.HUBLART, F.BOUTIGNON,
J.L.LEMESRE, A.RACADOT and P.DEGAND.(1989)

SOC.BELGE MED.TROP. 69,

- * Alterations in thyroid function in patients with Trypanosoma brucei gambiense infection.

A.BOERSMA, M.HUBLART, F.BOUTIGNON, F.NOIREAU,
J.L.LEMESRE, M.D'HERBOMEZ and P.DEGAND.(1989)

TRANS.ROYAL.SOC.TROP.MED.HYG. 83, 208-209.

- * Reversed phase HPLC of different membrane-bound variant surface glycoprotein preparation from Trypanosoma brucei brucei.

D.TETAERT, M.HUBLART, V.GOMES, A.BOERSMA and
P.DEGAND.(1989)

BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY. 3, 53-57.

- * Gonadotropic dysfunction produced experimentally by Trypanosoma brucei brucei in rat.

M.HUBLART, D.TETAERT, D.CROIX, F.BOUTIGNON, P.DEGAND
and A.BOERSMA.(1989)

Article soumis au comité de lecture de la revue
"Acta.Tropica."

2- COMMUNICATIONS

a) Colloque du groupement des protistologues de la langue française: LA ROCHELLE -Mai 1985-

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

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

b) Colloque du groupement des protistologues de la langue française : BARCELONE -Mai 1986-

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

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

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

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

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

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

c) Forum des jeunes chercheurs: TOULOUSE -Juillet 1986-

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

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

d) IX^{ème} Symposium of glycoconjugates: LILLE-Juillet 1987-

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

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

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

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

PLAN

CHAPITRE I GENERALITES

I) <u>INTRODUCTION</u>	p:9
II) <u>CLASSIFICATION ET BIOLOGIE GENERALE DES TRYPANOSOMES</u>	p:9
A) <u>CLASSIFICATION</u>	p:9
B) <u>BIOLOGIE ET MORPHOLOGIE</u>	p:10
1) <u>Caractère morphologique</u>	p:10
2) <u>Cycle évolutif</u>	p:12
a) <u>Chez l'hôte</u>	p:12
b) <u>Chez l'insecte vecteur</u>	p:12
III) <u>ASPECTS CLINIQUES DES TRYPANOSOMIASES</u>	p:14
A) <u>POUVOIR PATHOGENE - VIRULENCE</u>	p:15
B) <u>PHASES EVOLUTIVES DE LA MALADIE</u>	p:15
1) <u>Trypanosomiase à T.b.gambiense</u>	p:17
a) <u>Phase lymphatico-sanguine</u>	p:17
b) <u>Phase de polarisation cérébrale</u>	p:18
c) <u>Evolution sous traitement</u>	p:19
a) <u>Lors de la phase de généralisation</u>	p:19
b) <u>Lors de la phase de polarisation cérébrale</u>	p:19
2) <u>Trypanosomiase à T.b.rhodesiense</u>	p:19
IV) <u>TROUBLES ENDORINIENS RENCONTRES AU COURS DES TRYPANOSOMIASES AFRICAINES</u>	p:21
A) <u>MANIFESTATIONS ENDOCRINIENNES CHEZ L'ANIMAL</u>	p:21
1) <u>Chez les mâles</u>	p:21
a) <u>Retentissements histopathologiques</u>	p:21
b) <u>Modifications de l'équilibre endocrinien</u>	p:22
2) <u>Chez les femelles</u>	p:23
a) <u>Troubles du cycle ovarien</u>	p:23
b) <u>Troubles de la gestation</u>	p:23
B) <u>MANIFESTATIONS ENDOCRINIENNES CHEZ L'HOMME</u>	p:26
1) <u>Observations cliniques</u>	p:26
a) <u>Chez l'homme</u>	p:26
b) <u>Chez la femme</u>	p:26
2) <u>Modifications de l'équilibre endocrinien</u>	p:26
VI) <u>ETUDE DES HORMONES HYPOTHALAMO-ANTEHYPOPHYSIAIRE</u>	p:28
A) <u>AXE HYPOTHALAMO-ANTEHYPOPHYSIAIRE</u>	p:28
B) <u>HORMONES GONADOTROPES</u>	p:28
1) <u>Hormone hypothalamique (LH-RH)</u>	p:28
2) <u>Hormones gonadotropes</u>	p:33
a) <u>Structure des gonadotrophines</u>	p:33

* Structure polypeptidique	p:33
* Structure glycanique	p:37
* Intéraction des sous-unités	p:40
* Polymorphisme	p:42
b) Relation structure fonction des gonadotropines	p:43
CHAPITRE II TRAVAUX PERSONNELS	p:46
I) <u>ETUDES DES DESEQUILIBRES ENDOCRINIENS DE SUJETS HUMAINS ATTEINTS DE TRYPANOSOMIASES</u>	p:46
A) <u>RESULTATS DES BILANS GONADIQUES DE PATIENTS ATTEINTS DE TRYPANOSOMIASE CHRONIQUE PAR T.b.gambiense</u>	p:47
1) <u>Bilan endocrinien chez la femme parasitée</u>	p:47
a) Dosage radioimmunologique de l'oestradiol	p:47
b) Dosage radioimmunologique des gonadostimulines	p:48
2) <u>Bilan endocrinien chez l'homme parasité</u>	p:48
a) Dosage radioimmunologique des hormones stéroïdiennes sexuelles	p:48
b) Dosage radioimmunologique des gonadostimulines	p:49
B) <u>EPREUVES DE STIMULATION GONADOTROPE HYPOPHYSAIRE</u>	p:50
1) <u>Stimulation gonadique</u>	p:50
2) <u>Stimulation hypophysaire</u>	p:52
C) <u>DOSAGE DE LA PROLACTINE</u>	p:52
D) <u>CONCLUSION</u>	p:54
II) <u>ETUDES DES DESEQUILIBRES ENDOCRINIENS SUR MODELE EXPERIMENTAL RAT-Trypanosoma.brucei.brucei</u>	p:55
A) <u>MISE EN EVIDENCE D'UN DESEQUILIBRE HORMONAL CHEZ LE RAT APRES INFESTATION PAR T.b.brucei variant AnTat 1.1 A</u>	p:56
1) <u>Matériel et méthodes</u>	p:57
a) Sexes et conditions d'élevage des animaux	p:57
b) Prélèvement des tissus	p:57
2) <u>Etudes des dysfonctions endocriniennes lors d'une infestation aigüe par T.b.brucei variant AnTat 1.1 A chez le rat mâle "agé"</u>	p:57
a) Infestation	p:57
b) Expression des résultats concernant les variations des taux hormonaux tissulaires et sériques	p:58
c) Résultats	p:61
a) Dosages radioimmunologiques des hormones stéroïdiennes sexuelles	p:61
* Oestradiol	p:61
* Testostérone	p:61
β) Dosage radioimmunologiques des gonadostimulines	

sériques	p:63
* LH	p:63
* FSH	p:65
δ) Dosage radioimmunologique des gonadostimulines hypophysaires	p:66
* LH hypophysaire	p:66
* FSH hypophysaire	p:66
ø) Dosage radioimmunologique de la gonadolibérine	p:66
d) Conclusion	p:68
3) <u>Etudes des dysfonctions endocriniennes sur jeunes rats après infestation aigüe par Trypanosoma.brucei.brucei variant AnTat 1.1 A</u>	p:69
a) Matériel biologique animal et mode d'infestation	p:69
b) Résultats	p:69
α) Dosages radioimmunologiques des hormones stéroïdiennes sexuelles	p:69
* Dosage de l'oestradiol	p:69
* Dosage de la testostérone	p:71
β) Dosages radioimmunologiques des gonadostimulines sériques	p:71
* Dosage de la LH sérique	p:71
* Dosage de la FSH sérique	p:72
δ) Dosages radioimmunologiques des gonadostimulines hypophysaires	p:73
* Dosage de la LH hypophysaire	p:73
* Dosage de la FSH hypophysaire	p:73
c) Conclusion	p:74
B) <u>ETUDE DES DESEQUILIBRES ENDOCRINIENS SUR RAT INFESTE PAR UNE SOUCHE CHRONIQUE A T.b.brucei VARIANT AnTat 1.1 E</u>	p:77
1) <u>Clonage du variant</u>	p:77
2) <u>Evolution de la parasitémie après infestation</u>	p:79
3) <u>Etude des dysfonctions endocriniennes sur rats agés après infestation chronique par T.b.brucei VARIANT AnTat 1.1 E</u>	
a) Résultats	p:81
α) Dosage radioimmunologique des hormones stéroïdiennes sexuelles	p:81
β) Dosage radioimmunologique de l'hormone luteinisante	
* Dosage de la LH sérique	p:85
* Dosage de la LH hypophysaire	p:85
b) Conclusion	p:86

4) <u>Etude des dysfonctions endocriniennes sur jeunes rats adultes de 45 jours après infestation chronique par T.b.brucei AnTat 1.1 E</u>	p:87
a) Résultats	p:87
a) Dosage radioimmunologique de la testostérone	p:87
b) Dosage radioimmunologique de l'hormone luteinisante	
* Dosage de la LH sérique	p:90
* Dosage de la LH hypophysaire	p:90
b) Conclusion	p:91
5) <u>Conclusions des déséquilibres endocriniens sur modèle rat après infestation par T.b.brucei AnTat 1.1 E</u>	p:91
C) <u>DISCUSSION DES DESEQUILIBRES ENDOCRINIENS CHEZ LE RAT SELON LE TYPE D'INFESTATION</u>	p:92
III) <u>ETUDE DU DESEQUILIBRE ENDOCRINIEN CHEZ LE RAT APRES INJECTION D'UN MATERIEL TRYPANOSOMAL ISOLE</u>	p:95
A) <u>ASPECT BIOCHIMIQUE ET BIOSYNTHESE DES ANTIGENES VARIABLES</u>	
1) <u>Aspect biochimique</u>	p:95
a) Introduction	p:95
b) Isolement et purification de la glycoprotéine de surface	p:96
a) Isolement des parasites	p:96
b) Libération du manteau de surface	p:96
* Libération de la forme soluble	p:96
* Libération de la forme membranaire	p:97
c) Organisation des antigènes variables	p:98
2) <u>Biosynthèse des antigènes variables de surface</u>	p:100
3) <u>Libération des antigènes variables et protéases parasitaires</u>	p:103
B) <u>DESEQUILIBRES ENDOCRINIENS CONSTATES APRES INJECTION D'UN MATERIEL TRYPANOSOMAL</u>	p:105
1) <u>Etude des dysfonctions endocriniennes provoquées par l'injection d'un matériel parasitaire obtenu en présence d'antiprotéases</u>	p:105
a) Préparation du matériel biologique	p:105
b) Effet du culot parasitaire	p:106
a) Dosage des hormones stéroïdiennes sexuelles	p:106
b) Dosage des gonadostimulines	p:108
* Dosage des stimulines sériques	p:108
- LH	p:108
- FSH	p:109
* Dosage des stimulines hypophysaires	p:109

c) Effet d'un surnageant antigénique brut	p:110
α) Dosage des hormones stéroïdiennes sexuelles	p:112
β) Dosages des gonadostimulines	p:112
* Dosage des stimulines sériques (LH, FSH)	p:112
* Dosage des stimulines hypophysaires (LH, FSH)	p:113
2) <u>Etude des dysfonctions endocriniennes provoquées par l'injection d'un matériel parasitaire obtenu sans antiprotéases</u>	p:115
a) Préparation du matériel trypanosomal	p:115
b) Effet du culot parasitaire	p:115
α) Dosage radioimmunologique de la testostérone	p:117
β) Dosage radioimmunologique de l'hormone luteinisante	
* Dosage de la LH sérique	p:117
* Dosage de la LH hypophysaire	p:118
c) Effet d'un surnageant antigénique	p:118
α) Dosage de la testostérone	p:118
β) Dosage de l'hormone luteinisante	p:120
* Dosage de la LH sérique	p:120
* Dosage de la LH hypophysaire	p:120
3) <u>Etude des dysfonctions endocriniennes provoquées par l'injection de fractions antigéniques purifiées</u>	p:121
a) Préparation du matériel biologique	p:121
α) Purification de la forme soluble	p:123
β) Comportement moléculaire en présence de SDS	p:123
δ) Caractérisation immunologique	p:124
b) Conditions d'infestation	p:127
c) Résultats des dosages radioimmunologiques	p:127
α) Dosage de la testostérone	p:127
β) Dosage de l'hormone luteinisante	p:129
* Dosage de la LH sérique	p:129
* Dosage de la LH hypophysaire	p:129
IV) <u>ETUDE DE L'HORMONE LUTEINISANTE EN PRESENCE D'UN MATERIEL TRYPANOSOMAL IN VITRO</u>	p:131
A) <u>RESULTATS</u>	p:131
1) <u>Etude électrophorétique de l'hormone luteinisante de rat marquée à l'iode ¹²⁵I</u>	p:131
2) <u>Etude électrophorétique de l'hormone marquée incubée en présence du culot parasitaire préparé avec ou sans antiprotéases</u>	p:134
a) Effet d'un culot parasitaire pH 5.5 préparé en présence d'antiprotéases	p:134

b) Effet d'un culot parasitaire pH 5.5 préparé sans antiprotéases	p:134
3) <u>Etude électrophorétique de l'hormone marquée incubée en présence de l'extrait antigénique (surnageant pH 5.5) préparé avec ou sans antiprotéases</u>	p:136
a) Effet d'un surnageant pH 5.5 préparé avec antiprotéases	
b) Effet d'un surnageant pH 5.5 préparé sans antiprotéases	
c) Effet du pH sur l'activité protéolytique d'un surnageant pH 5.5 préparé avec ou sans antiprotéases	
4) <u>Action d'un agent réducteur sur l'effet dissociant et protéolytique du matériel trypanosomal sur la LH¹²⁵I</u>	p:140
a) Addition de DTT au matériel trypanosomal préparé sans antiprotéases	p:141
b) Addition de DTT au matériel trypanosomal préparé avec antiprotéases	p:144
B) <u>DISCUSSION</u>	p:150
CONCLUSION	p:155

Les éléments bibliographiques ont été insérés chapitre par chapitre devant la grande diversité des thèmes: aspect endocrinien, synthèse de la connaissance actuelle de la biochimie de l'antigène variable de surface, enzymes parasitaires. Ont été reportés en fin de mémoire, un appendice technique détaillé ainsi que la reproduction d'articles illustrant nos travaux

ABREVIATIONS EMPLOYEES DANS LE MEMOIRE

AnTat	Anvers Trypanozoon antigenic type
AP	Antiprotéases
BSA	Sérumalbumine bovine
CRD	Déterminant de réaction croisée
DEAE	Diaminoéthyl cellulose
DTT	Dithiotréitol
EATRO	East African Trypanosomiasis Research
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
E2	Oestradiol
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GPI PLC	Phospholipase C spécifique du glycophospatidylinositol
hCG	Choriogonadotropine humaine
ILTat	International laboratory for research on animal disease (ILRAD) trypanozoon antigenic type
ITMAS	Institute tropical medecine Antwerp serologie
LH	Hormone lutéinisante
LH-RH	Luteinizing hormone-releasing hormone
LPG	Lipophosphoglycane
mf VSG	Forme membranaire de l'antigène
MITat	Molteno Institute Trypanozoon antigenic type
NEM	N-éthylmaleimide
PBS	Tampon phosphate salin
pHi	Point isoélectrique
PIPLC	Phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
Prl	Prolactine
PSG	Tampon phosphate glucose salin
RIA	Radioimmuno assay
SDS	Dodecyl sulfatate de sodium
sVSG	Forme soluble de l'antigène
TFA	Acide trifluoroacétique
TLCK	N-alpha-p-tosyl-L-lysylchlorométhyl cétone
TSH	Hormone thyrotrope
Tris	2-amino-2-(hydroxyméthyl)1,3-propionate
VSG	Variable surface glycoprotéine
WraTat	Walter Reed Army Trypanozoon antigenic type

CHAPITRE I : GENERALITES

I) INTRODUCTION

La maladie du sommeil sévit à l'état endémique dans diverses régions d'Afrique noire. On évalue à 45 millions le nombre de malades.

Les études épidémiologiques récentes montrent l'aggravation de cette situation : recrudescence de foyers considérés comme éteints, apparition de nouvelles zones, tendance à la banalisation d'une situation qui marque profondément le continent africain tant au plan social qu'économique.

La morbidité et la mortalité animales par parasites contribuent aussi à cette tendance. L'insuffisance de production animale est sans conteste à relier aux 147 millions de bovins, aux 104 millions de moutons, aux 125 millions de chèvres, aux 8 millions de porcs et aux 12 millions d'équidés infestés par trypanosomes (EUZEBY (1986)(33)). Aussi, on estime le déficit à près de la moitié de l'élevage potentiel ce qui contribue au maintien d'une situation de déficit alimentaire.

II) CLASSIFICATION ET BIOLOGIE GENERALE DES TRYPANOSOMES

Les trypanosomiasés africaines, dont l'agent responsable identifié dès 1901 par DUTTON est un protozoaire flagellé sanguicole, affecte l'homme et le règne animal. Tous les continents sont touchés par ce type de parasitose dès que le microenvironnement est favorable (température, humidité, vecteur intermédiaire).

A) CLASSIFICATION

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés de l'ordre Kinetoplastida. Ils appartiennent au sous-ordre Trypanosomatina et à la famille Trypanosomatidae, famille qui se divise en 3 genres : Blastocrithidia, Leishmania et Trypanosoma.

Le genre Trypanosoma peut être subdivisé en 3 groupes selon

l'insecte vecteur (EUZEBY 1986)(33).

* Trypanosomes à glossines

La maladie du sommeil de l'homme, la "nagana" et la "souma" chez l'animal sont dues respectivement à T.b.congolense, T.vivax et T.brucei dont la glossine ou mouche tsé-tsé est le vecteur intermédiaire.

* Trypanosomes à réduvidés

Ce groupe comprend T.cruzi responsable de la "maladie de Chagas" et T.rangeli, parasites présents en Amérique du sud.

* Trypanosomes à tabanidés et stomoxynés

Leur répartition géographique est plus étendue : Amérique centrale, Amérique du sud, Afrique du nord, Asie centrale. T.evansi ainsi que sa variété T.equinum sont les agents responsables dans ces différentes contrées de toute une série d'affections : Sana, Mal de Cadera, Debal, mal de la zoufsana, Baacy-py.

Pour désigner le protozoaire, l'agent pathogène, de nombreux auteurs utilisent la nomenclature de HOARE 1972 (55) (tableau I); à titre d'exemple : T.b.brucei responsable de la "nagana"; T.b.gambiense et T.b.rhodesiense agent de la maladie du sommeil chez l'homme; T.evansi responsable de la "surra" et T.equiperdum de la "dourine". Nous avons retenu ce mode de présentation des parasites et centré notre intérêt sur T.b.gambiense agent chez l'homme d'une trypanosomiase d'évolution chronique en Centre Afrique, et sur T.b.brucei modèle expérimental dont l'expression clinique biologique, est voisine de celle des parasites pathogènes pour l'homme.

B) BIOLOGIE ET MORPHOLOGIE

1) Caractères morphologiques

Les trypanosomes africains sont des protozoaires de forme allongée fusiforme de 10 à 15 µm de longueur sur 2 à 3 µm de largeur. L'existence d'un flagelle plus ou moins développé

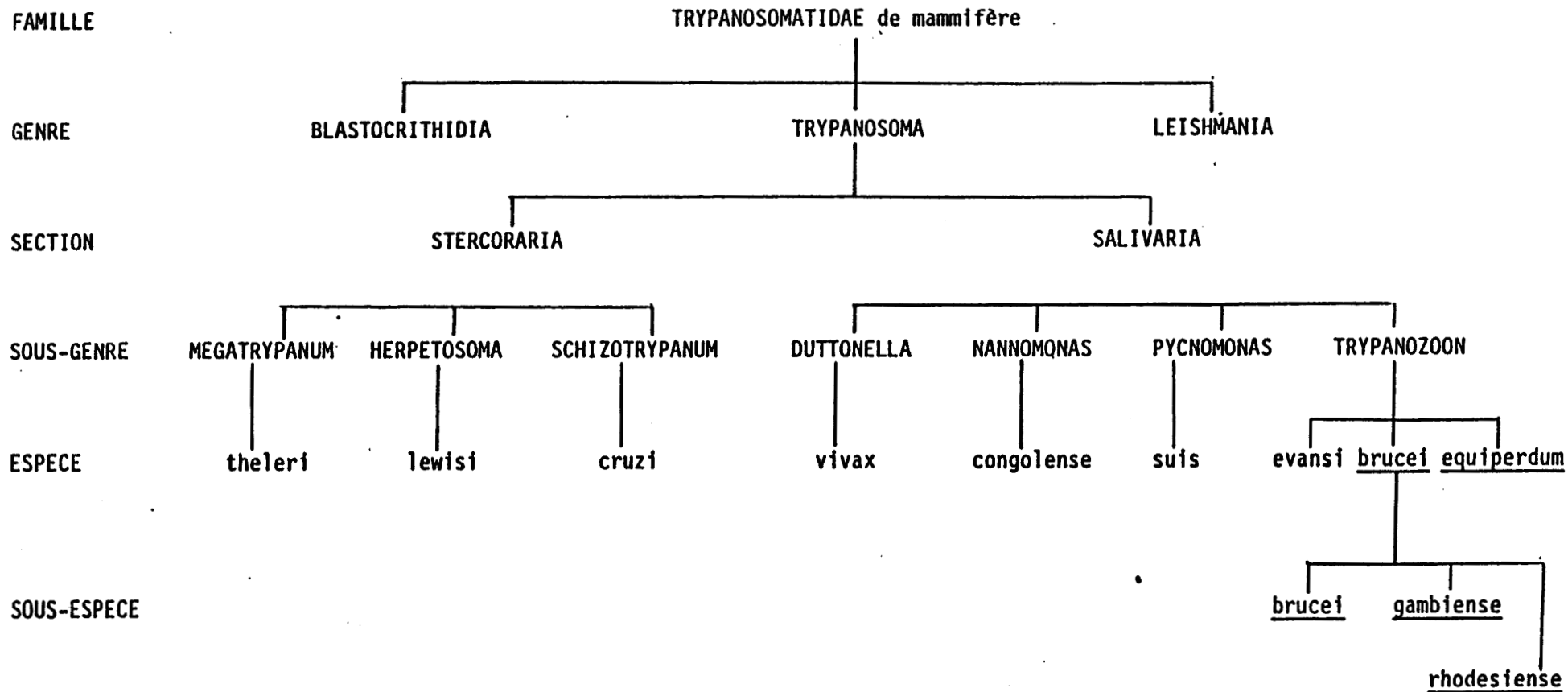


Schéma simplifié de la classification des Trypanosomatidae d'après HOARE (1972)
 ___ : parasites pour lesquels le phénomène de la variation antigénique a été démontré

TABLEAU I

délimite avec le périplasme une membrane ondulante qui permet de distinguer plusieurs stades de différenciation du parasite, tant chez l'insecte vecteur que chez l'hôte définitif. (figure 1 VICKERMAN et coll. 1969 (136)); ces stades représentent le cycle évolutif.

2) Cycle évolutif

a) Chez l'hôte définitif

Inoculés par piqûre chez le vertébré, les parasites se multiplient d'abord localement dans le collagène dermique, et ceci pendant 2 à 3 jours. Au point d'inoculation, ils provoquent la formation d'un "trypanome". Les trypanosomes passent ensuite dans la circulation générale par voie sanguine ou lymphatique avec séjour plus ou moins prolongé dans les noeuds lymphatiques où ils se multiplient.

Les trypanosomes sanguicoles "trypomastigotes" se présentent sous différents aspects morphologiques :

- Une forme allongée (type "slender") avec présence d'un flagelle libre délimitant avec le périplasme une membrane ondulante. Ces formes se multiplient activement, provoquent une forte parasitémie et sont d'une grande pathogénicité.
- Une forme courte massive (type "stumpy") caractérisée par un tube mitochondrial développé et très actif: ces formes massives ne se divisent plus chez l'hôte définitif et représentent un stade de "préadaptation" à l'hôte intermédiaire. Elles sont en effet les seules à pouvoir se développer chez l'insecte vecteur qui se contaminera lors d'un repas sanguin par piqûre d'un mammifère infesté.
- Des formes intermédiaires enfin, représentatives de l'évolution des formes élancées vers les formes courtes.

b) Chez l'insecte vecteur

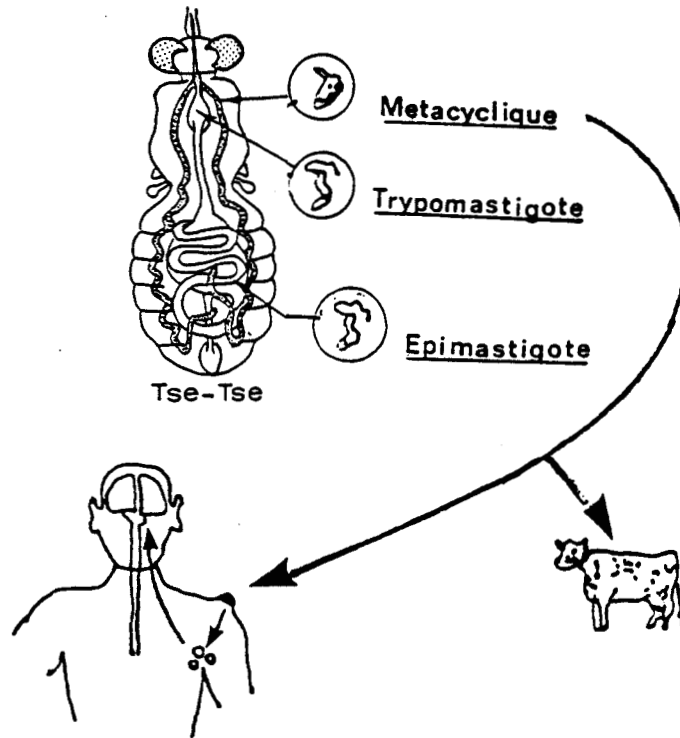
Selon l'espèce parasitaire considérée, l'évolution chez l'insecte vecteur peut être différente mais elle est toujours,

A Les trypanosomes absorbés par la glossine séjournent en premier lieu dans le jabot de l'insecte , les trypomastigotes précédant les formes procycliques pénètrent l'intestin moyen où ils se multiplient activement et de là dans les glandes salivaires les trypomastigotes se multiplient sous formes épimastigotes qui dans la trompe deviendront des trypanosomes métacycliques.

B La variation antigénique s'accompagne d'une modification morphologique des parasites.les formes allongées et grêles conservent leurs glycoprotéines de surface , tandis que les formes courtes et trapues capables de transformation persistent dans l'organisme en se multipliant lentement et pourront infecter la glossine.

CYCLE ÉVOLUTIF DES TRYPANOSOMES
AFRICAINS

A



CYCLE ÉVOLUTIF DE TRYPANOSOMA BRUCEI
(VICKERMAN (1969) (336))

B

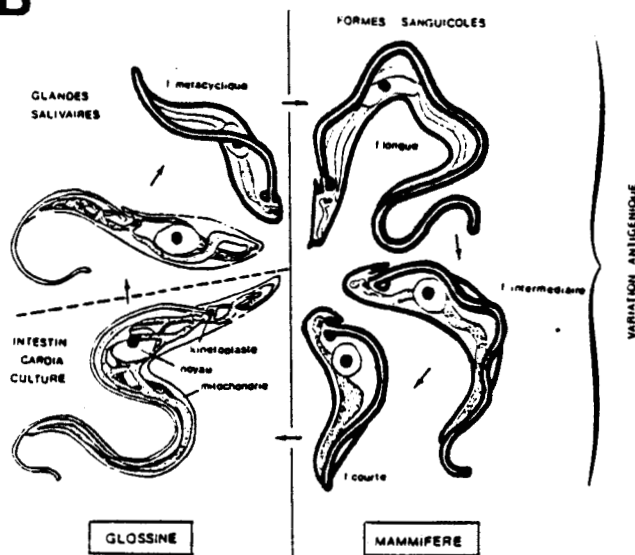


FIGURE 1

pour T.b.brucei, initiée par des formes "procycliques". (figure 1). La multiplication de ces formes se traduit par une évolution vers une forme épimastigote dont la morphologie se caractérise d'une part par la présence d'un kinétoplaste situé en avant du noyau et distant de l'extrémité postérieure du flagelle et d'autre part par un réseau extensif de tubes mitochondriaux. L'absence du manteau de surface (constitué d'une monocouche de glycoprotéines étroitement associées), est également un élément caractéristique de ce stade.

Les trypanosomes tout en évoluant sur le plan morphologique, continuent à se diviser pour atteindre progressivement le tube digestif antérieur de l'insecte, puis les glandes salivaires.

Les parasites sont alors à l'état métacyclique, stade caractérisé par un noyau central, un kinétoplaste rétronucléaire proche de l'extrémité postérieure du flagelle et enfin un manteau de surface recouvrant la totalité de la membrane plasmique.

Les insectes demeurent infectants pendant toute leur vie. Ils abritent les parasites et assurent leur multiplication.

Ce schéma général peut être cependant très différent. Nous citerons le cas de :

* T.equiperdum, transmis directement par contact sexuel

* T.evansi transmis de façon "mécanique" par les tabanidés et les stomoxynes. Dans ce cas, il n'existe pas d'évolution chez l'insecte vecteur, la survie des trypanosomes à la surface des pièces buccales de l'insecte étant très courte, seuls les insectes effectuant des repas fréquents seront capables d'assurer la transmission des parasites.

III) ASPECTS CLINIQUES DES TRYPANOSOMIASES

La trypanosomiase africaine peut revêtir différents schémas évolutifs : forme aiguë, forme d'évolution chronique parfois même forme tolérée ; pathogénicité, virulence, évolution, morbidité sont variables selon les protozoaires et même à l'intérieur d'un groupe nosologique.

A) POUVOIR PATHOGENE. VIRULENCE

Deux notions sont de première importance :

* la première notion, essentielle en terme d'épidémiologie est que les trypanosomes pathogènes sont peu spécifiques d'espèce. Ce manque relatif de spécificité a comme conséquence le fait que certains trypanosomes d'animaux ont pu s'adapter chez l'homme (T.b.rhodesiense), et que d'autres infectant naturellement l'homme, pourraient contaminer l'animal (T.b.gambiense). Cette observation fondamentale mène actuellement à considérer avec prudence l'existence d'un "réservoir" strictement humain pour la trypanosomiase humaine

* la seconde s'attache à la définition clinique de la trypanosomiase qui peut évoluer selon deux schémas distincts :

- une forme aiguë au cours de laquelle la multiplication intense des parasites entraîne la mort rapide de l'hôte.

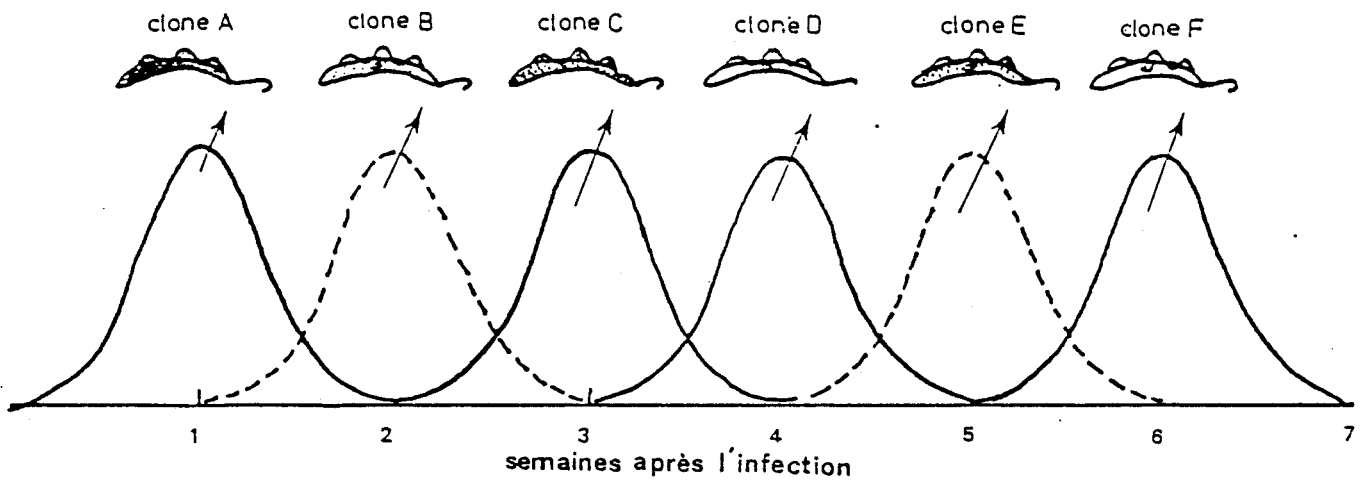
- une forme chronique caractérisée par des ondes successives de prolifération parasitaire dans le sang de l'hôte. Le système immunitaire étant sollicité pour produire des anticorps dirigés contre un type antigénique dominant, la population parasitaire majeure se trouvera éliminée. Une nouvelle population parasitaire présentant une antigénicité de surface différente, se développe alors, jusqu'à ce que le système immunitaire produise de nouveaux anticorps dirigés contre ces antigènes. Ce schéma pourra se répéter plusieurs fois au cours d'une évolution chronique (figure 2).

Les bases moléculaires et génétiques pour expliquer ces différences dans l'expression de la virulence du parasite (forme aiguë, forme chronique), sont encore inconnues. Toutefois, de récents travaux de INVERSO et coll. 1988 (62), ont montré que la virulence n'était pas associée à l'expression d'un type antigénique particulier.

B) PHASES EVOLUTIVES DE LA MALADIE PARASITAIRE

Les phases évolutives de la maladie du sommeil ont été précisées par GALLAIS et BADIÉ 1952 (43). Deux périodes peuvent être distinguées :

APPARITION DES DIFFERENTS VARIANTS AU COURS D'UNE
INFESTATION CHRONIQUE.
(DONELSON ET TURNER 1985 (30))



Les ondes successives de prolifération parasitaire résultent des variations antigéniques.

Une population parasitaire portant un antigène particulier (VSG A) prolifère durant plusieurs jours avant d'être éliminée par les anticorps produits par l'hôte . Quelques individus survivent en exprimant des antigènes différents (VSG B). Ce cycle se répète plusieurs fois au cours d'une infestation chronique par les parasites qui expriment sans cesse de nouveaux.

A partir de chaque population on peut isoler certains trypanosomes, les cloner, pour obtenir des individus exprimant le même VSG.

FIGURE 2

- première période : phase de généralisation ou phase lymphatico-sanguine. (phase P1)
- deuxième période: phase de polarisation cérébrale. (phase P2)

Dans ce cadre, T.b.gambiense et T.b.rhodesiense développent une symptomatologie différente.

1) Trypanosomiase à T.b.gambiense

a) Phase lymphatico-sanguine

La forme classique de la maladie débute généralement par une "phase d'invasion" qui se situe entre la piqûre infestante par la glossine et les premières manifestations cliniques. La piqûre par l'insecte laisse une zone prurigineuse de taille variable qui disparaîtra assez rapidement. L'incubation sera généralement silencieuse durant 5 à 20 jours, puis le début de la phase de généralisation se marquera chez la plupart des malades par des céphalées irrégulières en durée et en intensité. Elles sont accompagnées de façon constante par des troubles de la thermorégulation: hyperthermie ou hypothermie. L'hyperthermie est résistante aux antipyrétiques et aux antibiotiques. Les signes physiques apparaissent alors progressivement avec en particulier les signes d'une réaction du système réticulo-endothélial tant au niveau des ganglions qu'au plan hépatique ou même splénique.

- Les ganglions les plus fréquemment hypertrophiés siègent dans la région sus-claviculaire. Ces adénopathies sont d'importance et de taille variables.

- La rate présente une inflammation précoce, elle est alors sensible à la palpation et sera rapidement résolutive sous thérapeutique,

- enfin, l'hépatomégalie se caractérise par un foie mou qui demeure indolore et qui sera moins facilement résolutif que la rate sous traitement.

Les troubles cutanés avec des réactions de type "hypersensibilisation retardée" qui témoignent de la dissémination des trypanosomes dans l'ensemble de l'organisme, ainsi que des signes cardiovasculaires, souvent précoces, témoignent de

l'infiltration lympho-plasmocytaire rapide de l'interstitium myocardique et péricardique (LABUSQUIERE et coll. 1971 (80)).

Ignorée, souvent négligée, cette phase de généralisation s'acheminera vers la phase de "polarisation cérébrale" où prédominent les signes d'encéphalite végétative.

b) Phase de polarisation cérébrale

Tout comme la première phase, le stade de polarisation cérébrale correspond à une adaptation parasitaire. Le protozoaire quitte totalement le sang où il ne sera plus possible de l'observer.

Les troubles diencéphalo-endocriniens déjà latents et même reconnus pendant la phase de généralisation, deviennent majeurs. Les symptômes d'une atteinte inflammatoire du tronc cérébral et du diencéphale, centre régulateur des grandes fonctions végétatives, sont marqués par l'apparition :

- de troubles du sommeil (insomnie nocturne et somnolence diurne)
- de troubles de l'appétit (boulimie mais le plus souvent anorexie)
- de troubles du comportement: modification caractérielle (succession d'états dépressifs et de phases d'excitation)
- ~~de~~ troubles moteurs qui se manifestent par des mouvements anormaux, pseudo-parkinsoniens avec perte de mouvements associés
- de troubles neuro-endocriniens enfin, qui montrent alors l'atteinte de l'axe diencéphalo-hypophysaire. Le syndrome se manifeste par l'association de troubles de la régulation thermique, de la soif, mais aussi par des stérilités. Une insuffisance thyroïdienne d'origine hypophysaire est fréquente.

Peu à peu la symptomatologie s'aggrave et cette phase difficile à traiter évolue vers la phase terminale où l'état général est alors compromis. Le malade s'achemine vers la mort dans un état de coma avec hypothermie sévère. L'évolution fatale se fera en quinze à vingt jours, elle sera plus rapide en cas de complications rénales, cardiaques, infectieuses qui ne viennent pas aggraver le tableau clinique.

c) Evolution sous traitement

Selon le moment où la thérapeutique est mise en place, l'évolution est différente.

α) Lors de la phase de généralisation

Si la thérapeutique est entreprise dès le début de la maladie, l'évolution est favorable sans séquelle.

Les troubles inflammatoires seront considérés avec soin, ils imposent souvent un traitement qui limitera l'atteinte générale amenant alors le plus souvent une régression complète en 15 jours à 1 mois.

β) Lors de la phase de polarisation cérébrale

L'évolution est favorable après un traitement bien conduit. Néanmoins on peut assister à des rechutes cliniques qui peuvent être réversibles mais qui, parfois, conduiront à une symptomatologie grave, retardée ou limitée dans son expression thérapeutique. Dans ces cas, le pronostic sera réservé.

2) Trypanosomiase à T.rhodesiense

La phase initiale est analogue à celle de la trypanosomiase à T.b.gambiense précédemment décrite: la phase de généralisation très sévère se manifeste par une fièvre intense, une atteinte cardiaque, des complications pulmonaires et des troubles hépatiques avec altération rapide de l'état général.

Le plus souvent cette évolution grave ne laisse pas le temps à une phase de polarisation cérébrale de s'installer et le malade évoluera rapidement vers une phase terminale assez semblable à celle décrite plus haut pour T.b.gambiense. Ainsi, seule des notions de rapidité évolutive séparent les deux formes cliniques. L'évolution vers la mort intervient en trois à six mois et les troubles psychiques n'auront généralement pas le temps de s'exprimer.

L'essentiel physio-pathogénique dans les deux formes cliniques ici résumées, correspond selon EUZEBY 1986 (33), à un processus "Toxi-infectieux" dont l'origine serait la formation d'immun-complexes qui seraient responsables d'une inflammation de l'endothélium vasculaire et aussi de l'apparition de thrombus constitués de "caillots" formés de trypanosomes agglutinés spontanément sous l'effet d'anticorps.

L'auteur suggère aussi l'importance de l'indole-éthanol et la responsabilité d'activités de neuraminidases et de phospholipases d'origine parasitaire dans l'apparition de catabolites toxiques responsables de l'état sommeilleux et de l'anémie des malades. La sécrétion d'une "toxine" hémolytique par le parasite est évoquée. Elle expliquerait toute une série d'observations expérimentales :

- expérience de marquage d'hématies au ^{51}Cr qui, injectées à des souris saines ou parasitées par T.b.brucei, disparaissent plus rapidement de la circulation sur souris infestées

- expériences menées in vitro qui montrent qu'il est possible de déclencher une hémolyse lorsque des hématies sont incubées en présence d'un plasma de trypanosomé. (TIZARD et HOLMES 1976 (132); HUAN et coll. 1976 (56)).

Au total il reste

- de la clinique
- des premières expérimentations,
- des premières hypothèses pathologiques,

que l'on pressent l'importance du dialogue hôte-parasite dans l'expression de la parasitose.

Nous avons personnellement centré notre intérêt sur un aspect de cette pathologie très complexe: le désordre endocrinien. Il nous paraît essentiel comme élément représentatif, comme modèle d'étude. Il offre aussi l'avantage d'une démarche expérimentale in vivo et in vitro.

IV) TROUBLES ENDOCRINIENS RENCONTRES AU COURS DE LA TRYPANOSOMIASE AFRICAINE

Des manifestations endocriniennes d'ordre thyroïdien ou gonadotrope ont été observées aussi bien chez l'animal que chez l'homme.

A) MANIFESTATION ENDOCRINIENNE CHEZ L'ANIMAL

1) Chez le mâle

a) Retentissements histopathologiques

Au plan tissulaire, les désordres atteignant la fonction gonadique ont été initialement décrits au cours de trypanosomiasés expérimentales chez l'animal.

Un des tous premiers travaux sur animaux trypanosomés a été effectué par IKEDE et LOSOS 1972 (60) qui montre la présence à la fois de parasites et de lésions au niveau du cerveau et de l'hypophyse sur des moutons infestés par un stock de T.b.brucei.

En 1979, IKEDE (57) étudie les lésions génitales de béliers infestés par T.b.brucei. L'étude histologique montre que le cordon spermatique, l'épididyme et la tunica vaginalis des animaux présentent une inflammation granulomateuse très importante, dans laquelle sont retrouvés en quantité abondante des trypanosomes, l'évolution conduisant à une dégénérescence testiculaire. Ces observations étaient aussi confirmées sur d'autres animaux par différents protocoles et différents auteurs : singes, moutons et lapins (PERUZZI 1928 (111); IKEDE 1979 (57); IKEDE et AKPAVIE 1982 (58)).

ANOSA et KANEKO 1984 (3), ont montré par microscopie électronique que l'infestation de souris par T.b.brucei produisait une dégénérescence testiculaire également très importante avec une diminution du poids testiculaire et du diamètre des tubes séminifères (Tableau II).

TABLEAU II
MODIFICATIONS TESTICULAIRES DE SOURIS
INFESTÉES PAR TRYPANOSOMA BRUCEI.
(ANOSA ET KANEKO 1984 (3))

souris	poids testiculaire (g)	diamètre des tubes séminifères (µm)
contrôle		
(n = 11)	0.238 ± 0.046	217.0 ± 6.8
infestées		
(n = 23)	0.092 ± 0.016	119.4 ± 7.9

Les cellules de Sertoli présentaient une vacuolisation importante avec accumulation de matériel phagocytaire, une diminution de la taille de leurs mitochondries ainsi que du nombre de grains de sécrétion. Ces parasites n'étaient pas retrouvés dans la lumière des tubes séminifères mais dans l'espace intertubulaire siège d'une réaction inflammatoire intense.

Ainsi en règle générale, la trypanosomiase peut conduire à une atrophie de la glande testiculaire accompagnée d'une aspermie (ANOSA et ISOUN 1980 (2); KAAYA et ODUOR-OKELO 1980 (67); MASAKE 1980 (93); ANOSA 1983 (1)).

Si de nombreux travaux ont été consacrés aux retentissements histopathologiques, notamment sur les testicules, peu se sont intéressés à l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique et à son mode de fonctionnement.

b) Modification de l'équilibre endocrinien

Sur le plan expérimental, LOSOS et IKEDE 1972 (89), ont émis l'hypothèse que les lésions d'atrophie testiculaire seraient secondaires à une diminution de la production de testostérone.

WAINDI et coll. 1986 (138), ont observé des variations du taux de la testostérone plasmatique chez des béliers infestés par T. congolense.

Les résultats ont montré une baisse du taux de testostérone tant

en intensité (tableau III) qu'en fréquence, avec dégénérescence testiculaire et lésions sévères au niveau de l'épididyme.

Les trypanosomes auraient, d'après les auteurs, un effet direct sur les testicules et ceci par des facteurs hémapoïétiques produits ou induits par les parasites, entraînant ainsi une mauvaise réponse de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

2) Chez les femelles

a) Troubles du cycle ovarien

Les études menées par MUTAYOBA et coll. 1988 (104), sur des chèvres plus ou moins résistantes à l'infestation par T.b.congolense, ont montré que tous les animaux présentaient des cycles ovariens irréguliers. Une interruption complète dès le second cycle est observée pour les chèvres les plus sensibles à l'infestation et au quatrième cycle pour les plus résistantes.

Au plan biologique, les taux de progestérone et de 17 β -oestradiol étaient diminués de façon significative et ce quel que soit la résistance de l'animal à l'infection (Figure 3).

b) Troubles de la gestation

Des avortements ont souvent été observés dans les évolutions cliniques d'animaux trypanosomés (LEEFLANG 1975 (84)).

La présence de kystes ovariens comportant de nombreux trypanosomes chez des brebis expérimentalement infestées par T.vivax, a été rapporté par ISOUN et ANOSA 1974 (63).

*) d'après IKEDE et coll. 1988 (59), ces avortements prématurés résulteraient d'un déséquilibre hormonal provenant de l'atteinte hypophysaire et des troubles de la thermorégulation sur la conception.

Les parasites sont rarement retrouvés chez le fœtus ou le nouveau né.

*) des études menées par OGWU et coll. 1985 (107), sur des génisses infestées par T.vivax ont montré que si l'infestation s'effectuait durant le premier trimestre de la gestation, il en résultait sur 4 animaux, un avortement et 3 délivrances normales.

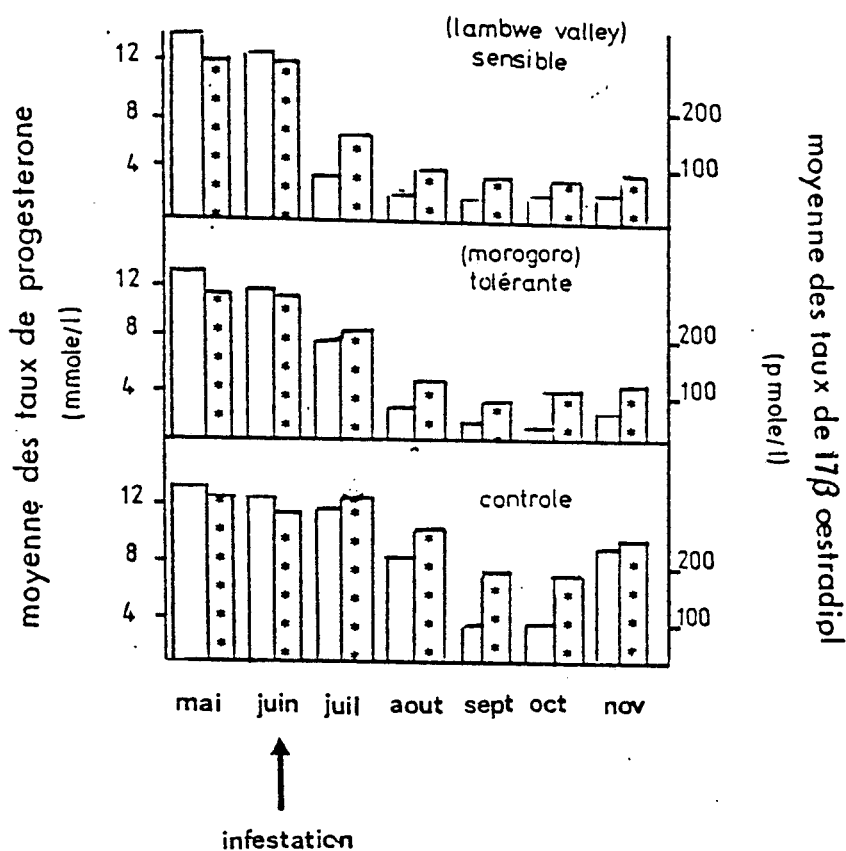
TABLEAU III

VARIATION DES TAUX DE TESTOSTERONE PLASMATIQUE DES
BELIERS INFESTES PAR T.congolense.
(WAINDI et Coll.(1986)(138)

BELIERS	PRISES D'ESSAI	TAUX DE TESTOSTERONE ± ECART TYPE nmole/l
<u>CONTROLES</u>		
A	19	3.55 ± 4.35
B	19	2.66 ± 2.34
C	19	5.88 ± 8.69
D	19	5.28 ± 8.59
	MOYENNE	4.34 ± 6.47
<u>INFESTES</u>		
1	19	0.76 ± 0.51
2	14	1.62 ± 2.64
3	10	0.74 ± 0.41
4	19	1.18 ± 1.41
	MOYENNE	1.08 ± 1.53

La diminution des taux de testostérone après infestation est significative $P < 0.01$ par la méthode de STUDENT-FISCHER.

TAUX MENSUELS DE PROGESTERONE ET 17 β -OESTRADIOL CHEZ
DES CHEVRES INFESTEES ET NORMALES
(MUTAYOBA ET COLL 1988 (104))



□ progesterone
*** 17 β oestradiol

Les taux de progesterone des chèvres infestées diminuent de façon significative à partir du mois de juillet soit 3 mois après l'infestation. Ceci est également valable pour les taux de 17 β -oestradiol significativement abaissés jusqu'au mois de novembre.

FIGURE 3

Si l'infestation était menée lors du deuxième trimestre de la gestation, la mise bas s'effectuait normalement. Enfin sur 4 génisses infestées durant le troisième trimestre de la gestation, trois animaux normaux et un veau mort rapidement après terme étaient observés.

B) MANIFESTATIONS ENDOCRINIENNES CHEZ L'HOMME

1) Observations cliniques

a) Chez l'homme

Chez l'homme trypanosomé, les manifestations sont caractérisées par des orchites et des périorchites (APTED 1970 (4)). L'impuissance, la stérilité sont des éléments cliniques fréquents au cours de la trypanosomiase africaine.

b) Chez la femme

Les désordres endocriniens chez la femme trypanosomée se manifestent par des cycles ovariens irréguliers, une stérilité ou une infertilité. L'infection durant la grossesse peut engendrer la mort du fœtus, des avortements ou encore la mort du nouveau né à la naissance.

MACFIE 1913 (91), fut l'un des premiers à observer l'existence d'aménorrhées chez 24% des femmes trypanosomées.

RIDET 1953 (117), a mis en évidence, par des études de frottis vaginaux, une dysrégulation hormonale ovarienne qui pourrait être secondaire à un dysfonctionnement hypophysaire.

EDINGTON et GILLES 1969 (31), ont d'ailleurs suggéré l'intervention de la glande pituitaire pour expliquer un pan hypopituitarisme clinique observé souvent dans la dernière phase de la maladie.

2) Modification de l'équilibre endocrinien

EMEH et NDUKA 1986 (32) se sont intéressés au taux de gonadotrophines dans le sang circulant chez des sujets humains

atteints de la maladie du sommeil (T.b.gambiense). Les taux d'hormone folliculo-stimulante (FSH) et d'hormone lutéinisante (LH) se sont révélés très diminués lors de l'infection. Par contre, après traitement par antrypol (suramine B.P) et arsobal (Mel B), une réversibilité des taux d'hormones était observée (tableau IV).

TABLEAU IV
TAUX PLASMATIQUES DE FSH ET LH CHEZ DES SUJETS
TEMOINS ET DE PATIENTS ATTEINTS DE LA MALADIE
DU SOMMEIL OU EN VOIE DE GUERISON
(EMEH ET NDUKA 1986 (32))

	FSH plasmatique (UI/l)	LH plasmatique (UI/l)
témoins	3.94 ± 1.78	14.91 ± 5.82
patients avec trypanosomiase évoluée	2.16 ± 0.75	7.53 ± 3.13
patients traités en voie de guérison	3.75 ± 1.73	15.1 ± 4.98

Les faibles taux de gonadotrophines pourraient expliquer: l'impuissance, la stérilité observées chez les malades. La réversibilité des perturbations testiculaires sous traitement témoignent de l'absence de lésions tissulaires graves en dehors de la réaction inflammatoire locale.

V) ETUDE DES HORMONES HYPOTHALAMO-ANTEHYPOPHYSAIRES

Chez l'homme, impuissance et stérilité dans la grande majorité des cas sont le résultat d'une insuffisance gonadique associée à un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-antéhypophysaire. Les stimulines hypophysaires sont soit non reçues par le testicule, soit non fonctionnelles, soit insuffisamment synthétisées ou/et secrétées par l'antéhypophyse et ceci en relation avec une anomalie hypothalamique.

Chez la femme, l'aménorrhée, l'anovulation sont aussi le reflet d'une anomalie de l'axe hypothalamo-antéhypophysaire incapable de fournir une décharge suffisante des stimulines gonadotropes.

Un bilan hormonal statique complété par des explorations dynamiques de stimulation pourrait affirmer le déficit hormonal et situer la responsabilité au niveau gonadique, hypophysaire ou hypothalamique.

A) AXE HYPOTHALAMO-ANTEHYPOPHYSAIRE

L'axe hypothalamo-hypophysaire doit être considéré comme une véritable entité interdépendante où l'hypothalamus et l'hypophyse sont anatomiquement et fonctionnellement associés à travers l'existence de terminaisons neuronales et surtout d'un système porte vasculaire où s'accumulent les neurosécrétions hypothalamiques éléments à la base de la régulation hypophysaire (figure 4). Des voies rétrogrades des systèmes de rétrocontrole permettent de moduler la réponse et d'harmoniser la fonction des deux étages gonadotropes. Les neurosécrétions issues de l'hypothalamus cheminent et stimulent l'hypophyse où sont synthétisées et secrétées les stimulines.

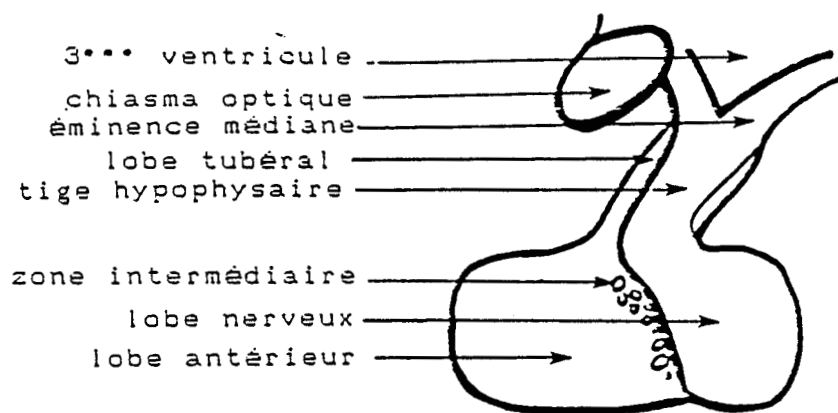
B) HORMONES GONADOTROPES

1) Hormone hypothalamique (LH-RH)

La luteinizing hormone-releasing hormone ou LH-RH est un décapeptide (pyroGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂), isolé initialement de l'hypothalamus de porc, qui provoque la

SCHEMA ANATOMIQUE ET VASCULARISATION DE L'HYPOPHYSE

DIVISION ANATOMIQUE DE L'HYPOPHYSE



VASCULARISATION DE L'HYPOPHYSE

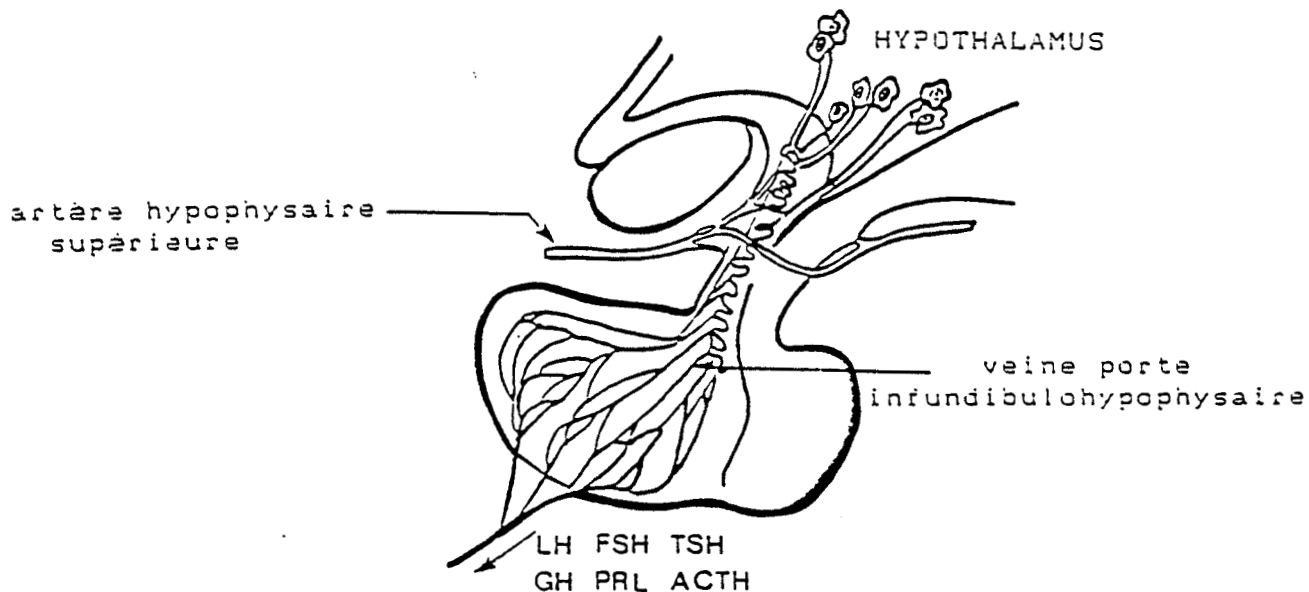


FIGURE 4

décharge de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et de l'hormone lutéinisante (LH), à partir de l'hypophyse. Il est d'ailleurs maintenant admis que les deux hormones sont sécrétées par 3 types cellulaires .

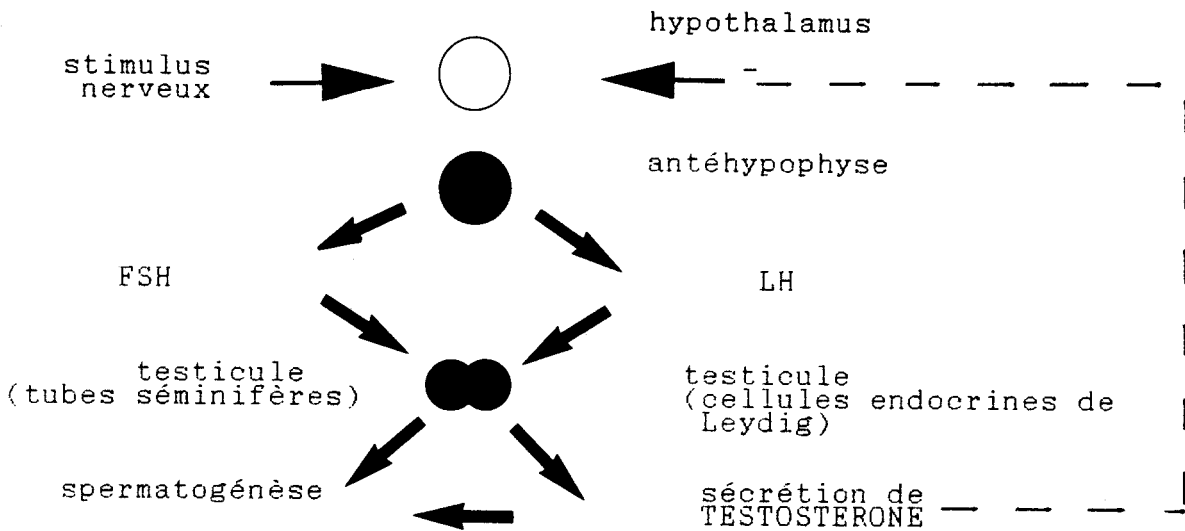
CARMEL et coll. 1976 (17) ont mis en évidence le mode de sécrétion de la LH-RH en mesurant directement cette sécrétion dans la circulation portale hypothalamo-hypophysaire du singe. Les résultats indiquaient clairement que la LH-RH était sécrétée par l'hypothalamus sur un mode pulsatile. Ces résultats ont été confirmés par BELCHETZ et coll. 1978 (9), par des expériences réalisées chez le singe rhésus femelle, soit en sectionnant la tige pituitaire, soit en détruisant le noyau arqué. Il a été démontré ainsi que la libération de LH et de FSH pouvait être restaurée chez ces animaux par une perfusion de LH-RH, mais seulement si celle-ci est pulsatile et non continue. En effet, une stimulation continue par la LH-RH pourrait paradoxalement induire soit une "désensibilisation", soit une inactivation du récepteur hypophysaire, produisant de ce fait l'arrêt de la sécrétion des gonadotropes (CONN et coll. 1986 (24)) .

Un des aspects fondamentaux de la régulation de la sécrétion endocrine de l'antéhypophyse fait intervenir l'existence de boucles de rétrocontrôle hormonal reliant la libération de chaque hormone antéhypophysaire à la réponse sécrétoire de l'organe cible correspondant.

Chez l'homme, le rétrocontrôle négatif est assuré par la testostérone (figure 5A). Par contre, chez la femme, ce rôle est tenu par la progestérone et l'oestradiol qui exercent un effet négatif au niveau de l'hypothalamus. L'action des oestrogènes s'effectue par deux systèmes différents de rétrocontrôle ovario-hypophysaire : une boucle de rétrocontrôle positif et une autre de rétrocontrôle négatif (figure 5B). La boucle du rétrocontrôle négatif de l'oestradiol a été mise en évidence par FERIN et VAN DE WIELE 1982 (39); par des expériences menées chez des femmes ménopausées et chez des patientes où l'oestradiol était absent suite à des désordres génétiques. Chez ces patientes, le taux d'oestradiol diminué provoquait une élévation de la sécrétion de LH et FSH alors que l'administration d'oestradiol à des doses physiologiques entraînait une décroissance rapide des deux gonadotrophines jusqu'à des taux équivalents à ceux observés au cours du cycle menstruel.

REGULATION DE L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-GONADOTROPE

A ROLE DE FSH ET LH CHEZ L'HOMME



B ROLE DE FSH ET LH CHEZ LA FEMME

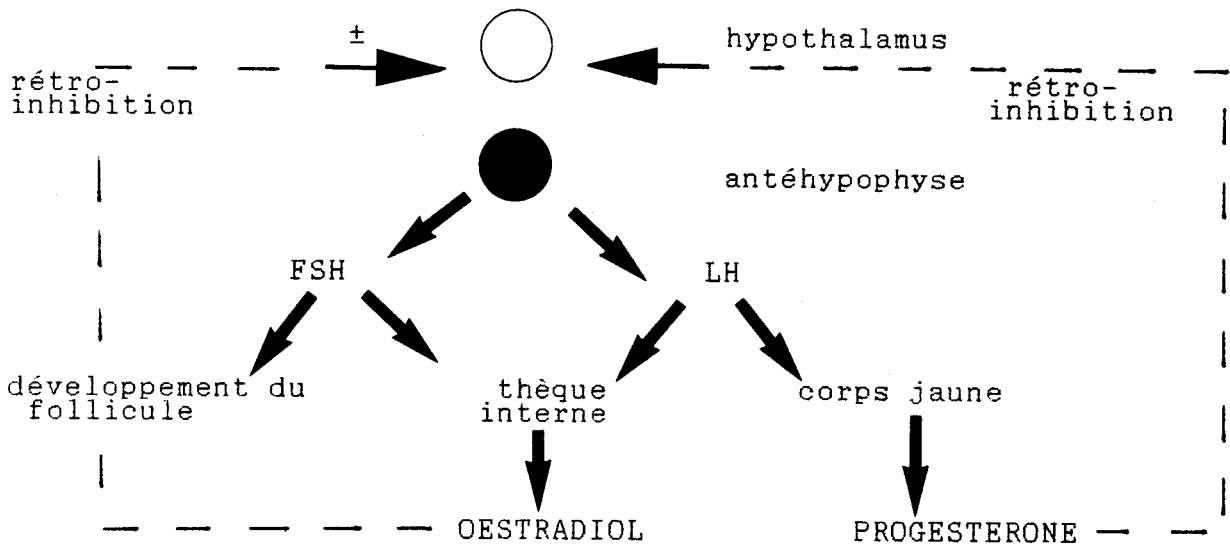


FIGURE 5

Le pic ovulatoire de LH résulte d'un effet stimulant direct des oestrogènes sur l'aptitude de l'hypophyse à répondre à la LH-RH hypothalamique, le seuil d'imprégnation oestrogénique immédiatement préovulatoire étant donc déterminant et illustrant cette notion de rétrocontrôle positif.

Parallèlement aux hormones stéroïdes (oestrogènes, progestérone), plusieurs médiateurs du système nerveux central peuvent affecter la sécrétion de la LH-RH dans le système porte et dès lors intervenir dans le contrôle des hormones gonadotropes (LH,FSH).L'intervention de lipides (acides phosphatidique, phosphatidylinositol) sont impliqués dans la libération des gonadostimulines à la suite de la réception de la LH-RH par le récepteur hypophysaire (NAOR et coll 1981 (105) ,KIESEL et coll 1984 (74)). Les médiateurs aminergiques comme les catécholomines (dopamine et noradrénaline), ou la sérotonine ou des peptides neuronaux comme la met-enképhaline ou la β -endorphine exercent leur action principalement à deux niveaux anatomiques:

- l'éminence médiane elle même (par l'intermédiaire de connexion axonale et de récepteurs spécifiques de certains médiateurs situés sur la terminaison des neurones à LH-RH),

- ou des structures situées en amont, c'est à dire le corps cellulaire du neurone à LH-RH où de multiples afférences modulent indirectement son activité.

Outre cette régulation ,ces médiateurs interviennent dans les mécanismes de contrôle de la sécrétion de prolactine (LEONG et coll. 1983 (84)). Cette hormone antéhypophysaire possède différentes propriétés déclenchant la sécrétion lactée et intervenant également dans le développement de la glande mammaire. En plus, les données actuelles montrent qu'elle joue un rôle de premier plan dans la physiologie de la reproduction. En effet, quelle qu'en soit la cause (hypersécrétion épisodique due à la lactation ou hypersécrétion chronique pathologique), l'hyperprolactinémie inhibe la sécrétion gonadotrope. Chez l'homme et chez la femme hyperprolactinémiques, les troubles de la fonction sexuelle sont manifestes. Dans les deux sexes, l'augmentation de la prolactine circulante provoque la baisse ou l'absence totale de la libido s'accompagnant de frigidité chez la femme et d'impuissance chez l'homme.Les observations anciennes de PASTEELS 1961 (110) et de MEITES et coll. 1961 (98) avaient déjà

montré qu'il existait un rapport inverse entre les taux de prolactine et ceux de LH.

Des expériences de castration ont montré que la sécrétion de LH était fortement augmentée alors que celle de la prolactine s'abaissait. De plus, l'hyperprolactinémie chronique supprime la capacité de la femelle à libérer des quantités suffisantes de LH pour provoquer l'ovulation.

D'après KORDON et coll. 1982 (77), l'inhibition gonadotrope s'expliquerait principalement par une action de la prolactine au niveau de neurones hypothalamiques assurant la régulation gonadotrope, mais les mécanismes intimes ne sont pas encore entièrement établis.

2) Les hormones gonadotropes

Les gonadotrophines hypophysaires (l'hormone lutéinisante LH et l'hormone folliculo-stimulante FSH) sont des glycoprotéines. Leurs rôles biologiques sont la stimulation des fonctions testiculaires et ovariennes via la régulation de la gamétogénèse et la synthèse d'hormones stéroïdes par les gonades.

Les relations structure-activité des gonadotrophines sont très importantes dans le maintien d'un équilibre endocrinien.

a) Structure des gonadotrophines

Toutes les gonadotrophines, ainsi que les hormones glycosylées (TSH), sont constituées de deux sous unités peptidiques différentes (α et β), chacune portant une ou plusieurs chaînes glycaniques. La structure peptidique de la sous unité α est commune dans une même espèce à ce groupe d'hormones (LH, FSH, TSH, hCG) et la séquence amino-acide est hautement conservée d'une espèce à l'autre. L'activité hormonale est reliée à la nature de la sous-unité β , associée à la première pour constituer l'entité hormonale. Libres, les sous unités sont totalement dépourvues de l'activité biologique des hormones du groupe.

Les poids moléculaire sont de 28000 à 29000 daltons pour la LH et la FSH et de 37000 daltons pour l'hCG. (LI ET STARMAN 1964 (86), PIERCE 1988 (114)).

- Structure polypeptidique

Les séquences en amino acide des sous unités α et β des

glycoprotéines hypophysaires de différentes espèces ont été décrites par PIERCE 1971 (113) 1976 (114) , SAIRAM et coll 1978 (124) et STRICKLAND et coll. 1985 (128).

La structure peptidique de la sous unité commune α est le produit d'un seul gène (BOOTHBY 1981 (12)). Elle se compose de 89 à 96 résidus amino acides selon les espèces (figure 6) (SAIRAM et coll. 1972 (125); KEUTMAN et coll. 1978 (71); FIDDES et GOODMAN 1979 (40); GODINE et coll. 1982 (44); NILSON et coll. 1983 (106)). Entre les séquences des sous-unités α humaines, bovines, ovines ou porcines une homologie globale de 75% est retrouvée avec pour seule hétérogénéité une variation située au niveau N_terminal.

Au sein d'une même espèce, l'existence d'un degré d'hétérogénéité de la sous unité α dans la région N_terminale a aussi été suspectée (SAIRAM 1972 (125); KEUTMAN et coll. 1978 (71)). Dans la LH humaine, l'hétérogénéité de séquence est mineure: 95% de la préparation présentant une séquence homogène de 89 résidus d'acides aminés. En revanche, dans les préparations de α hFSH la chaîne polypeptidique est plus longue et contient pour près de 60% une séquence de 92 résidus, 30% de 90 résidus et 10% de 89 résidus (figure 7).

D'après SAIRAM 1982a (122), le fait de localiser l'hétérogénéité du polypeptide à une des extrémités de la chaîne pourrait suggérer que la biosynthèse des sous unités α de la LH et de la FSH pourrait être quelque peu différente.

Le fait que ces sous- unités α soient librement interchangeables dans la formation des hormones définitives montrerait que l'hétérogénéité N_terminale ne semble pas intervenir dans l'activité biologique.

De plus, les 10 résidus de cystéine présents dans les deux moitiés N et C terminales sont invariables dans leur positionnement et laissent envisager leur importance dans la structuration du peptide. Si l'appariement de ces résidus à ponts disulfure reste encore controversé (CHUNG et coll. 1973 (19), CORNELL et PIERCE 1974 (25), COMBARNOUS et HENNEN 1974 (23)) pour certains amino-acides , seul l'appariement des deux demi cystéines en position 11-35 et en position 14-36 semble être admis et confirme le rôle des cystéines dans une exigence conformationnelle stricte constituée d'un noyau central

SEQUENCE AMINOACIDE DE LA SOUS-UNITE α DES GLYCOPROTEINES
HORMONALES (RYAN et coll. 1986 (120))

bovine, ovine	¹ F	P	D	G	⁵ E	F	T	M	Q	¹⁰ G	C	P	E	C	¹⁵ K	L	K	E	N	²⁰ K	Y	F	S	K	²⁵ P	
human	A	-	-	V	Q	(-	-)	D	-	-	-	-	T	-	Q	-	-	P	F	-	-	Q	-	
equine	-	-	-	-	-	-	-	T	-	B	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	F	-	L	
rat	L	-	-	-	D	L	I	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	
bovine, ovine	D	A	P	I	³⁰ Y	Q	C	M	G	³⁵ C	C	F	S	R	⁴⁰ A	Y	P	T	P	⁴⁵ A	R	S	K	K	⁵⁰ T	
human	G	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	
equine	G	V	-	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	
rat	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
bovine, ovine	M	L	V	P	⁵⁵ K	N	I	T	S	⁶⁰ E	A	T	C	C	⁶⁵ V	A	K	A	F	⁷⁰ T	K	A	T	V	⁷⁵ M	
human	-	-	-	Q	-	-	V	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	S	Y	N	R	R	V	-	-	
equine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	S	-	-	-	-	-	-	-	-	I	R	V	-	-	-	
rat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	
bovine, ovine	G	N	V	R	⁸⁰ V	E	N	H	T	⁸⁵ E	C	H	C	S	⁹⁰ T	C	Y	Y	H	⁹⁵ K	S	-	-	-	-	
human	-	G	F	K	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
equine	-	-	I	K	L	Z	-	-	-	Z	-	Y	-	-	-	-	-	H	-	-	I	-	-	-	-	
rat	-	-	A	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

- * : site de glycosylation
- : résidu identique à celui de la séquence bovine référence
- () : déletion d'un résidu amino acide
- C : résidu de $\frac{1}{2}$ cystéine

FIGURE 6

DEGRE D'HETEROGENEITE DES SOUS-UNITES α
DES LH, FSH, hCG HUMAINES DANS LA REGION
N-TERMINALE
(KEUTMAN et coll.1978 (71), SAIRAM et coll.1972 (124))

	%	séquence N-terminale
hLH α	95	VAL-GLN-ASP-.....
	5	Asp-Val-Gln-Asp-.....
hFSH α	60	ALA-PRO-ASP-VAL-GLN-ASP-....
	30	Asp-Val-Gln-Asp-.....
	10	Val-Gln-Asp-.....

FIGURE 7

relativement compact, peu accessible aux enzymes protéolytiques (COMBARNOUS 1988 (21)), qui serait environné de trois boucles peptidiques maintenues par ponts disulfures. Ces structures peptidiques bouclées contrairement au noyau central seraient plus accessible à des enzymes protéolytiques dont l'intervention pourraient alors limiter ou empêcher toute reconnaissance avec la sous-unité β .

Pour la sous unité β , les structures polypeptidiques sont différentes selon l'hormone et l'espèce étudiée. La séquence est constituée de 118 à 127 résidus amino-acides (PIERCE et coll. 1981 (115)) (figure 8). Les positions des 12 résidus de demi cystine sont ici encore identiques quelque soit l'hormone suggérant que l'appariement des ponts disulfures pourrait être lui aussi identique (REEVE et coll. 1975 (116)). Quatre résidus de cystéine en positions 13-100 et 26-110 ont pu être appariés (RYAN et coll. 1987 (120)).

65% d'homologie globale est retrouvée dans la séquence polypeptidique de β LH de vertébré (porcine, ovine, humaine) et 87% d'homologie globale entre la β FSH humaine et β FSH ovine. L'hétérogénéité réside principalement dans l'extrémité C_terminale.

- Structure glycanique

L'hormone folliculo-stimulante et l'hormone lutéinisante appartiennent au groupe des glycoprotéines. Elles sont en effet N-glycosylées au niveau de leurs sous unités α et β . La copule glucidique est assez classique, constituée de chaînes oligomannosidiques, lactosaminiques sialylées ou non sialylées, mais aussi de structures plus originales comme des glycannes terminés par des galactosamines sulfatées. Progressivement, au cours de ces dernières années, a été mise en évidence une microhétérogénéité glycanique (GREEN et BAENZIGER 1988 (48)).

Les structures sialylées et/ou sulfatées de glycoprotéines hypophysaires LH/FSH de différentes espèces animales (ovine, bovine, humaine) et leur répartition sont illustrées dans la figure 9. Ces structures occupent au niveau :

- de la sous unité α , les positions 56 et 82
- de la sous unité β , les positions 13 et 30 pour la FSH

SEQUENCE AMINO ACIDE DE LA SOUS UNITE β
 DES GLYCOPROTEINES HORMONALES
 (revue de RYAN et coll. 1986 (120))

ovine,bovine LH	S	R	G	P	I	R	P	I	C	Q	P	I	N*	A	T	L	A	A	E	K	E	A	C	P	V	1	5	10	20	25	
humaine LH	-	-	E	-	-	-	-	W	-	H	R	-	-	-	I	-	-	V	-	-	-	G	F	-	-	-	-	-	-	-	
rat LH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	F	E	-	-	-	-	-	-	-	
humaine FSH	-	-	-	-	-	-	N	S	-	E	L	T	-	I	-	I	-	I	-	-	-	F	E	-	R	F	-	-	-	-	-
humaine TSH	-	-	-	-	-	-	S	P	-	I	-	T	E	Y	T	M	H	I	-	R	R	E	E	-	A	Y	-	-	-	-	-
humaine CG	-	K	E	-	-	-	-	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	
ovine,bovine LH	C	I	T	F	T	T	S	I	C	A	G	V	C	P	S	M	K	R	V	L	P	V	I	L	P	30	35	40	45	50	
humaine LH	-	-	-	V	N*	-	T	-	-	-	-	-	-	-	T	-	M	-	-	-	Q	A	A	-	-	-	-	-	-	-	
rat LH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	P	A	-	-	-	-	-	
humaine FSH	-	L	-	-	I	N*	-	T	W	-	-	-	-	Y	T	R	D	L	-	-	Y	K	N	L	A	-	-	-	-	-	
humaine TSH	-	L	-	-	I	N*	-	T	-	-	-	-	-	M	T	R	D	L	I	N	G	K	K	L	F	-	-	-	-	-	
humaine CG	-	-	-	V	N*	-	T	-	-	-	-	-	-	-	I	-	I	-	-	-	Q	G	V	-	-	-	-	-	-	-	
ovine,bovine LH	P	M	P	Q	R	V	C	T	Y	H	E	L	R	F	A	S	V	R	L	P	G	C	P	P	G	55	60	65	70	75	
humaine LH	-	L	-	-	V	-	-	-	-	R	R	D	V	-	-	E	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
rat LH	-	V	-	-	P	-	-	-	-	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
humaine FSH	P	K	E	Q	K	T	-	-	F	K	-	-	V	-	E	T	-	-	V	-	-	-	A	H	H	-	-	-	-	-	
humaine TSH	K	Y	A	L	S	Q	D	V	-	-	R	-	P	I	Y	E	R	T	E	I	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	
humaine CG	A	L	-	-	V	-	-	N	-	R	D	V	-	-	E	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ovine,bovine LH	V	D	P	M	V	S	F	P	V	A	L	S	C	H	C	G	P	C	R	L	S	S	T	D	C	80	85	90	95	100	
humaine LH	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	R	-	T	-	-	-	-	-	-	-	
rat LH	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	-	-	-	-	-	-	
humaine FSH	A	-	S	L	Y	T	Y	-	-	T	Q	-	-	-	-	-	K	-	-	S	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
humaine TSH	-	A	-	Y	P	-	Y	-	-	-	-	-	-	K	-	K	-	D	T	D	Y	S	-	-	-	-	-	-	-		
humaine CG	-	N	-	V	-	-	Y	A	-	-	-	-	-	Q	-	A	L	-	N	R	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	
ovine,bovine LH	G	P	G	R	T	Q	P	L	A	C	D	H	P	P	L	P	D	I	L	-	-	-	-	-	-	105	110	115	120	125	
humaine LH	-	G	P	P	K	D	H	-	-	T	-	-	-	L	-	-	S	G	G	L	-	P	I	-	-	-	-	-	-	-	
rat LH	-	G	P	P	R	-	-	-	M	T	-	-	L	-	H	-	-	G	G	L	-	L	F	-	-	-	-	-	-	-	
humaine FSH	T	V	R	G	L	G	-	-	S	Y	-	S	F	G	-	-	M	K	Q	Y	L	P	P	S	Y	-	-	-	-	-	
humaine TSH	I	H	E	Q	I	K	T	N	Y	-	T	-	-	-	-	-	K	S	-	-	V	G	S	-	-	-	-	-	-	-	
humaine CG	-	G	P	I	D	H	-	-	T	-	-	D	-	-	R	I	Q	-	S	S	S	S	K	A	P	P	-	-	-	-	-
humaine CG	P	S*	I	P	S	P	S*	R	L	P	G	P	S*	D	T	P	I	L	P	Q	-	-	-	-	-	130	135	140	145		

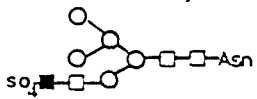
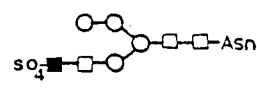
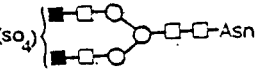
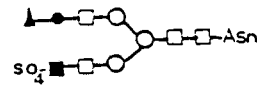
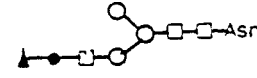
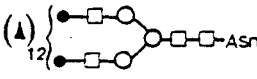
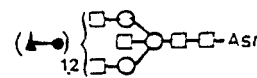
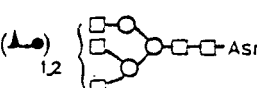
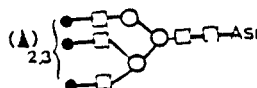
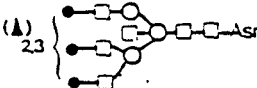
* = site de glycosylation

- : résidu identique à celui identifié dans la séquence bovine référence

C : résidu de $\frac{1}{2}$ cystéine

FIGURE 8

STRUCTURES ET REPARTITIONS DES N_GLYCANNES
 SIALYLES OU SULFATES DES GLYCOPROTEINES HYPOPHYSAIRES
 BOVINES (b) OVINES (o) ET HUMAINES (h)
 (GREEN ET BAENZIGER 1988 (46))

	LH _b	FSH _b	LH _o	FSH _o	LH _h	FSH _h
	15	3	27	1	3	1
	10	3	18	3	7	0
	38	4	19	24	7	0
	0	1	4	10	23	5
	0	2	0	1	10	3
	0	36	1	7	16	15
	0	0	0	0	9	16
	0	0	0	4	0	11
	0	0	0	3	0	20
	0	0	0	0	0	18

Résultats exprimés en pourcentage par rapport aux oligosaccharides totaux.

▲ = acide sialique
 □ = GlcNAc
 ■ = GalNAc
 ● = Gal
 ○ = Man

FIGURE 9

la position 13 pour la LH ovine et porcine
la position 30 pour l'homme

Signalons que les sites de glycosylation sont plutôt de localisation C_terminale pour la sous unité α et N_terminale pour la sous unité β .

Pour préciser le rôle des glycanes dans la physiologie hormonale, des études de déglycosylation par traitement chimique utilisant l'acide fluorhydrique (HF) (SAIRAM et SCHILLER 1979 (126), KEUTMAN et coll. 1983(73), 1985(72), MANJUNATH et coll. 1982 (92) et LIU et coll. 1984(87)) ont été menées.

Elles ont permis de dégager les points suivants:

1) la structure peptidique de l'hormone peut être conservée sans clivage si la déglycosylation laisse en place un résidu de N_acétylglucosamine sur l'asparagine de liaison

2) l'association des deux sous unités déglycosylées reste tout à fait possible après neutralisation du milieu réactionnel,

3) la reconnaissance spécifique de l'hormone déglycosylée par le récepteur tissulaire est toujours fonctionnelle mais l'activation du système adénylcyclase est perturbée, la stéroïdogénèse étant fortement diminuée ou inhibée.

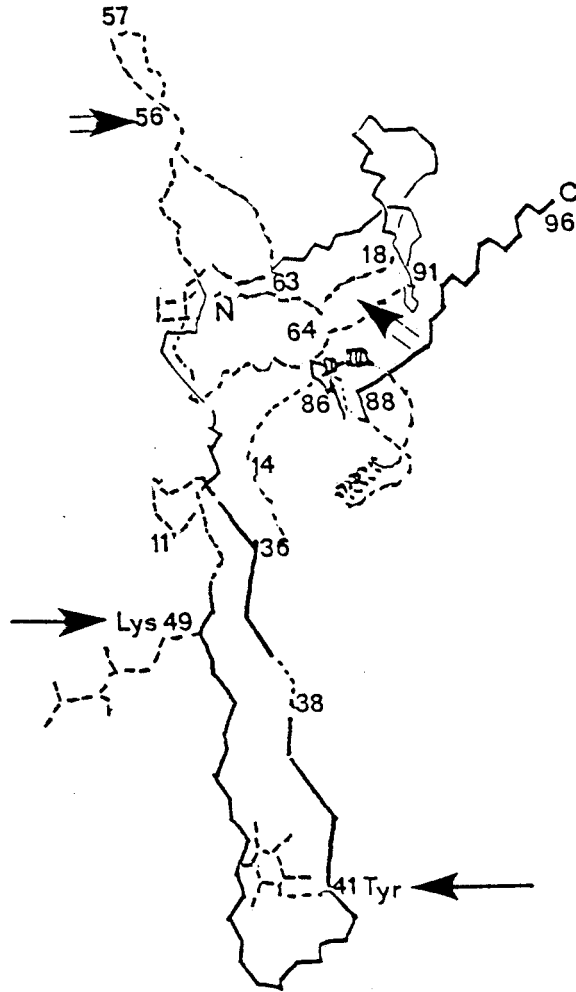
Des stéroïdogénèses perturbées ont aussi été observées après traitement enzymatique par neuraminidases, où in vivo, les hormones désialylées possèdent une demie-vie réduite ainsi qu'une activité biologique diminuée malgré une reconnaissance spécifique par le récepteur tissulaire (GOVERNAM et coll. 1982 (45)).

De ces résultats, il apparait clairement que la portion peptidique participe activement dans les phénomènes de reconnaissance du récepteur cible, tandis que les glycanes seraient quant à eux impliqués dans l'activité biologique de la stimuline (SAIRAM (1989).

- Intéraction des sous unités

Les travaux de RYAN et coll. 1987 (120), s'appuyant d'une part sur les résultats de séquence amino acide des sous unités α (LH, FSH, hCG) et d'autre part sur la méthode prédictionnelle de conformation selon CHOU et FASSMAN 1978 (18), ont permis d'établir une image tridimensionnelle du squelette peptidique de la sous unité α . (figure 10).

STRUCTURE TRIDIMENTIONNELLE DE LA SOUS-UNITE α
DES GLYCOPROTEINES HORMONALES HUMAINES
(RYAN et Coll. 1986 (120))



- Amino acides participant à l'association des 2 sous-unités
- ⇒ Sites de N glycosylation

La région C terminale en trait plein est impliquée dans le site de liaison avec le recepteur.

FIGURE 10

De cette étude, il apparaît qu'un fragment polypeptidique hautement conservé d'une espèce à l'autre (Ser 38 - Ile 57) est clairement exposé. Deux résidus (Tyr 41 et Lys 49) sont localisés dans l'interface des 2 sous unités. D'après les auteurs, cette région ne serait qu'un site de reconnaissance du complexe α - β alors que les séquences en aval ou en amont de ce fragment joueraient un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité structurale moléculaire de l'hormone et interagiraient avec le récepteur cible.

Au niveau de la sous-unité β , les séquences homologues strictes sont plus réduites. Deux régions hautement conservées pourraient intervenir dans l'interaction α - β : séquences 31-37 et 68-72. Il a été montré que le couplage covalent des sous unités de la LH bovine par la technique utilisant la carbodiimide soluble dans l'eau, s'effectuait entre les chaînes latérales des résidus de Lys 49 de la sous unités α et l'Asp 111 de la sous unité β sans perte de son activité biologique (WEARE et REICHERT 1979 (139)).

On peut encore signaler que si la tyrosine 41 de la sous-unité α libre est sensible à la nitration ou à l'iodation, elle devient insensible si l'on traite le complexe α - β ; ceci attestant de l'implication de ce résidu dans la reconnaissance inter sous-unités.

Il apparaît aussi que tous les points de contact inter $\alpha\beta$ ne sont pas homologues selon les sous-unités β , les conditions de séparation des sous-unités variant considérablement d'une hormone à l'autre. Ainsi, les changements conformationnels de chacune des deux sous-unités lors de l'association pourraient dépendre principalement de la structure β (STRICKLAND et PUETT 1982 (129)).

Les cinétiques de recombinaison des sous unités ont indiqué qu'elles formaient un complexe intermédiaire qui subissait d'abord une trans conformation pour construire la structure active de l'hormone ($\alpha + \beta$) \leftrightarrow ($\alpha\beta$) \leftrightarrow (Hormone) (INGHAM et coll. 1976 (61)).

- Polymorphisme

L'hétérogénéité glycanique et peptidique des deux sous unités α et β associées confèrent à l'hormone native un polymorphisme structural en relation peut être avec leurs propriétés

fonctionnelles.

La variété des pHi des hormones hypophysaires a été reconnue depuis longtemps (JUTISZ et SQUIRE 1958 (66); COURTE et coll. 1971 (26)). L'implication du contenu en acide sialique dans le polymorphisme a été mis en évidence par de nombreux auteurs: WIDE 1982 (141) pour la FSH humaine; MILLER et coll. 1983 (100) pour la FSH de hamster ; BLUM et coll. 1985 (10) pour la FSH de rat; HATTORI et coll. 1985 (52) pour la LH de rat et MATTERI et PAPKOFF 1987 (95) pour la LH équine. La désialylation des hormones diminue fortement le nombre des isoformes et augmente leur point isoélectrique. Néanmoins, le polymorphisme notamment pour la LH humaine n'est pas totalement explicable par l'acide sialique ; il faut tenir compte aussi du contenu en résidus N-acétylgalactosamine sulfatés des hormones ainsi que de l'hétérogénéité de longueur de leurs axes peptidiques.

Le nombre et les propriétés des iso-hormones varient aussi en fonction de l'état physiologique de l'animal (WIDE 1985 (140), ULLOA-AGUIRRE et coll. 1986 (134), KEELS et coll. 1987 (69)). A titre d'exemple, il est noté in vivo durant la puberté une proportion plus importante des isoformes basiques tandis qu'en fonction de l'âge ou après castration, les isoformes plus acides deviennent prépondérantes.

In vitro, les formes plus acides sont biologiquement moins actives et possèdent une affinité plus faible vis à vis des récepteurs tissulaires (KEELS et GROTTJAN 1985 (68)).

Le contrôle du système neuroendocrinien par l'intermédiaire de la gonadolibérine interviendrait dans la sécrétion d'isoformes basiques responsables directement de l'activité biologique des hormones.

b) Relation structure fonction des gonadotrophines

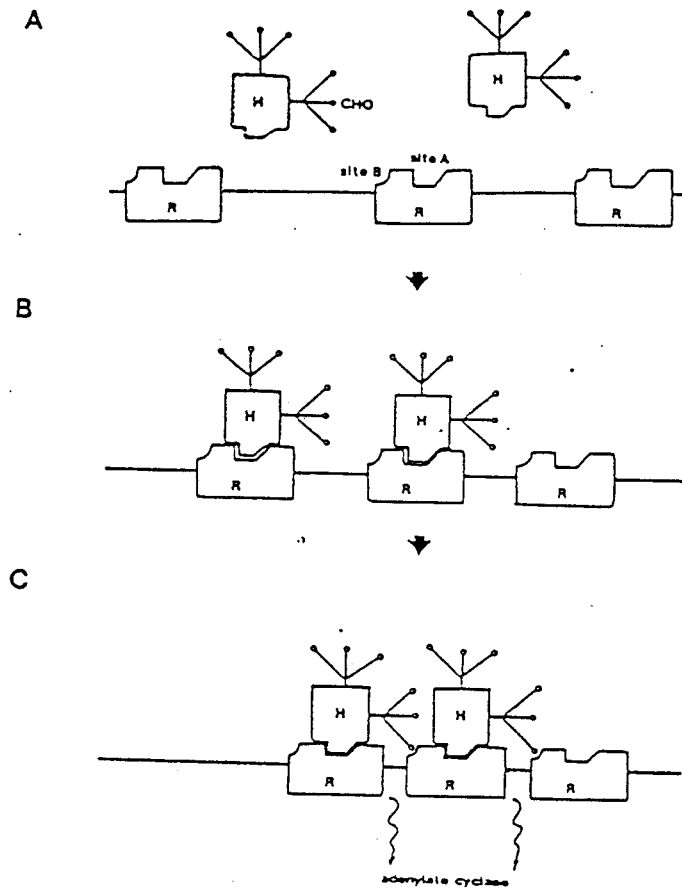
JI et coll. 1985 (65), ont montré que les deux sous unités α et β contribuent au site de liaison de l'hormone avec son récepteur par utilisation de réactifs bifonctionnels. Il est ainsi confirmé que la fonction des stimulines hypophysaires est liée fondamentalement à l'état interactif des sous unités α et β .

D'après COMBARNOUS 1988 (21), COMBARNOUS et HENGE 1981 (22),

les stimulines hypophysaires possèdent une structure polyfonctionnelle instituée par un site de fixation à haute affinité commun à toutes les hormones et reconnaissant tous les récepteurs des hormones du groupe, la spécificité de chacun étant due à l'existence de sites inhibiteurs spécifiques empêchant la liaison d'une stimuline donnée aux récepteurs tournés vers d'autres hormones.

Rappelons que SAIRAM 1982b (123) et MANJUNATH et coll. 1982 (92) ont étudié l'effet de la déglycosylation de la LH sur la fixation aux récepteurs et démontré le rôle seul de la partie peptidique dans cette reconnaissance. Toutefois, les expériences de déglycosylation ont indiqué que les glycanes et ceux notamment de la sous unité α joueraient un rôle important dans l'activité adényl-cyclasique des cellules cibles sous l'action de ces hormones (revue de GREEN et coll. 1988 (48)). COMBARNOUS 1988 (21), propose un modèle de la stimulation des réponses cellulaires où les chaînes polysaccharidiques seraient responsables de la micro-aggrégation des récepteurs en pontant ceux ci par des sites secondaires de type lectine qui provoqueraient ainsi la stimulation de l'activité enzymatique de l'adényl-cyclase (figure 11) et permettraient la traduction du message hormonal conduisant à la stéroïdogénèse testiculaire ou ovarienne.

MODELE HYPOTHETIQUE DU ROLE DES CHAINES GLYCANNIQUES
DES GONADOTROPINES DANS LA TRANSDUCTION MEMBRANAIRE
DU SIGNAL HORMONAL
(COMBARNOUS 1988 (21))



La stimulation de l'organe cible par l'hormone s'effectue en 3 étapes :

- A : Approche de l'hormone (H) à son récepteur (R);
- B : Liaison de l'hormone sur le site récepteur (A);
- C : Microaggrégation des récepteurs provoquée par certains résidus saccharidiques internes se liant au site (B). Stimulation de l'activité adényl-cyclase.

FIGURE 11

CHAPITRE II :

TRAVAUX PERSONNELS

I) ETUDES DES DESEQUILIBRES ENDOCRINIENS DE SUJETS HUMAINS ATTEINTS DE TRYPANOSOMIASE

Une étude sur des sérums recueillis chez des sujets africains trypanosomés et non trypanosomés a été possible grâce à une collaboration établie entre notre laboratoire, le laboratoire d'Entomologie Médicale de l'ORSTOM de Brazzaville et le Service des Grandes Endémies de Brazzaville (République Populaire du Congo). Il est en effet très classique et très fréquent au plan clinique de constater, chez des sujets trypanosomés diagnostiqués sur le terrain ou suivis en hospitalisation, une symptomatologie endocrinienne affectant l'axe gonadotrope aussi bien chez l'homme que chez la femme. L'objectif au plan biologique était alors la mise en évidence de marqueurs du dysfonctionnement neuroendocrinien.

Un bilan complet comprenant une étude gonadique mais aussi hypothalamo-hypophysaire était alors entreprise chez plusieurs dizaines de malades à des stades évolutifs différents de leur trypanosomiase.

Les sérums de 106 patients hommes et femmes confondus infestés par une souche chronique de T.b.gambiense ont été recueillis et acheminés congelés vers le laboratoire. Nous avons exclu, les sujets trop jeunes ou âgés ainsi que les femmes suspectées de se trouver en phase de pré-ménopause. Nous avons retenu ainsi 45 sérums de femmes et 34 sérums d'hommes.

Le bilan biologique gonadique endocrinien de base a comporté les dosages d'hormones sexuelles (oestradiol, testostérone) et ceux des gonadostimulines hypophysaires sériques: l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculostimulante (FSH).

Les taux hormonaux sont déterminés par dosage radioimmunologique utilisant différentes trousse commerciales dont le principe d'utilisation est détaillé dans l'appendice technique.

32 sujets témoins comportant 10 femmes d'âge moyen 27 ans et 22 hommes d'âge moyen 32 ans ont été pris comme référence de population congolaise.

A) RESULTATS DES BILANS GONADIQUES DE PATIENTS ATTEINTS DE TRYPANOSOMIASE CHRONIQUE A T.b.gambiense

Les résultats de bilans endocriniens ont fait l'objet d'une publication: "Fonction endocrine et Trypanosomiase africaine" dans le bulletin de la Société Pathologie Exotique (HUBLART et coll. 1988). L'article inséré dans ce mémoire donne le détail des bilans réalisés chez la femme (tableau I et II) et chez l'homme (tableau III et IV).

1) Bilan endocrinien chez la femme parasitée

a) Dosage radioimmunologique des taux d'oestradiol

Pour l'oestradiol, les valeurs de référence pour l'oestradiol étaient :

- pour la phase folliculaire : 30 à 50 pg/ml
- pour la phase lutéale : 150 à 230 pg/ml

Trois groupes peuvent être distingués parmi les 45 sujets explorés:

- 3 cas prélevés en phase progestative ayant un oestradiol inférieur à 150 pg/ml.
- 19 sujets pour lesquels la période du cycle menstruel n'était pas connue, présentant des taux d'oestradiol inférieur à la valeur limite normale basse de 30 pg/ml.
- 23 patientes ayant un taux d'oestradiol compris entre 30 et 230 pg/ml, où nous ne connaissons pas la période du cycle ovarien au moment des prélèvements et pour lesquelles l'interprétation n'était pas possible.

Malgré cela et dans les limites d'interprétations, il apparaît qu'au moins 50% des sujets trypanosomés présentent un déficit certain en oestradiol quelque soit la phase évolutive de la maladie.

b) Dosage radioimmunologique des gonadostimulines

L'intervalle des valeurs de référence des gonadostimulines circulantes ont été évaluées, pour l'hormone lutéinisante de 1 à 3 ng/ml et pour l'hormone foliculostimulante de 1,6 à 3,2 ng/ml pendant la phase folliculaire, et durant la phase lutéale de 0,5 à 2,5 ng/ml pour la LH et 0,8 à 2,4 ng/ml pour la FSH.

Les dosages des gonadostimulines ont été entrepris sur l'ensemble des patientes présentant une diminution d'oestradiol interprétable (soit 22 cas dont 3 cas en phase progestative).

Les valeurs de LH retrouvées sont:

- pour 12 cas, comprises dans l'intervalle normal de référence
- pour 2 cas diminuées
- pour 8 cas augmentées.

Les valeurs de FSH sont :

- pour 9 cas comprises dans l'intervalle normal
- pour 2 cas diminuées
- pour 4 cas augmentées
- enfin, 7 cas ont à la fois les taux de FSH et LH supérieurs à la normale.

De ces bilans gonadiques effectués chez des femmes trypanosomées, nous avons donc constaté une diminution du taux d'oestradiol pour près de 50% des malades sans qu'il ne semble exister de relation entre cette hypooestrogénie et les taux circulants des gonadostimulines pour lesquelles les valeurs se situent pour la très grande majorité des cas (86%) dans l'intervalle normal de référence ou en légère augmentation.

2) Bilan endocrinien chez l'homme parasité

a) Dosage radioimmunologique des hormones stéroïdiennes sexuelles

Les valeurs normales de référence chez l'homme sont de 15 à 45 pg/ml pour l'oestradiol et de 3 à 10ng/ml pour la testostérone.

34 sérums d'hommes trypanosomés ont fait l'objet d'un bilan gonadique.

Les résultats sont :

- pour 10 cas des taux normaux de testostérone et d'oestradiol
- pour 6 cas une diminution des deux hormones testostérone et oestradiol
- pour 10 cas une diminution isolée de la testostérone.

Ainsi, une atteinte relativement sélective de la fonction endocrino-leydigienne peut être avancée pour près de 50% des sujets, alors que la sécrétion d'oestradiol, qui peut être rattachée à la cellule de Sertoli, est peu altérée (17% des cas).

b) Dosage radioimmunologique des gonadostimulines

Sur l'ensemble des malades présentant un hypofonctionnement gonadique (16 cas), les taux des gonadostimulines évalués par dosage radioimmunologique ont pu être réalisés avec dans :

- 3 cas, une augmentation isolée de la LH
- 4 cas, une élévation simultanée des 2 gonadostimulines FSH et LH
- 6 cas, une augmentation isolée de la FSH
- 1 cas, une diminution isolée de la LH
- 2 cas, des taux normaux de FSH et LH.

Le petit nombre d'hypersécrétion de LH, l'absence de diminution de FSH et LH pour 53% des malades laissent alors envisager que l'insuffisance gonadique testiculaire constatée ne semble pas être liée à une hyposécrétion des gonadostimulines hypophysaires.

Ainsi, aussi bien chez l'homme que chez la femme, un hypogonadisme démontré par une chute significative du taux de stéroïdes correspondant n'est pas trouvé associée à un effondrement du taux circulant de stimulines hypophysaires. On constate au contraire plus de 80% de réponse hypophysaire apparemment satisfaisante tout en notant que l'augmentation attendue de la stimuline circulante n'est retrouvée que dans 40% des cas chez la femme et 30% des cas chez l'homme.

Ces observations nous incitaient à entreprendre des tests dynamiques de stimulation hypophysaire.

B) EPREUVES DE STIMULATION GONADOTROPE HYPOPHYSAIRE

Le niveau de l'atteinte de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique peut être apprécié par des tests de stimulation gonadique et hypophysaire.

20 malades (10 hommes et 10 femmes) ont été retenus et soumis à ces tests de stimulation (travail publié dans les Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale "Gonadic axis and Trypanosoma brucei gambiense infection", article inséré en fin de mémoire).

1) La stimulation gonadique

La stimulation gonadique est obtenue par injection intramusculaire de 5000 UI d'hormone gonadotrope chorale humaine (hCG), suivi après 24 heures, d'un dosage d'oestradiol et après 72 heures d'un dosage de testostérone.

Chez la femme, ce test vise à explorer les capacités potentielles sécrétoires de l'ovaire dans ses trois compartiments: thèque interne (oestrogènes); granulosa luteinisée (progestérone); stroma (androgènes). Chez l'homme, les variations rapides et très marquées des taux de testostérone et d'oestrogène dans le sang après stimulation suffisent à apprécier la fonction testiculaire.

* chez la femme

Pour cette étude, il était impératif de connaître la période du cycle ovarien au moment des prélèvements. Nous avons donc sélectionné 10 malades (d'âge moyen 32 ans) dont l'examen endocrinien révélait: perte de la libido, aménorrhée et parfois atrophie vulvaire. Sur ces 10 cas, 8 étaient en situation d'aménorrhée et 2 en phase folliculaire.

De l'ensemble des résultats, nous pouvons déduire: que l'aménorrhée associée à l'hypoestrogénie est rencontrée surtout au cours de la seconde phase d'évolution de la trypanosomiase (P₂). La diminution du taux d'oestradiol isolée observée dès la première période (P₁), pourrait donc représenter un marqueur

précoce de la trypanosomiase, l'apparition de l'aménorrhée étant annonciatrice du passage P₁/P₂.

Pour l'ensemble des malades, les taux d'oestradiol restent inchangés après stimulation par hCG. L'interprétation de ce résultat reste très difficile. Nous ne pouvons en effet conclure à un hypogonadisme primaire par altération du tissu ovarien ou à un hypogonadisme secondaire par hypostimulation sachant que chez la femme, le cycle ovarien et la réponse oestrogénique dépendent de nombreux facteurs et que la capacité oestrogénique après stimulation à l'hCG relève plus du degré de maturation du follicule ovarien que de ses capacités de stéroïdogénèse.

* chez l'homme

Le test de stimulation a été effectué sur 10 hommes trypanosomés d'âge moyen 34 ans comportant 5 malades dont les taux de testostérone sont inférieurs aux valeurs normales de référence et 5 patients où les concentrations d'androgènes circulants restent supérieures à la limite inférieure normale.

Nous avons observé pour 9 cas sur 10, une augmentation des taux de testostérone et d'oestradiol qui sont doublés ou plus par rapport aux valeurs de base après respectivement 72 heures et 24 heures d'injection d'hormone gonadotrope chorale.

La stimulation par l'hCG s'étant avérée positive dans la majorité des cas, il semble que l'hypogonadisme chez l'homme trypanosomé ne soit pas d'origine testiculaire tant au plan de la réception de l'hormone hypophysaire par le testicule qu'au plan strict de la stéroïdogénèse.

Au total, si chez la femme la réponse à la stimulation par hCG est toujours délicate (difficulté d'interprétation liée à la non connaissance au moment des tests de la réactivité potentielle folliculaire), chez l'homme une responsabilité gonadique peut être éliminée.

Se pose donc à nouveau au plan quantitatif et aussi qualitatif l'hypothèse d'une responsabilité hypophysaire qui nous a conduit à réaliser des tests de stimulation hypophysaire et gonadique par injection de LH-RH.

2) Stimulation hypophysaire

La stimulation hypophysaire de l'axe gonadotrope est provoquée par injection intraveineuse de 100 µg de gonadolibérine (LHRH) suivie après 30 minutes d'un dosage de FSH et de LH.

Ce test a pour but d'étudier l'élévation des gonadostimulines hypophysaires sous l'effet de l'injection de LH-RH de synthèse.

* chez la femme

La réponse au niveau de la LH et de la FSH s'est avérée positive dans 100% des cas. Toutes les valeurs de gonadotrophines après stimulation ont été retrouvées doublées ou plus.

L'hypophyse est donc réactive, et permet d'exclure une insuffisance de la fonction adénohypophysaire chez nos malades.

* chez l'homme

Dans 90% des cas, la réponse après stimulation est positive au niveau de la LH. En revanche, pour la FSH la réponse est moins systématique puisque pour 3 cas sur 10, nous n'avons pas observé d'augmentation de la FSH par le test LH-RH.

Notons que chez le sujet normal, l'administration du facteur hypothalamique de synthèse provoque une élévation des deux gonadotrophines avec cependant une augmentation de LH bien supérieure à celle de FSH, la réponse FSH demeurant inconstante et toujours modérée aux doses que nous avons employées.

Il semble donc que chez l'homme trypanosomé, la fonction antéhypophysaire ne soit pas altérée.

C) DOSAGE DE LA PROLACTINE

Une hypothèse à ce stade de l'investigation clinique et biologique pouvait être émise à savoir l'intervention antigonadotrope d'un paramètre hypophysaire tel que la prolactine.

Six sérums de femmes ont pu faire l'objet d'un dosage. On note que dans tous les cas, les valeurs de prolactinémie restent en valeur limite normale (Tableau V).

TABLEAU V

DOSAGE DE LA PROLACTINE DANS 6 SERUMS ISSUS
DE FEMMES TRYPANOSOMEES

patientes *	âge	phase de la maladie	aménorrhée	prolactine ng/ml
6	47	2	+	13
7	30	2	+	3
12	20	2	+	6
13	21	2	+	8
14	22	1	-(F)	10
15	28	2	+	12

* : numérotation des patientes utilisée dans l'article

(F): phase folliculaire

Taux normal de prolactine compris entre: 4.3 et 20.2 ng/ml

D) CONCLUSION

Les mécanismes conduisant à l'hypofonctionnement gonadique mis en évidence chez le sujet infesté par T.b.gambiense ont été étudiés par exploration statique et dynamique de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadotrope de sujets malades et de sujets témoins résidants dans la même zone géographique.

L'hypofonctionnement gonadique caractérisé par la diminution des taux d'oestradiol et de testostérone n'apparaît pas être d'origine primitivement gonadique ni lié d'ailleurs en première analyse à une insuffisance du fonctionnement anté-hypophysaire gonadotrope. Ceci est démontré aussi bien chez l'homme que chez la femme par les réponses enregistrées au cours des tests hCG ou LH-RH. De plus, l'hypothèse d'un environnement prolactinique antigonadotrope est semble-t-il à écarter.

Aussi, à partir de ces résultats, on peut évoquer à l'origine des hypogonadismes un dysfonctionnement au niveau supra ou extra hypophysaire.

Cette nouvelle étape réclamait pour son étude, la mise en place d'un modèle expérimental chez l'animal qui autorisait :

- des études morphologiques
- des dosages hormonaux sur tissus
- une étude du dialogue hôte/parasite permettant d'identifier le ou les facteurs parasitaires responsables du désordre endocrinien.

II) ETUDE DES DESEQUILIBRES ENDOCRINIENS SUR MODELE EXPERIMENTAL
RAT-Trypanosoma brucei brucei.

Le choix du modèle expérimental rat/T.b.brucei a été retenu en fonction de différents critères :

1) l'utilisation possible au laboratoire de clones de T.b.brucei déjà adaptés au rat

2) la facilité du suivi des parasites (estimation de la parasitémie; vérification d'identité du variant)

3) les possibilités analytiques sur sérum de rat : oestradiol, testostérone et surtout gonadostimulines hypophysaires par des immunosérums spécifiques de la LH et de la FSH de rat

4) la pratique au laboratoire des dosages des stimulines hypophysaires à partir du tissu hypophysaire

5) la pratique de la quantification du contenu hypothalamique en neuropeptide gonadotrope LH-RH chez le rat

6) enfin, la connaissance au laboratoire de la composition et de la structure du manteau de surface de T.b.brucei multiplié sur rat et donc la possibilité d'utiliser tout ou une partie de ce matériel comme élément test de l'axe gonadotrope.

Les travaux de GRIFFIN et ALLONBY(50) ayant dès 1979 mis en évidence la possibilité d'expériences cliniques différentes pour un même trypanosome (T.b.congolense) chez des animaux apparemment voisins (chèvre et mouton), le choix du modèle simple rat/T.b.brucei s'est encore imposé. En effet, si 3 formes d'évolutions différentes peuvent être observées en parasitose naturelle, notre modèle nous permet en fonction de clones choisis de simuler ces situations pathologiques à expressions variées sans changer le choix de l'animal.

Dans le cas de T.b.brucei, nous disposons en effet au laboratoire de deux clones de trypanosomes :

- Trypanosoma brucei brucei variant AnTat 1.1 A (Anvers trypanozoon antigenic type 1.1 A) capable de provoquer chez le rat une parasitémie aigüe

- Trypanosoma brucei brucei variant AnTat 1.1 E (Anvers

trypanozoon antigenic type 1.1 E) capable au contraire de provoquer chez le rat une forme chronique de parasitose.

Enfin , les travaux de MAC NEILLAGE et HERBERT 1968 (97) ayant montré une virulence liée au clone pour un animal hôte considéré, il nous est possible de comparer éventuellement l'effet pathologique de variants différents à expression aiguë par exemple en utilisant les clones tels que AnTat 1.1, AnTat 1.8 et AnTat 1.10.

Pour comprendre les mécanismes biologiques liés à l'expression chronique de la trypanosomiase, il faut avoir en mémoire le fait que l'évolution de la parasitémie pendant des semaines est liée à l'existence d'un phénomène biologique original : la "variation antigénique", caractérisée par le développement successif de populations trypanosomales "sérologiquement différentes" pour l'hôte parasité. Chaque population parasitaire induit l'élaboration d'anticorps trypanocides spécifiques du sérotype exprimé par la majorité des individus constituant cette population. Leur destruction par immunolyse se traduira par une réduction de la parasitémie de l'hôte ("crise"), puis elle sera suivie de la multiplication ("phase de récurrence") de trypanosomes "résistants" possédant un sérotype hétérologue.

Le rat présente là encore un grand avantage car il est possible de reproduire aisément l'évolution des formes chroniques qui se caractérisent par des pics parasitémiques successifs alors que la forme aiguë se présente quant à elle en une seule vague parasitémique rapidement mortelle en 6 à 7 jours.

A) MISE EN EVIDENCE D'UN DESEQUILIBRE HORMONAL CHEZ LE RAT APRES INFESTATION AIGUE PAR T.b.brucei VARIANT AnTat 1.1 A

Nous nous sommes principalement intéressés à la sécrétion gonadique du rat en comparant des animaux sains ou parasités. Nous avons retenu le dosage de la testostérone et de l'oestradiol ainsi que le dosage des facteurs gonadotropes hypophysaires de la synthèse stéroïdienne (FSH et LH).

La méthode d'exploration de l'axe hypophyso-gonadotrope a consisté aussi en une quantification directe des stimulines au niveau hypophysaire à partir du tissu prélevé et aussi au niveau de l'hypothalamus pour le dosage de la neurosécrétion LH-RH.

1) Matériel et méthodes

a) Sexes et conditions d'élevage des animaux

Le travail a été réalisé sur des rats Sprague Dawley mâles. Les animaux ont été conservés en animalerie avec un rythme d'éclairage de 12 h par 12 h, à une température de 18 à 20°C et ont eu libre accès à la nourriture et à la boisson.

b) Prélèvement des tissus

Les rats sont sacrifiés par décapitation le matin entre 9 h et 11 h. Le sang recueilli est laissé à température ambiante durant 15 minutes afin de faciliter sa coagulation avant une centrifugation à 1000 g pendant 30 minutes à 4°C dont le but est de séparer le sérum qui est conservé à -20°C.

Les taux d'hormones stéroïdes (testostérone et oestradiol), des gonadostimulines (LH, FSH) sont déterminés à partir des sérums par dosages radioimmunologiques.

L'hypophyse est prélevée de la base du crâne par incision du diaphragme sus-cellaire, puis congelée à -20°C en vue des dosages des gonadostimulines.

Le cerveau est dégagé de la boîte crânienne, refroidie quelques minutes sur une plaque réfrigérante pour faciliter le prélèvement de l'hypothalamus. Le matériel est immédiatement congelé à -20°C dans 0.2 ml d'HCl 0.1 N jusqu'au moment du dosage radioimmunologique de la gonadolibérine LH-RH.

Les méthodes de dosages radioimmunologiques des gonadostimulines et de la gonadolibérine sont décrites dans l'appendice technique.

2) Etude des dysfonctions endocriniennes lors d'une infestation aigüe par T.b.brucei variant AnTat 1.1 A chez le rat mâle "âgé"

a) Infestation

Les stabilats utilisés correspondent à des populations parasitaires clonées qui nous sont fournies par le laboratoire de

sérologie de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers.

Nous avons sélectionné le type antigénique AnTat 1.1 A dont le clonage a été effectué selon le protocole rappelé figure 12, qui montre l'origine sauvage du parasite (prélèvement initial sur antilope) et le processus retenu pour l'adaptation sur rongeurs (souris, rat).

Le stabilat parasitaire, conservé à -80°C , nécessite une réactivation sur souris. Le développement de la parasitémie sur souris s'effectue très rapidement. Deux jours après l'inoculation (figure 13), la multiplication des parasites devient très importante donnant des concentrations en protozoaires de l'ordre de 500 à $600 \cdot 10^6$ trypanosomes/ml de sang, numération faite selon la méthode d'HERBERT et LUMDSEN 1976 (53).

Les souris sont sacrifiées à 48 heures d'évolution pour éviter tout risque de variation antigénique et disposer d'une population sérologique homogène. Le sang de souris prélevé par ponction cardiaque est alors dilué en tampon phosphate glucosé (PSG) (NaCl 44mM, NaH_2PO_4 3mM, Na_2HPO_4 57mM, glucose 0.1%) pour obtenir une suspension équivalent à $10 \cdot 10^6$ cellules/ml.

Dans le protocole des rats :

- 9 rats mâles de 400 à 600 grammes âgés de 10 mois sont infestés par $50 \cdot 10^6$ trypanosomes injectés par voie intrapéritonéale sous un volume de 5 ml de sang de souris dilués en tampon PSG

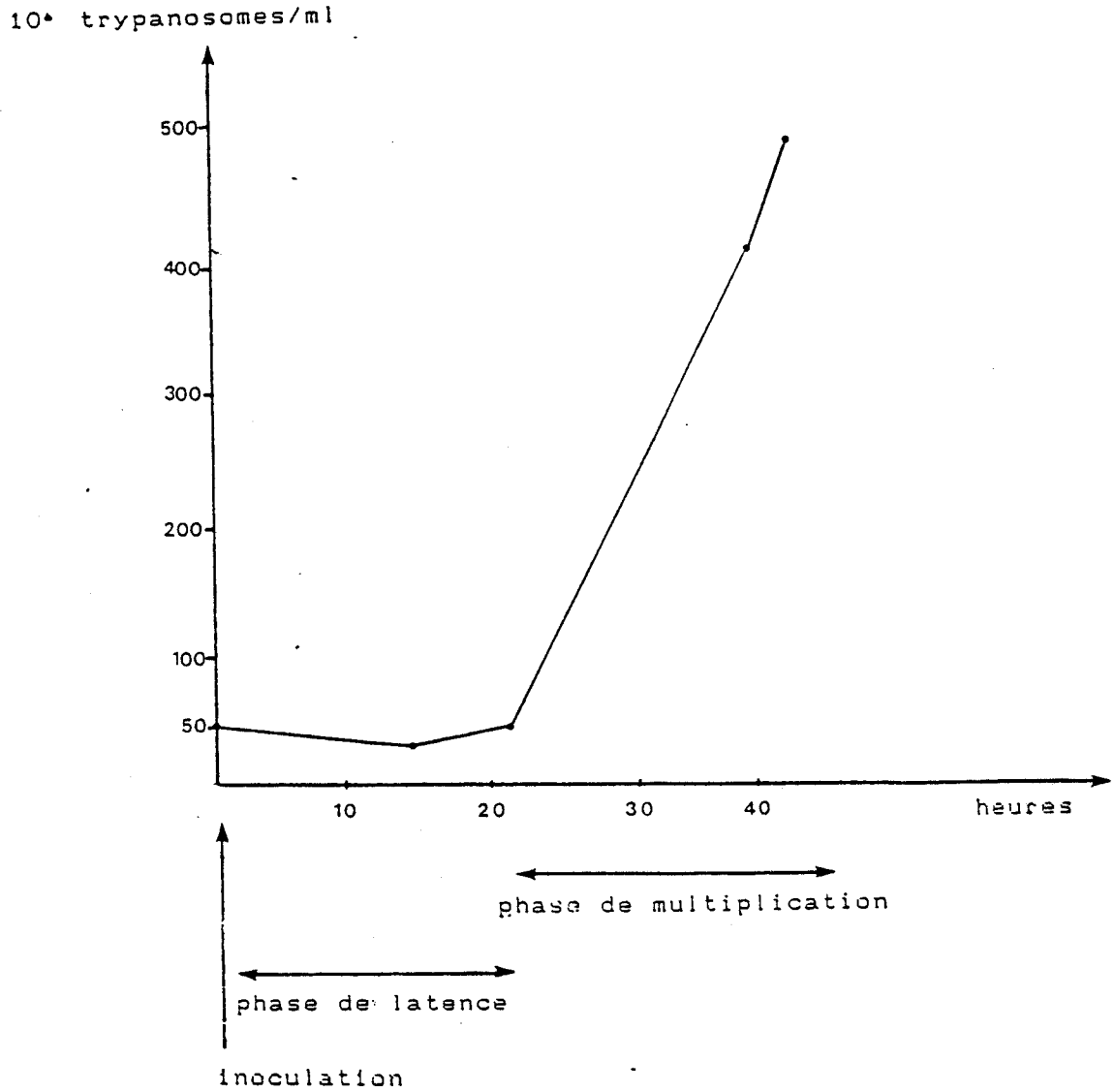
- 8 rats de même âge et même poids considérés comme animaux témoins ont reçu 5ml d'un mélange sang de souris saine/PSG (1:8 V/V). Cette solution représente un équivalent de la quantité de sang de souris introduite lors de l'infestation expérimentale.

Les animaux sont sacrifiés 3 jours après l'inoculation. Le matériel biologique est conservé congelé jusqu'au moment des dosages.

b) Expression des résultats concernant les variations des taux hormonaux tissulaires et sériques

Dans les textes ou les tableaux, les valeurs sont accompagnées de l'erreur type à la moyenne. La détermination du degré de

PROFIL D'UNE PARASITEMIE AIGUE DEVELOPPEE PAR
T.b.brucei VARIANT AnTat 1.1 A MULTIPLIE SUR
SOURIS



Numération effectuée sur 3 souris infestées .
La valeur retenue étant la moyenne des 3 comptages.

FIGURE 13

signification des variations constatées (d'après la probabilité existante pour que deux mesures soient identiques) est calculée suivant la méthode du test-t de STUDENT-FISCHER concernant la comparaison de deux séries de mesures (méthode décrite à propos de la sensibilité des dosages dans l'appendice technique). Une variation est dite significative si $P < 0.05$.

c) Résultats

Les résultats des dosages radioimmunologiques des hormones stéroïdiennes des gonadostimulines sériques et hypophysaires des rats âgés de plus de 10 mois infestés et sains sont résumés dans le tableau VI.

a) Dosages radioimmunologiques des hormones stéroïdiennes sexuelles

* Oestradiol

Les valeurs normales d'oestradiol correspondant à la série témoin s'inscrivent dans les limites de 4 à 10 ng/ml. Le taux moyen calculé est de 7.5 ± 0.8 ng/ml. On peut noter que cette valeur passe à 3.01 ± 0.76 ng/ml après 3 jours de parasitémie.

Sur 8 animaux infestés nous observons :

- 2 cas où les valeurs d'oestradiol n'ont pu être déterminées car en dessous du seuil de détection de la méthode
- 2 cas où les concentrations sont inférieures à la valeur normale la plus basse
- 4 cas où les taux se situent dans la limite inférieure normale. La différence entre les deux séries de mesure est hautement significative ($P < 0.01$).

La parasitémie aiguë provoque donc chez le rat mâle une diminution très importante du taux d'oestradiol circulant.

* Testostérone

Les valeurs de testostéronémie trouvées dans la série témoin sont comprises entre 0.24 et 3.04 $\mu\text{g/ml}$ avec une valeur moyenne de 1.24 ± 0.32 $\mu\text{g/ml}$. On note une variation individuelle importante dans la série des animaux témoins.

TABLEAU VI

BILAN ENDOCRINIEN DE BASE DES RATS AGES DE 10 MOIS
INFESTES OU NON PAR T.b.brucei AnTat 1.1 A

: Rats témoins " sang de souris " :

rats	TESTOS- TERONE ($\mu\text{g/ml}$)	OESTRA- DIOL (ng/ml)	FSH SERIQUE (ng/ml)	FSH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH SERIQUE (ng/ml)
A	0.49	5	327.5	25.62	170.4	12
B	1.72	10	290	22	129.5	28.2
C	3.04	8	352	27	175.8	30.3
D	0.38	4	270	31.2	135	6.41
E	1.6	10	375	49.7	188.6	28.92
F	0.24	5	412	51.2	255.8	6.91
G	1.23	10	423	51.44		19.57
H	1.19	8	394	34.48		
MOYENNE	1.24 ± 0.32	7.5 ± 0.8	355.4 ± 19.8	36.5 ± 4.3	176.1 ± 18.9	18.9 ± 3.9

: Rats infestés:

rats	TESTOS- TERONE ($\mu\text{g/ml}$)	OESTRA- DIOL (ng/ml)	FSH SERIQUE (ng/ml)	FSH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH SERIQUE (ng/ml)
1	0.54	>0.005	284	29.3	365.2	18
2	0.42	5	304	41.8	200	3.12
3	0.99	4	308	74	479.4	35.71
4	0.61	1.5	266	37.9	136.8	6.49
5	0.71	5	297	38.4	134.9	16.37
6	0.6	>0.005	376	95.1	252.9	19.83
7	0.36	5	312.5	35.31	679.3	14.21
8	0.74	3.5		22.54	411.6	14.33
9				25.7	460.25	
MOYENNE	0.62 ± 0.06	3.01 ± 0.76	306.8 ± 13.0	44.4 ± 8.0	346.7 ± 60.6	16.0 ± 3.45
PROBA- BILITE	P>0.1 non signif.	P<0.01 signif.	0.1<P<0.05 non signif.	P>0.1 non signif.	P<0.01 signif.	P>0.1 non signif.

Pour la série d'animaux parasités, toutes les valeurs de testostérone se situent en dessous de 1 µg/ml, la moyenne des valeurs se situant à 0.62 ± 0.06 µg/ml et mettant en évidence une diminution très sensible de la testostéronémie au cours de l'infestation du rat. Les grandes variations individuelles observées dans la série témoin expliquent le résultat non significatif du test statistique.

Toutefois, nous constatons que la sécrétion gonadique perçue tant pour l'oestradiol circulant que pour la testostéronémie est rapidement modifiée après injection de trypanosomes, l'ensemble des animaux infestés présentant un hypogonadisme.

Ces hypofonctionnements gonadiques peuvent être, en hypothèse, soit d'origine haute par dysfonctionnement de la commande hypothalamo-hypophysaire, soit d'origine basse par altération de la fonction endocrine testiculaire.

Pour affirmer ou infirmer cette dernière hypothèse, nous avons effectué un examen histologique comparatif de testicules provenant de rats sains et de rats parasités. Les examens microscopiques sur coupes de testicules (planche I), n'ont pas révélé d'anomalies morphologiques majeures: les cellules de Leydig ainsi que les canaux séminifères ne présentant aucune lésion apparente.

Nous avons donc recherché la mise en évidence d'une origine haute par dysfonction hypothalamique et/ou hypophysaire. La première exploration entreprise a été celle du dosage des gonadostimulines LH et FSH dans le sérum et l'hypophyse des animaux.

β) Dosages radioimmunologiques des gonadostimulines sériques

* LH sérique

Les taux moyens d'hormone lutéinisante sérique ont été estimés à :

- 18.9 ± 3.9 ng/ml pour la série témoin
- 16.0 ± 3.45 ng/ml pour la série d'animaux infestés.

La différence constatée entre ces deux séries n'est pas

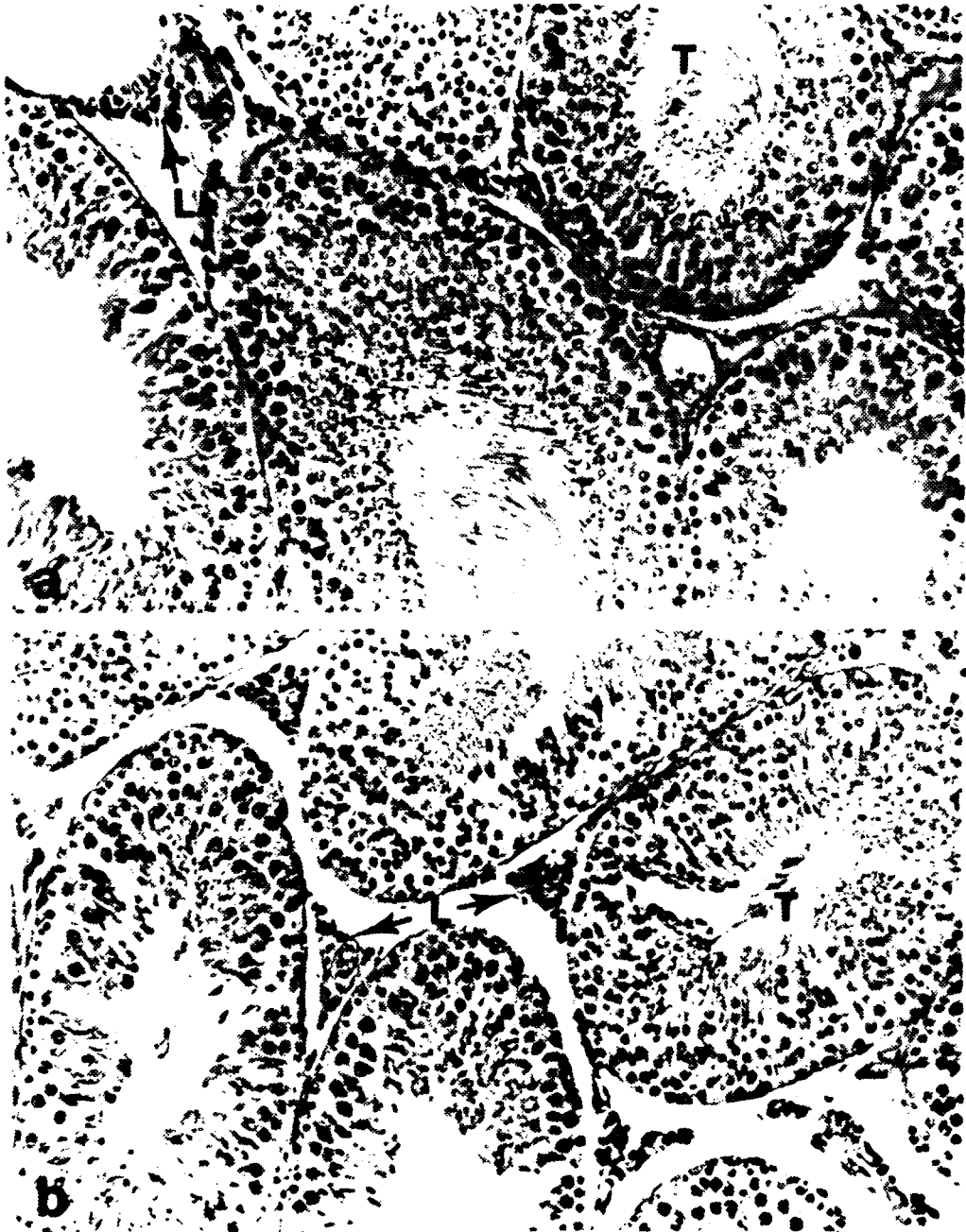
ASPECT MICROSCOPIQUE DU TESTICULE D'UN
RAT SAIN (a) ET D'UN RAT INFESTE (b)

GROSSISSEMENT X70

L : cellules de LEYDIG

T : tubes séminifères

La comparaison des deux microphotographies ne montre aucune
différence notable



significative. Notons cependant que des variations individuelles très importantes rendent difficile l'interprétation des résultats.

Ainsi, à partir des 8 échantillons sanguins issus d'animaux parasités, nous avons relevé deux cas où le taux de LH sérique est très différent, c'est à dire :

- un taux fortement abaissé à 3.2 ng/ml

- ou un taux à 35.71 ng/ml correspondant à une valeur très supérieure au taux normal le plus élevé rencontré dans le groupe témoin.

Ces résultats peuvent être confirmés au regard des dosages de la testostérone où, respectivement, nous retrouvons les valeurs de 0.42 µg/ml dans le premier cas et de 0.99 µg/ml dans le second. Mais cette situation ne peut être généralisée, en effet, pour une valeur de LH normale, des taux de testostérone retrouvés peuvent varier dans des limites très larges.

Il semble donc que le dosage de LH sérique, s'il peut dans certaines situations individuelles, rendre compte du déficit en testostérone, il peut être en défaut et poser alors un problème d'interprétation.

* FSH sérique

Pour les animaux témoins, les taux de FSH sérique se situent entre 270 et 423 ng/ml avec un taux moyen de 355.4 ± 19.8 ng/ml.

Pour les animaux infestés, cet intervalle est plus réduit et vaut 268 à 376 ng/ml correspondant à un taux moyen de $306,8 \pm 13.0$ ng/ml.

Comme dans le cas de la LH, on constate une diminution de la valeur moyenne de la gonadostimuline, mais cette variation n'apparaît pas significative par le calcul statistique.

De ces résultats, il semble donc que la diminution des hormones stéroïdes sexuelles (testostérone, oestradiol) constatée durant l'infestation par T.b.brucei chez le rat ne soit pas liée apparemment à un déficit en gonadostimulines sériques (LH, FSH) qui demeurent dans la zone de valeurs sensiblement normales.

Les dosages des gonadostimulines hypophysaires et de la gonadolibérine hypothalamique (LH-RH) des mêmes animaux ont été alors effectués.

δ) Dosages radioimmunologiques des gonadostimulines hypophysaires

* LH hypophysaire

Réalisés à partir d'hypophyses de rats sains, les dosages radioimmunologiques de LH hypophysaire ont fixé les valeurs normales entre 129.5 et 255.8 µg de LH par hypophyse, le taux moyen étant estimé à 176.1 ± 18.9 µg/hypophyse.

Chez les animaux infestés, ces valeurs sont augmentées dans 5 cas sur 9 et chez un animal l'augmentation de LH hypophysaire est corrélée avec un taux élevé de LH sérique. Pour le groupe d'animaux infestés, le taux moyen de LH hypophysaire de 346.7 ± 60.6 µg/hypophyse en démontre l'augmentation significative à $P < 0.01$.

* FSH hypophysaire

La variation de FSH hypophysaire est plus nuancée. Le taux moyen de 36.5 ± 4.3 µg/hypophyse pour le groupe d'animaux témoins passe à 44.4 ± 8.0 µg/hypophyse durant la phase croissante de parasitémie.

Ainsi, à partir des résultats de ces dosages radioimmunologiques des gonadostimulines hypophysaires, nous retiendrons une augmentation significative des taux de LH et une augmentation plus discrète pour la FSH.

La synthèse des deux stimulines hypophysaires étant sous la dépendance de la gonadolibérine (LH-RH), nous avons effectué le dosage radioimmunologique de cette neurohormone dans le matériel hypothalamique prélevé.

ø) Dosage radioimmunologique de la gonadolibérine

Les taux de LH-RH exprimés en µg/hypothalamus figurent dans le tableau VII. Les valeurs moyennes de 3.1 ± 0.2 µg/hypothalamus pour la série témoin et de 3.0 ± 0.2 µg/hypothalamus chez les animaux infestés ne montrent pas de variation du contenu hypothalamique.

TABLEAU VII

DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE LA (LH-RH)
DES ANIMAUX SAINS ET PARASITES

rats agés de 10 mois	LH-RH
sang de souris	ng/hypothalamus
A	3.3
B	2.7
C	2.2
D	4.4
E	2.4
F	2.5
G	3.6
H	3.2
MOYENNE	3.1 ± 0.2
rats agés de 10 mois	LH-RH
infestés	ng/hypothalamus
1	1.5
2	3.5
3	2.5
4	2.2
5	3.5
6	3.4
7	4.0
8	2.9
9	3.0
MOYENNE	3.0 ± 0.2
PROBABILITE	P>0.1 non signif.

Cependant, on sait que la sécrétion de LH-RH s'effectue de façon pulsatile, selon un transport axonal, la fonction de la neurosécrétion dépendant de sa réception hypophysaire. Dès lors, les dosages de la gonadolibérine ne peuvent rendre compte de l'effet réel sur l'hypophyse de la neurohormone dosée. Néanmoins, nous pouvons par cette approche tissulaire, éliminer une anomalie de production hypothalamique de la neurosécrétion gonadotrope.

d) Conclusion

Cette étude de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique de rat trypanosomé met en évidence chez le rat mâle de 400-600 g, un hypogonadisme attesté par une diminution de la stéroïdogénèse testiculaire accompagnée d'une synthèse hypophysaire de LH accrue mais non traduite au plan sérique.

Aucun changement des taux des deux stimulines sériques LH et FSH n'est en effet noté ce qui amène à évoquer différentes hypothèses :

1) Anomalie de "sécrétion hypophysaire" = La LH et la FSH en réponse à l'hypogonadisme seraient synthétisées en quantité importante mais non totalement excrétées dans le sérum

2) Anomalie "moléculaire" des gonadostimulines = l'hypophyse en réponse à l'hypogonadisme produit en quantité importante une LH et une FSH dont la structure est modifiée qui provoque une situation par défaut d'un principe gonadotrope non ou moins fonctionnel.

On ne peut éliminer l'éventualité d'une synthèse hypophysaire accrue de LH/FSH qui serait normalement excrétée mais dont les formes circulantes seraient rapidement dégradées et sous-estimées.

Pour éliminer la notion d'âge moyen des rats utilisés dans le protocole initial et l'influence éventuelle chez certains sujets d'un état de pré-andropause, nous avons complété l'étude par l'application du même protocole à des rats jeunes de 45 jours infestés par le même variant de T.b.brucei (AnTat 1.1 A).

3) Etude des dysfonctions endocriniennes sur rats "jeunes"
après infestation aigüe par T.b.brucei variant
AnTat 1.1 A

a) Matériel biologique animal et mode d'infestation

Huit rats âgés de 45 jours de poids compris entre 280 et 300 g ont été infestés par $25 \cdot 10^6$ trypanosomes préalablement multipliés sur souris.

Douze rats de même âge et de même taille ont servi de témoins et ont été répartis comme suit : 6 rats n'ayant reçu aucun traitement (rats sains), et 6 rats ayant reçu, 3 jours avant le sacrifice, la même quantité de sang de souris saine que les animaux infestés.

Après 3 jours d'infestation, un contrôle de la parasitémie montre un taux de $200 \cdot 10^6$ trypanosomes par ml pour chaque animal parasité.

Après sacrifice, le sang et l'hypophyse de chaque rat ont été prélevés en vue des dosages.

b) Résultats

Les résultats des dosages radioimmunologiques sont résumés dans le tableau VIII.

a) Dosages radioimmunologiques des hormones stéroïdiennes sexuelles

* Dosage de l'oestradiol

Les concentrations moyennes des deux séries "témoins" (rats sains et rats sang de souris) sont respectivement de $5.83 \pm 0.3 \text{ ng/ml}$ et de $7.0 \pm 0.44 \text{ ng/ml}$. La différence constatée justifie les précautions supplémentaires prises dans ce protocole à savoir le stress dans l'interprétation des résultats.

L'injection d'une quantité de sang de souris provoque en effet une légère augmentation mais non significative du taux d'oestradiol.

Pour la majorité des animaux infestés (7 cas sur 8), les valeurs d'oestradiol sont demeurées inchangées. La moyenne des valeurs se

TABLEAU VIII

BILAN ENDOCRINIEN DE BASE DES RATS DE 45 JOURS
INFESTES OU NON PAR T.b.brucei variant AnTat 1.1 A

: Rats sains:

Rats	TESTOS- TERONE ($\mu\text{g/ml}$)	OESTRA- DIOL (ng/ml)	FSH SERIQUE (ng/ml)	FSH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH SERIQUE (ng/ml)
A	4.53	5	1253	142	89.9	36.3
B	7.26	7	711	92	111.9	30.3
C	2.38	5	1056	124	93.9	55.3
D	3.26	6	666	102	85.7	45.8
E	2.45	6	496	124	116.8	52.9
F	6.15	8	385	62	99.1	23.1
MOYENNE	4.34 ± 0.82	5.83 ± 0.3	761.1 ± 135.6	107.6 ± 11.6	99.5 ± 5.0	40.8 ± 0.5

: Jeunes rats inoculés avec le sang de souris saines:

rats	TESTOS- TERONE ($\mu\text{g/ml}$)	OESTRA- DIOL (ng/ml)	FSH SERIQUE (ng/ml)	FSH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH SERIQUE (ng/ml)
G	5.7	7	663	154	159	12.3
H	3.42	8	1000	148	147.9	25.4
I	11.1	8	486	96	84.14	31.4
J	1.57	7	1062	174	71.65	69.7
K	2.43	5	819	150	108.2	9.9
L	-	7	984	-	130.33	25.9
MOYENNE	4.84 ± 1.7	7.00 ± 0.44	835.6 ± 91.7	128.6 ± 15.7	116.8 ± 14.2	29.3 ± 0.8

: Jeunes rats infestés:

rats	TESTOS- TERONE ($\mu\text{g/ml}$)	OESTRA- DIOL (ng/ml)	FSH SERIQUE (ng/ml)	FSH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH SERIQUE (ng/ml)
1	2.38	5	888	142	72.7	9
2	4.18	5	548	56	85.5	12.9
3	1.78	5	-	64	69.5	9
4	5.98	10	1074	166	116.6	16.9
5	2.95	6	837	86	126.3	1.19
6	5.71	6	1649	78	69.19	10.6
7	2.43	6	1034	188	113.5	35.87
8	5.31	7	1777	146	158.7	-
MOYENNE	3.92 ± 0.56	6.25 ± 0.59	975.2 ± 150.8	113.2 ± 16.5	101.52 ± 11.5	15.2 ± 0.35
PROBA- BILITE	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.	P<0.05 signif.

situé à 6.25 ± 0.59 ng/ml, résultat non significatif et intermédiaire entre les 2 séries de rats témoins.

* Dosage de la testostérone

L'expérimentation menée sur jeunes rats montre de grandes variations individuelles dans le dosage de la testostérone. Chez le rat de 280-300 g, la testostéronémie varie en effet de $2.45 \mu\text{g/ml}$ à $7.26 \mu\text{g/ml}$. Cette observation est retrouvée pour la série témoin ayant reçu une injection de sang de souris non parasitée (taux allant de $1.57 \mu\text{g/ml}$ à $11.1 \mu\text{g/ml}$).

Les moyennes des dosages des deux séries sont cependant proches: respectivement de $4.34 \pm 0.82 \mu\text{g/ml}$ pour les animaux sains et de $4.84 \pm 1.7 \mu\text{g/ml}$ pour les rats "sang de souris" et ne sont pas significativement différentes.

Chez les animaux parasités on constate une faible diminution également non significative, avec une concentration moyenne de testostérone de $3.92 \pm 0.56 \mu\text{g/ml}$. Notons toutefois que ces taux se situent dans des valeurs normales basses.

Le bilan endocrinien à 3 jours est donc chez les rats de cette série trop prématuré pour entraîner de profondes modifications de la sécrétion gonadique, les risques de mort des animaux au delà du troisième jour, nous ont cependant obligé à retenir ce délai, cette tranche d'expérience aura cependant le grand intérêt de mettre en évidence la "réactivité" différente selon l'âge des animaux infestés.

β) Dosage radioimmunologique des gonadostimulines sériques

* Dosage de la LH sérique

Les dosages radioimmunologiques de l'hormone lutéinisante circulante donnent les valeurs moyennées suivantes :

- 40.8 ± 0.5 ng/ml pour les rats sains
- 29.3 ± 0.8 ng/ml pour les rats "sang de souris".

Dans ce dernier groupe d'animaux, nous avons relevé des valeurs

très éloignées de 9.9 à 69.7 ng/ml.

La différence entre les concentrations moyennes de LH des 2 séries de mesures peut paraître importante mais s'avère non significative par la méthode du test-t qui tient compte de chacune des valeurs expérimentales.

Chez les animaux parasités, nous avons observé une diminution nette des taux d'hormone lutéinisante sérique. A l'exception d'un cas (35.87 ng/ml), pour l'ensemble des animaux la LH sérique est très abaissée. Ces valeurs extrêmes constatées étant comprises entre 1.19 et 16.9 ng/ml. Le taux moyen calculé pour ce groupe d'animaux s'élève à 15.2 ± 0.35 ng/ml.

Les variations entre les différentes séries de mesures (rats parasités/rats sains et rats parasités/rats "sang de souris") sont significatives avec une valeur de $P < 0.01$ et $P < 0.05$ respectivement.

On constate cependant que les taux faibles de LH circulante ne sont pas systématiquement associés à de faibles valeurs de testostérone. Ceci peut être illustré par une observation type où la LH est quantifiée à 1.19 ng/ml tandis que la testostéronémie se situe dans les limites normales 2.95 μ g/ml.

* Dosage de la FSH sérique

Les valeurs de FSH circulante sont également très variables d'un animal à l'autre. Chez les animaux sains, les taux varient de 385 ng/ml à des concentrations 3 fois plus élevées à 1253 ng/ml. La moyenne calculée pour cette série expérimentale est de 761.1 ± 135.6 ng/ml.

Les variations sont toutes aussi importantes dans les deux autres séries expérimentales. Les valeurs moyennées étant :

- 835.6 ± 91.7 ng/ml chez les animaux "sang de souris"

- 975.2 ± 150.8 ng/ml chez les animaux parasités.

Dans ce dernier groupe d'animaux, signalons deux valeurs fortement augmentées respectivement 1649 et 1777 ng/ml.

Toutefois, l'augmentation de la FSH sérique n'est pas significative ($P > 0.1$) en comparaison statistique des valeurs moyennes.

Au total, l'infestation par trypanosome provoque sans équivoque une diminution nette de la LH circulante dans la majorité des cas (6 rats sur 8) alors que les concentrations de FSH sérique restent stables. On pourrait rapporter la faible diminution de testostérone à l'apparition trop récente de l'insuffisance gonadotrope.

8) Dosage radioimmunologique des gonadostimulines hypophysaires

* Dosage de la LH hypophysaire

La moyenne des dosages radioimmunologique de la LH hypophysaire dans chacune des séries expérimentales, exprimée par hypophyse sont les suivantes :

- 99.5 ± 5.0 μg pour les rats sains
- 116.8 ± 14.2 μg pour les rats "sang de souris"
- 101.5 ± 11.5 μg pour les rats infestés.

Bien que les valeurs moyennes soient sensiblement identiques, on notera dans la série expérimentale concernant les rats parasités, 3 animaux dont les valeurs hypophysaires (69.19, 69.5 et 72.7 μg /hypophyse) sont en deçà de la valeur normale la plus basse relevée chez les animaux sains. Deux de ces valeurs (69.19 et 69.5 μg /hypophyse) sont également inférieures au taux le plus faible noté dans la série témoin "sang de souris".

Ces variations ne sont cependant pas suffisantes pour conclure à une différence significative entre les différentes séries de mesures.

* Dosage de la FSH hypophysaire

Les variations dans les dosages radioimmunologiques de la FSH hypophysaire sont toutes aussi importantes.

Dans la série témoin rats sains les valeurs varient de 62 à 142 μg /hypophyse et de 96 à 174 μg /hypophyse chez les rats "sang de souris".

Nous avons relevé chez les rats parasités, deux concentrations

importantes (à 188 et 168 μg /hypophyse). Les moyennes respectives des différentes séries d'animaux étant de :

- 107.6 \pm 11.6 μg /hypophyse pour les rats sains
- 128.6 \pm 15.7 μg /hypophyse pour les rats "sang de souris"
- 113.2 \pm 16.5 μg /hypophyse pour les rats parasités.

Les tests statistiques n'ont pas montré de différence significative entre chaque série.

c) Conclusion

Les troubles endocriniens notés par l'infestation de "jeunes" rats adultes se caractérisent essentiellement par une diminution importante des taux de LH circulante, alors qu'aucune modification des concentrations des gonadostimulines hypophysaires et de l'hormone folliculante sérique n'est observée. Les retentissements au niveau de la sécrétion gonadotrope sont peu perceptibles, les taux d'oestradiol restent inchangés et la diminution de la testostéronémie n'est pas significative.

On peut admettre que les conditions de 3 jours de parasitémie aiguë ne sont pas suffisantes pour mettre en évidence l'hypogonadisme dans une définition complète ; mais la chute de LH accompagnée chez certains rats de diminution de testostérone rappelle le tableau enregistré sur rat plus âgé de 450 à 600g.

Pour la mise en évidence d'hypogonadisme trypanosome dépendant, deux classes d'animaux ont été utilisés : rats âgés de plus de 10 mois de 400 à 800 g et rats plus jeunes d'environ 45 jours de 250 à 300 g.

Nous avons constaté que les taux de testostérone des rats jeunes témoins sont quatre fois plus élevés que les taux observés chez les rats témoins plus âgés (4.84 \pm 1.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et 1.24 \pm 0.32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivement). De même, les concentrations de LH et FSH sériques sont 2 fois plus importantes dans le groupe des rats de 45 jours (835.6 \pm 91.7 ng/ml de FSH et 29.3 \pm 0.8 ng/ml de LH chez les jeunes rats, comparés au 355.4 \pm 19.8 ng/ml de FSH et 18.9 \pm 3.9 ng/ml de LH des rats âgés). Enfin, au niveau de l'hypophyse, les

taux de FSH sont plus élevés chez les jeunes rats de 5 fois ($128.6 \pm 15.7 \mu\text{g/hypophyse}$) par rapport aux rats plus âgés ($36.5 \pm 4.3 \mu\text{g/hypophyse}$). La concentration de LH hypophysaire reste sensiblement identique sur les 2 groupes d'animaux ($116.8 \pm 14.2 \mu\text{g/hypophyse}$ chez les plus jeunes; $176.1 \pm 18.9 \mu\text{g/hypophyse}$ chez les rats âgés).

Quant à l'effet de la parasitémie aigue au troisième jour, il est différent selon l'animal étudié. Chez les rats de 10 mois, les dysfonctions endocriniennes se manifestent par une diminution importante des taux de testostérone et d'oestradiol avec au niveau hypophysaire, une augmentation des concentrations relatives des gonadostimulines. La même infestation chez le rat jeune provoque essentiellement une baisse de la valeur de LH sérique parfois accompagnée d'une diminution de la testostérone. Dans les deux séries, animaux jeunes et âgés, la même concentration relative de LH circulante a été retrouvée ($15.2 \pm 0.35 \text{ ng/ml}$ pour les rats jeunes et 16.0 ± 3.45 chez les rats de 10 mois) (figure 14).

De ces éléments expérimentaux, on pourra évoquer le fait que chez le rat de 10 mois, en début d'andropause, l'effondrement des taux d'hormones sexuelles périphériques est très rapide avec le développement de la parasitémie et que l'on peut noter une diminution très sensible des stimulines hypophysaires circulantes en particulier pour la LH.

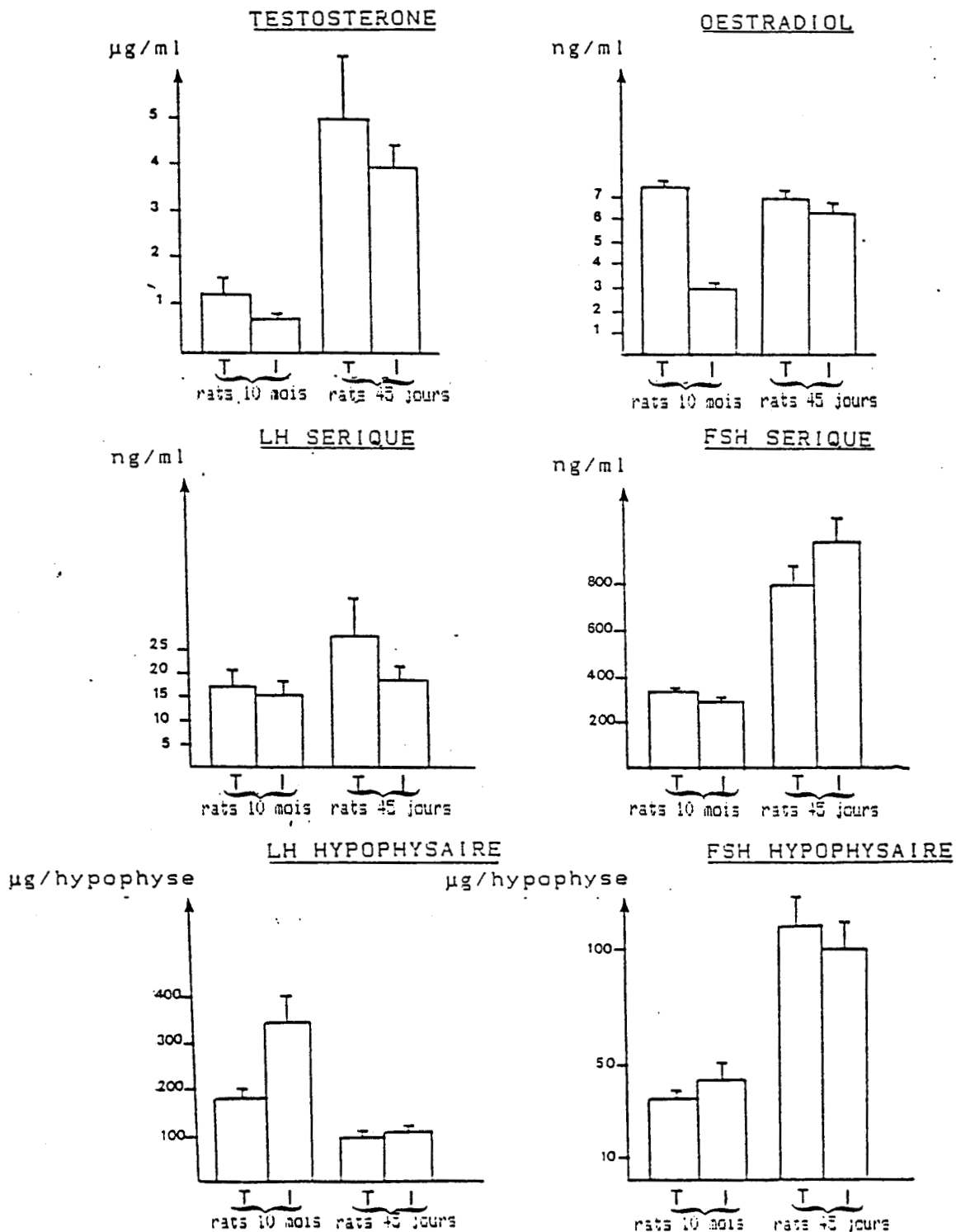
Chez le rat jeune, la baisse de LH existe mais ne s'exprime pas au niveau testiculaire dans la majorité des cas.

Dans le bilan de ces hypogonadismes dont le mécanisme d'apparition met en cause la LH, il est normal au plan interprétatif de ne pas trouver au regard de la chute de testostéronémie, d'élévation en retour de la LH. Il est surprenant de ne pas constater d'effondrement de la LH alors que la synthèse hypophysaire a été vérifiée normale.

On est donc amené à évoquer la notion de micro-hétérogénéité structurale et fonctionnelle de la LH et en particulier l'hétérogénéité glycanique qui se traduit au niveau des oligosaccharides par des degrés de sialylation et/ou de sulfatation différente selon les isoformes (WIDE 1985 (140), ULLOA-AGUIRRE et coll. 1986 (134)).

Ces iso-hormones biologiquement inégales dans leur fonctionnalité

VARIATION DES TAUX HORMONAUX CHEZ LE RAT INFESTE EN FONCTION DE L'AGE



T: TEMOINS
I: INFESTES

FIGURE 14

sont secrétées en quantité relative en fonction de l'âge. Ainsi dans notre cas, on pourra admettre du fait de l'équilibre "fonctionnel" LH du rat âgé, que toute diminution du taux circulant a des répercussions fonctionnelles immédiates au plan périphérique testiculaire.

Chez le rat de 45 jours, la LH secrétée correspond dans sa totalité à des isoformes actives, une diminution même sensible du taux circulant ne pouvant donc pas forcément se traduire au plan de la stéroïdogénèse testiculaire.

On pourrait donc suggérer que le mécanisme à l'origine de l'hypogonadisme soit lié non pas à une hyposécrétion mais à une dégradation dans le sang périphérique. On sait d'ailleurs déjà que la demie vie des iso-hormones est inégale. On pourra donc retenir les hypothèses :

- d'une dénaturation par dissociation libérant les sous unités α et β qui sont, séparément, dépourvues d'effet gonadotrope

- d'une attaque par protéases des stimulines circulantes, cette dégradation étant plus importante selon les iso-hormones et ayant donc un retentissement fonctionnel proportionnel.

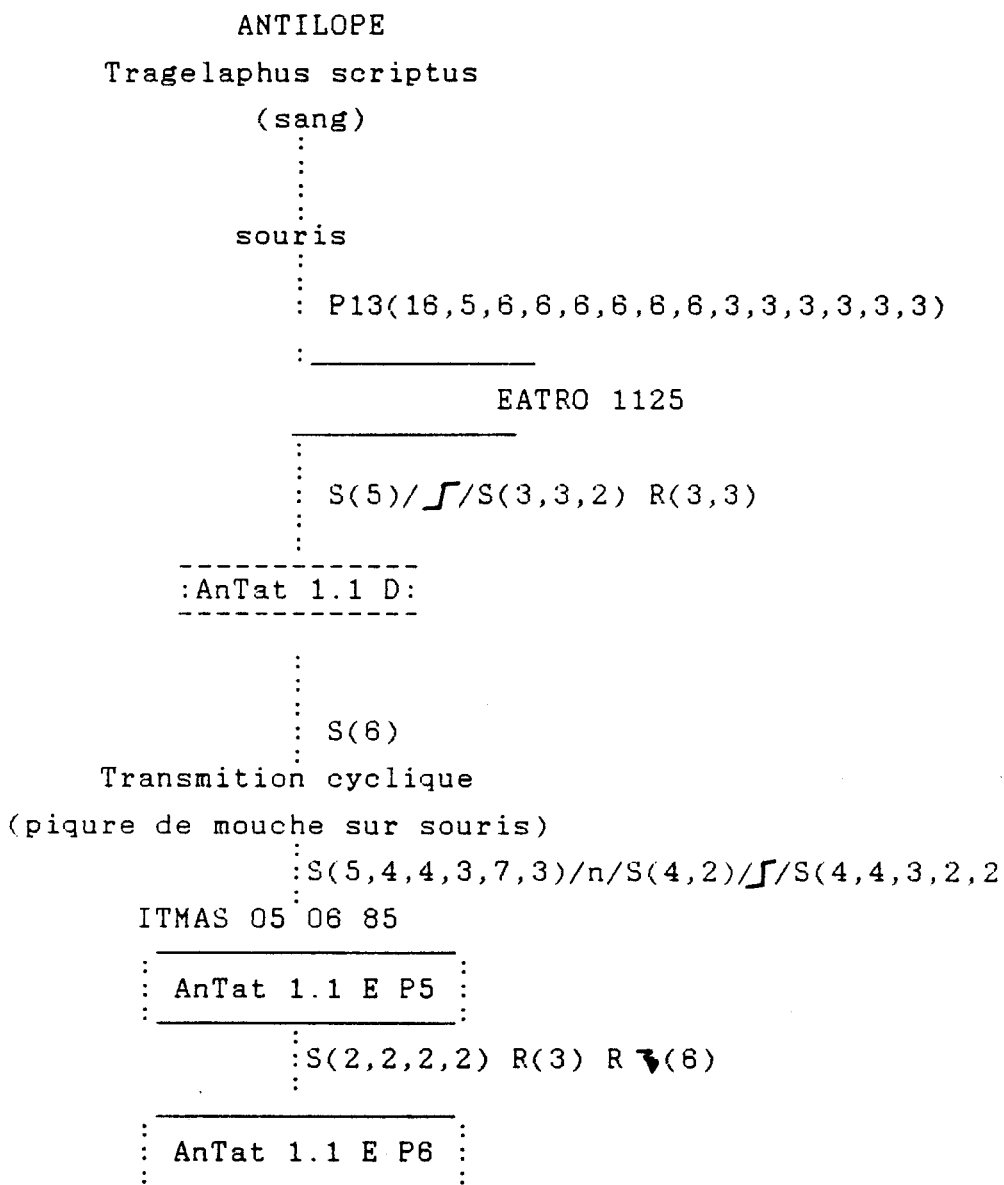
Il nous est apparu intéressant de comparer les rats de 45 jours et ceux de 10 mois en provoquant non plus une parasitémie aiguë mais une parasitémie chronique de plusieurs semaines d'évolution qui se rapproche beaucoup plus de la pathologie humaine.

B) ETUDE DES DESEQUILIBRES ENDOCRINIENS SUR RAT INFESTE PAR UNE SOUCHE CHRONIQUE DE T.b.brucei VARIANT AnTat 1.1 E

1) Clonage du variant

Le laboratoire de sérologie d'Anvers nous a fourni un stabilat correspondant au clone AnTat 1.1E. L'historique de ce variant est schématisé (figure 15); le stabilat variant AnTat 1.1 D en constitue le matériel d'origine, une transmission cyclique mouche/souris; puis une stabilisation par passage souris-rat menant au clone 1.1 E.

CLONAGE DU VARIANT AnTat 1.1 E DE T.b.brucei



S(x,y,z):infestation souris-souris après x,y et z jours

R(x,y,z):infestation rat-rat après x,y et z jours

R ∇ :rat irradié

/ \int /:clonage

/n/ :neutralisation

FIGURE 15

2) Evolution de la parasitémie après infestation par le variant AnTat 1.1 E

Le stabilat parasitaire AnTat 1.1E est injecté à des rats mâles Sprague Dawley par voie intradermique (100 trypanosomes dilués en tampon phosphate glucosé (PSG)). La parasitémie est suivie quotidiennement par prélèvement au niveau de la queue de l'animal. Deux séries d'animaux ont été retenues : rats 10 mois et rats 45 jours.

* Rats 10 mois

La courbe moyenne de parasitémie a été établie à partir de 6 rats infestés et suivis 21 jours (figure 16).

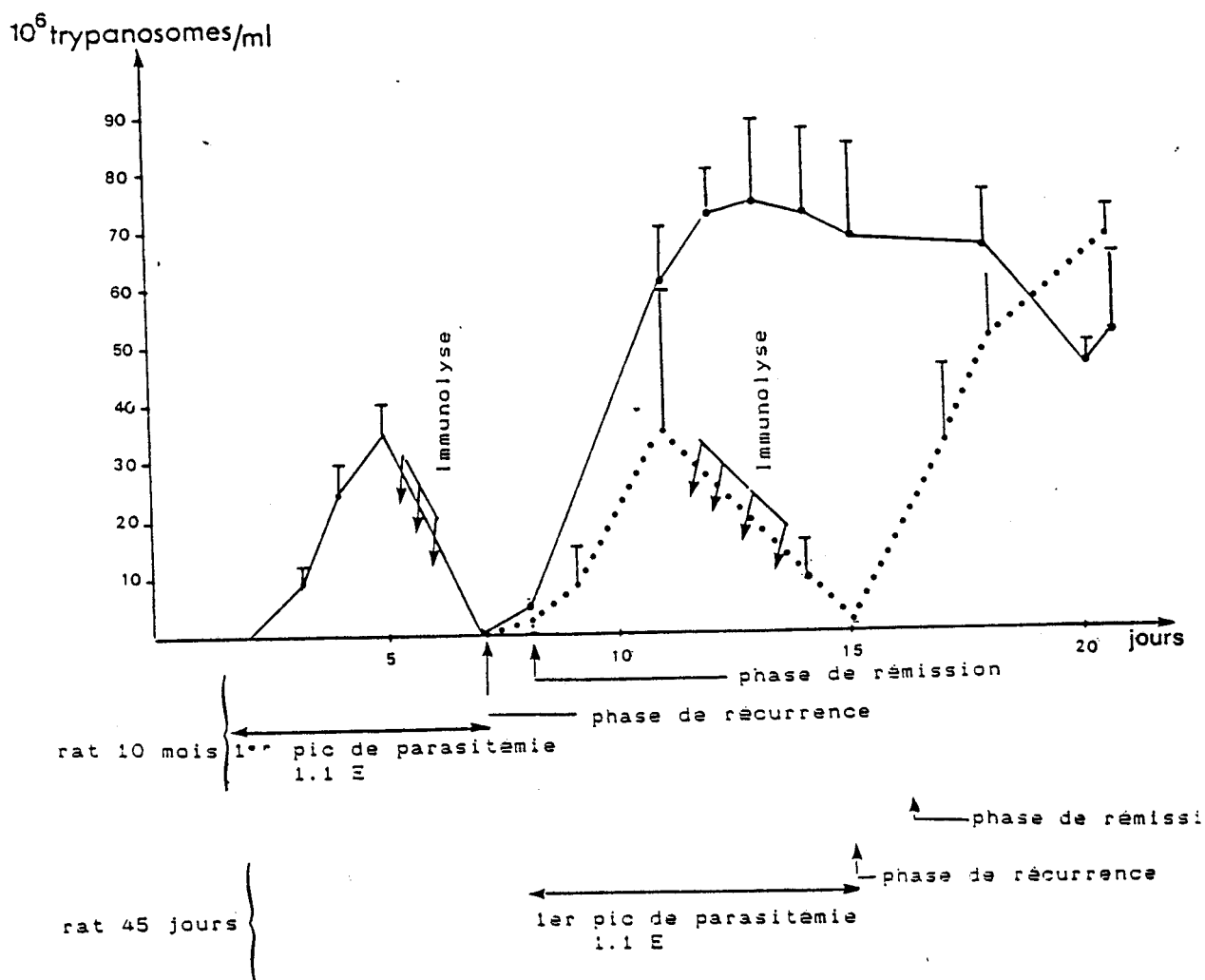
4 jours après l'inoculation, les animaux ont développé en moyenne une parasitémie évaluée à $21 \cdot 10^6$ trypanosomes/ml de sang. Cette population s'amplifie au cinquième jour pour atteindre un nombre moyen estimé à $37 \cdot 10^6$ cellules/ml. Le type antigénique correspond au variant AnTat 1.1E, il est détruit vers le septième jour par immunolyse, les rats ayant produit des anticorps dirigés contre ce sérotype. Aucun parasite n'est alors décelable dans les prélèvements sanguins (phase de rémission). Un hétérotype apparaît vers le neuvième jour (phase de récurrence). Au delà du douzième jour, le nombre de parasites demeure très élevé avec cependant la possibilité de constater des vagues de parasitémies successives dont l'importance est liée à la notion de réponse individuelle.

* Rats 45 jours

Chez les rats plus jeunes, la première vague de parasitémie débute plus tardivement, l'apparition des parasites n'étant mis en évidence que 8 à 9 jours après l'inoculation. L'évolution de la parasitémie (figure 16) présente ensuite les mêmes caractéristiques que celles précédemment observées pour le rat 10 mois à savoir: une première vague de parasitémie vers le onzième jour (plus ou moins 2 jours), suivi d'une phase de remontée de la population parasitaire vers le quatorzième jour (plus ou moins 2 jours). Le taux de parasites reste ensuite élevé (78 à $84 \cdot 10^6$ trypanosomes) pendant les 10 à 15 jours suivants.

Certains animaux sont demeurés vivants et ont été suivis pendant 31 jours.

EVOLUTION DE LA PARASITEMIE CHRONIQUE DEVELOPPEE
PAR T.b.brucei VARIANT AnTat 1.1 E



— Evolution de la parasitémie chez le rat de 10 mois
••••• Evolution de la parasitémie chez le rat de 45 jours

Numération effectuée sur 8 rats .

La valeur moyenne est accompagnée de l'écart type .

FIGURE 16

Ainsi l'évolution d'un variant chronique proche dans son évolution d'un parasite naturel est variable selon l'âge de l'animal étudié. Il semble que les animaux plus jeunes présentent une plus grande résistance à l'infestation au regard du délai séparant l'inoculation de l'apparition des premiers parasites dans la circulation sanguine, mais une fois la parasitémie établie, les critères évolutifs sont identiques pour les deux séries de rats.

3) Etude des paramètres endocriniens sur rats de 10 mois après infestation par T.b.brucei variant AnTat 1.1 E

Le bilan gonadique comprenant le dosage de la testostérone, de l'oestradiol et de l'hormone lutéinisante sérique et hypophysaire a été mené sur 30 rats âgés de 10 mois. A l'exception de 6 rats considérés comme animaux témoins et ayant reçu l'injection de 5 ml de tampon PSG, tous les sujets expérimentaux ont été infestés par 100 trypanosomes AnTat 1.1E.

Sur 24 rats infestés, des groupes de 6 animaux sont sacrifiés :

- après 3 jours (phase d'incubation ou aucun parasite n'est encore décelé dans le milieu sanguin)
- après 5 jours (développement de la première vague de parasitémie correspondant au type antigénique AnTat 1.1E)
- après 8 jours (phase de rémission)
- après 14 jours (phase de récurrence et de développement d'autres types antigéniques).

Les animaux témoins sont sacrifiés 14 jours après l'inoculation du tampon PSG.

Le sang et l'hypophyse prélevés sur chaque animal sont congelés à -20° C jusqu'au moment des dosages radioimmunologiques.

a) Résultats

α) Dosage radioimmunologique des hormones sexuelles

Les bilans gonadiques de chaque animal sont résumés dans les tableaux IX et X.

TABLEAU IX

BILAN ENDOCRICRINIEN DE BASE DES RATS AGES DE 10 MOIS
INFESTES OU NON PAR UNE SOUCHE CHRONIQUE DE T.b.brucei
VARIANT AnTat 1.1E

/Rats témoins/

rats	TESTOS- TERONE (µg/ml)	DESTRA- DIOL (ng/ml)	LH HYPO (µg/hypophyse)	LH PLASMA (ng/ml)
A	0.57	6	224.8	20
B	0.46	5.5	172.8	38.8
C	0.95	6	128.8	49.6
D	0.83	6	204	21.4
E	0.78	-	170	41.2
F	0.5	6	320	60.4
MOYENNE	0.68 ± 0.08	5.9 ± 0.1	230.9 ± 26.9	38.5 ± 6.4

/Après 3 jours de parasitémie/

rats infestés	TESTOS- TERONE (µg/ml)	DESTRA- DIOL (ng/ml)	LH HYPO (µg/hypophyse)	LH SERIQUE (ng/ml)
1	0.59	8	114	39.1
2	0.68	6	124	41.6
3	0.69	8	177.5	35.2
4	0.81	7.5	227.6	20.8
5	0.57	7	110.4	13
6	0.66	6.5	220	38
MOYENNE	0.67 ± 0.03	7.17 ± 0.33	162.2 ± 21.8	31.3 ± 4.7
PROBA- BILITE	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.

/Après 5 jours de parasitémie/

rats	TESTOS- TERONE (µg/ml)	DESTRA- DIOL (ng/ml)	LH HYPO (µg/hypophyse)	LH SERIQUE (ng/ml)
7	0.43	6.5	124.8	20.4
8	0.49	7	213.4	29.6
9	0.69	6	93.9	20.6
10	0.71	3.5	119.6	30.8
11	0.75	4.5	146.16	25.6
12	0.41	8.5	134.16	24.4
MOYENNE	0.58 ± 0.06	6.00 ± 0.73	138.67 ± 16.55	25.23 ± 1.78
PROBA- BILITE	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.	P<0.05 signif.	P>0.1 non signif.

TABLEAU X

BILAN ENDOCRICRINIEN DE BASE DES RATS AGES DE 10 MOIS
 INFESTES OU NON PAR UNE SOUCHE CHRONIQUE DE T.b.brucei
 VARIANT AnTat 1.1E
 (SUITE)

/Après 8 jours de parasitémie/

rats	TESTOS- TERONE (µg/ml)	DESTRA- DIOL (ng/ml)	LH HYPO (µg/hypophyse)	LH SERIQUE (ng/ml)
13	0.67	7	96.64	23.6
14	0.3	5.5	168.16	22.8
15	0.39	7.5	171.84	31.2
16	0.53	4.5	214.4	23.6
17	0.42	5	99.2	
18	0.33	6.5	101.2	
MOYENNE	0.44 ± 0.05	5.92 ± 0.53	141.91 ± 20.3	25.3 ± 1.9
PROBA- BILITE	P<0.05 signif.	P>0.1 non signif.	P<0.05 signif.	P>0.1 non signif.

/Après 14 jours de parasitémie/

rats	TESTOS- TERONE (µg/ml)	DESTRA- DIOL (ng/ml)	LH HYPO (µg/hypophyse)	LH SERIQUE (ng/ml)
19	0.94	7	228.2	35.6
20	0.42	5	151.5	21.2
21	0.34	6.45	202.4	28
22	0.42	6.5	180.8	20
23	0.23	5	138.3	25.2
24	1.39	5.5		20.8
MOYENNE	0.62 ± 0.18	5.91 ± 0.34	181.3 ± 16.4	25.1 ± 2.4
PROBA- BILITE	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.

L'intervalle normal de référence établi chez les animaux témoins est de :

- * 5.5 à 6 ng/ml pour l'oestradiol soit une moyenne de 5.9 ± 0.1 ng/ml
- * 0.46 à 0.95 ng/ml pour la testostérone soit une moyenne de 0.68 ± 0.08 ng/ml.

Les dosages radioimmunologiques de l'oestradiol chez les animaux infestés n'ont pas montré de variations significatives, les taux étant compris dans l'intervalle normal de référence ou au delà durant l'évolution de la parasitémie. Les valeurs moyennes retrouvées sont de 7.17 ± 0.33 ng/ml après 3 jours d'infestation, de 6.00 ± 0.73 ng/ml après 5 jours, de 5.92 ± 0.53 ng/ml après 8 jours et enfin de 5.91 ± 0.34 ng/ml après 14 jours.

Pour la testostéronémie durant la phase d'incubation de 3 jours, les taux d'androgène sont comparables à ceux de la série témoin avec une valeur moyenne de 0.67 ± 0.03 µg/ml.

Pendant la première vague de parasitémie (cinquième jour), une baisse sensible de la valeur moyenne de testostérone est notée (0.58 ± 0.06 µg/ml) où chez 6 animaux infestés : 4 possèdent des concentrations proches des valeurs de la limite inférieure normale et 2 des taux d'androgène en dehors de l'intervalle de référence. Cette variation n'est cependant pas significative (P > 0.1).

Durant la phase trypanolytique, huitième jour, le nombre d'animaux présentant une diminution de la testostéronémie est plus important, puisque sur 6 animaux, 4 ont des valeurs inférieures à la valeur normale la plus basse. La concentration moyenne calculée 0.44 ± 0.05 µg/ml montre alors une baisse significative de l'androgène circulant P < 0.05.

Au quatorzième jour correspondant à la phase de récurrence, les valeurs de testostérone sont :

- pour 2 animaux, comprises dans l'intervalle normal de référence ou au delà
- pour 4 animaux, diminuées.

Bien que la majorité des sujets infestés présente une baisse notable de la testostérone, la variation n'est cependant plus

significative ($P > 0.1$). Les réponses individuelles à l'évolution de la parasitémie pouvant expliquer ces résultats.

Au total, l'effet de l'infestation chronique par le variant AnTat 1.1 E entraîne chez la majorité des rats de 400 à 600 g, une hyposécrétion de testostérone hautement significative pendant la phase d'immunolyse du premier pic de parasitémie.

β) Dosage radioimmunologique de l'hormone lutéinisante

* La LH sérique

Les taux de LH sérique dosés chez les animaux témoins sont compris entre 20 et 60.4 ng/ml avec une valeur moyenne de 38.5 ± 6.4 ng/ml.

En fonction de l'apparition du pic de parasitémie; on note une diminution du taux moyen de LH sérique (25.2 ± 1.7 ng/ml), après 5 jours d'infestation. Cette variation n'est cependant pas significative ($P > 0.1$), la majorité des taux circulants de l'hormone gonadotrope retrouvés se situent essentiellement dans la limite inférieure normale.

Ces taux restent inchangés durant la phase trypanolytique et la phase de récurrence, où respectivement nous retrouvons des valeurs moyennes de 25.3 ± 1.9 ng/ml et de 25.1 ± 2.4 ng/ml.

Ainsi, pendant toute la durée de l'infestation chronique, une diminution de la quantité d'hormone lutéinisante sérique est notée. Elle atteint des concentrations proches des valeurs normales basses sans jamais s'effondrer. Cette diminution à elle seule, n'est donc pas suffisante pour provoquer une hypostimulation de la fonction stéroïdienne testiculaire.

Nous avons voulu vérifier la fonction hypophysaire et compléter cette étude par les dosages radioimmunologiques de l'hormone lutéinisante gonadotrope hypophysaire intra-glandulaire.

* La LH hypophysaire

Comparativement à la valeur moyenne de la gonadotrophine hypophysaire chez les animaux témoins (230.9 ± 26.8 µg/hypophyse) après 3 jours de parasitémie, la valeur moyenne pour le groupe

d'animaux infestés est abaissée à 162.2 ± 21.8 $\mu\text{g/hypophyse}$ mais de façon non significative.

A partir du cinquième jour jusqu'au huitième jour d'infestation, toutes les valeurs de LH hypophysaire sont inférieures à la moyenne des valeurs normales. Les concentrations moyennes calculées pour chacune des deux séries expérimentales sont alors respectivement de 138.67 ± 16.55 $\mu\text{g/hypophyse}$ et de 141.9 ± 20.3 $\mu\text{g/hypophyse}$. Le calcul du t-test permet de mettre en évidence dans les deux cas une diminution prononcée et significative ($P < 0.05$) de l'hormone gonadotrope hypophysaire.

Durant la phase de récurrence, on observe à nouveau des valeurs de LH hypophysaire dans l'intervalle des valeurs normales. La différence entre les deux séries expérimentales (animaux parasités - animaux témoins) n'est plus significative, la moyenne des valeurs étant respectivement de 181.3 ± 16.4 $\mu\text{g/hypophyse}$ et 230.9 ± 26.9 $\mu\text{g/hypophyse}$.

b) Conclusion

Nos conditions expérimentales de parasitémie chronique développée par T.b.brucei variant AnTat 1.1 E ont permis de mettre en évidence chez le rat de 10 mois, une diminution significative de la testostéronémie dès le huitième jour d'infestation, bien que la concentration de LH sérique avoisine les valeurs normales les plus basses. Cependant, au niveau hypophysaire, on constate que les taux de la gonadostimuline sont abaissés de façon significative dès le cinquième jour de parasitémie.

Sur un nombre plus restreint d'animaux ayant survécu à plus de 21 jours d'infestation, nous avons observé :

- pour 2 animaux : une testostéronémie normale à 1.55 et 0.57 $\mu\text{g/ml}$ avec respectivement des valeurs faibles d'hormone lutéinisante 17 et 16 ng/ml

- pour un animal, une valeur de testostérone abaissée à 0.39 $\mu\text{g/ml}$ et une concentration de LH sérique non dosable

- pour un animal, les valeurs de testostérone et de LH sérique étaient trop faibles pour être déterminées.

Ces derniers résultats tendraient à confirmer la chute de

l'hormone lutéinisante sérique au cours de l'évolution de la parasitose, celle ci étant plus importante que la baisse du taux de testostérone, et démontre également la baisse sensible de la LH hypophysaire attestant d'un déficit haut de l'axe gonadotrope.

4) Etude des paramètres endocriniens sur rats de 45 jours après infestation chronique par T.b.brucei variant AnTat 1.1 E

Nous avons accompagné chaque série d'animaux infestés par le variant AnTat 1.1 E par une série d'animaux témoins n'ayant reçu que 5 ml de tampon PSG.

Les sacrifices sont réalisés en fonction de l'évolution de la parasitémie fixés à 3, 9 et 21 jours, chaque série comprenant 6 animaux infestés et 6 animaux témoins.

Après accumulation des échantillons, les dosages de la testostérone, de l'hormone lutéinisante sérique et hypophysaire ont été effectués.

a) Résultats

Le bilan gonadique de chaque animal est résumé dans les tableaux XI et XII.

a) Dosage radioimmunologique de la testostérone

Les valeurs moyennes de testostérone dosée chez les animaux témoins au cours des 21 jours, n'ont pas montré de variation. Sur l'ensemble de ces animaux (18 rats), l'intervalle normal se situe entre 0.47 et 6.89 ng/ml avec un taux moyen de 2.11 ± 0.3 ng/ml.

Comparativement à cette testostéronémie, l'infestation chronique provoque une diminution de la testostérone au neuvième jour à 1.82 ± 0.63 ng/ml, baisse qui s'intensifie au 21^{ème} jour où la valeur moyenne retrouvée est de 1.63 ± 0.38 µg/ml.

Les variations entre les différentes séries de mesures (témoins - infestés) ne sont cependant pas significatives.

TABLEAU XI

BILAN ENDOCRINIEN DE BASE DES RATS DE 45 JOURS
INFESTES OU NON PAR UNE SOUCHE CHRONIQUE DE T.b.brucei
VARIANT AnTat 1.1 E

3ème jour

<u>Rats témoins</u>				<u>Rats infestés</u>			
<u>rats</u>	<u>TESTOS- TERONE (µg/ml)</u>	<u>LH HYPO (µg/hypophyse)</u>	<u>LH SERIQUE (ng/ml)</u>	<u>rats</u>	<u>TESTOS- TERONE (µg/ml)</u>	<u>LH HYPO (µg/hypophyse)</u>	<u>LH SERIQUE (ng/ml)</u>
A	1.1	245	40	1	0.24	165	16
B	0.87	232	37	2	4.04	93	26
C	0.71	247	23	3	5.89	181	32
D	6.89	177	23	4	1.46	61	42
E	2.91	144	70	5	1.59	229	21
F	1.68	133	29	6	1.26	83	76
MOYENNE	2.36 ± 0.96	196.3 ± 21.0	37.0 ± 7.1	MOYENNE	2.41 ± 0.86	135.3 ± 26.9	35.5 ± 8.8
				PROBA- BILITE	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.

9ème jour

<u>Rats témoins</u>				<u>Rats infestés</u>			
<u>rats</u>	<u>TESTOS- TERONE (µg/ml)</u>	<u>LH HYPO (µg/hypophyse)</u>	<u>LH SERIQUE (ng/ml)</u>	<u>rats</u>	<u>TESTOS- TERONE (µg/ml)</u>	<u>LH HYPO (µg/hypophyse)</u>	<u>LH SERIQUE (ng/ml)</u>
G	2.73	131	30	7	4.71	178	17
H	2.68	161	16	8	2.18	158	24
I	1.86	132	33	9	1.58	164	42
J	2.65	-	25	10	1.31	71	33
K	1.71	147	21	11	0.19	152	17
L	3.02	170	27	12	0.94	86	12
MOYENNE	2.44 ± 0.21	148.2 ± 7.7	25.33 ± 2.51	MOYENNE	1.82 ± 0.63	134.8 ± 18.2	24.1 ± 4.6
				PROBA- BILITE	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.

TABLEAU XII

BILAN ENDOCRINIEN DE BASE DES RATS DE 45 JOURS
 INFESTES OU NON PAR UNE SOUCHE CHRONIQUE DE T.b.brucei
 VARIANT AnTat 1.1 E
 (SUITE)

21ème jour

<u>Rats témoins</u>				<u>Rats infestés</u>			
rats	TESTOS- TERONE (µg/ml)	LH HYPO (µg/hypophyse)	LH SERIQUE (ng/ml)	rats	TESTOS- TERONE (µg/ml)	LH HYPO (µg/hypophyse)	LH SERIQUE (ng/ml)
M	0.97	277	40	13	2.82	129	30
N	0.47	163	16	14	1.69	165	14
O	2.14	110	18	15	1.1	128	0.5
P	1.96	196	24	16	2.55	147	0.5
Q	2.81	123	60	17	1.38	218	0.5
R	0.86	99	25	18	0.25	260	22
MOYENNE	1.54 ± 0.36	161.33 ± 27.43	30.5 ± 6.83	MOYENNE	1.63 ± 0.38	174.5 ± 21.8	11.2 ± 5.2
				PROBA- BILITE	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.	P<0.05 signif.

β) Dosage radioimmunologique de l'hormone lutéinisante

* LH sérique

Les valeurs d'hormone lutéinisante sérique de l'ensemble des sujets témoins se situent dans un intervalle compris entre 16 et 70 ng/ml. La moyenne sur chacune des séries ne montre pas de variation importante. Les taux sont de 37 ± 7.1 ng/ml pour le sacrifice à 3 jours et 30.5 ± 6.8 ng/ml à 21 jours.

L'analyse des dosages de la gonadostimuline sérique des animaux infestés a montré :

- durant les trois premiers jours de la parasitémie, des taux normaux: 35.5 ± 8.8 ng/ml
- après 9 jours, des valeurs se situant pour la majorité des cas (4 animaux sur 6), vers des concentrations limites normales basses. La moyenne calculée 24.1 ± 4.6 ng/ml ne montre pas de variation significative ($P > 0.1$)
- en revanche, au sacrifice correspondant au 21^{ème} jour, nous avons relevé chez 6 rats :
 - 3 cas où le taux d'hormone sérique n'a pu être quantifié (en deçà du seuil de détection estimé à 1 ng/ml)
 - 1 cas où la valeur est inférieure à l'intervalle normal de référence
 - 2 cas où les taux se situent respectivement à 22 et 30ng/ml.

De l'ensemble de ces dernières valeurs, une moyenne de 11.2 ± 5.2 ng/ml est retrouvée mettant en évidence une diminution significative ($P < 0.05$) de la quantité d'hormone lutéinisante sérique.

Ces derniers résultats montrent une diminution progressive et accentuée de l'hormone lutéinisante sérique au cours de l'évolution de la parasitémie confirmant ainsi les précédents résultats obtenus chez le rat plus âgé.

* LH hypophysaire

Les concentrations d'hormone lutéinisante chez les animaux témoins sont comprises entre 99 et 277 µg/hypophyse. Les taux

moyens calculés pour chacune des 3 séries sont respectivement de 196.3 ± 21.0 $\mu\text{g/hypophyse}$ au troisième jour, de 148.2 ± 7.7 $\mu\text{g/hypophyse}$ au neuvième jour et de 161.3 ± 27.4 $\mu\text{g/hypophyse}$ au vingt et unième jour.

Ces valeurs comparées aux taux de la gonadostimuline hypophysaire des animaux infestés n'ont pas montré de variation significative. Les valeurs moyennes correspondant à chaque stade du développement parasitaire sont respectivement de 135.3 ± 26.9 $\mu\text{g/hypophyse}$; 134.8 ± 18.2 $\mu\text{g/hypophyse}$ et 174.5 ± 21.8 $\mu\text{g/hypophyse}$.

b) Conclusion

Au total, l'infestation chronique par T.b.brucei chez le jeune rat provoque principalement une diminution progressive de la testostéronémie ainsi que celle de l'hormone lutéinisante sérique sans variation notable de la concentration de la gonadostimuline antéhypophysaire intra-glandulaire.

5) Conclusions des bilans gonadiques sur modèle rat après infestation chronique par T.b.brucei variant AnTat 1.1 E

Le bilan endocrinien gonadique de base mené sur 2 séries d'animaux (rats âgés de 45 jours et rats âgés de 10 mois) révèlent un déséquilibre de la fonction gonadotrope d'intensité et de qualité différentes selon le modèle expérimental.

En effet, si le déficit de l'hormone lutéinisante circulante intervient dès le 21^{ème} jour dans les deux cas; on constate que chez le rat de 10 mois, l'hypogonadisme s'installe au 21^{ème} jour d'infestation, alors que ce délai n'est pas suffisant pour observer chez le jeune rat un hypofonctionnement de la glande testiculaire. Il est probable dans ce cas que la baisse de la testotéronémie s'effectue mais retardée dans le temps.

Les modifications physiopathologiques rapportées par IKEDE et LOSOS 1972 (60) et ISOUN et ANOSA 1974 (63), mettant en évidence une dégénérescence testiculaire chez des moutons et des boucs infestés expérimentalement par une souche chronique à T.b.brucei, pourrait être le reflet de l'hypostimulation prolongée de l'organe testiculaire résultant de la baisse accentuée et prolongée de la

gonadostimuline hypophysaire circulante, baisse que nous avons caractérisée.

C) DISCUSSION SUR L'HYPOGONADISME EXPERIMENTAL DU RAT SELON LE TYPE D'INFESTATION (AIGUE/CHRONIQUE) ET L'AGE DE L'ANIMAL (45 JOURS/10 MOIS)

Pour tenter d'expliquer les mécanismes conduisant à l'hypofonctionnement gonadique, nous avons regroupé et résumé l'essentiel des résultats concernant les taux de testostérone, de LH sérique et hypophysaire obtenus après infestation aigüe et chronique à T.b.brucei dans les deux groupes d'animaux sous forme d'histogrammes (respectivement dans les figures 17 et 18).

Chez le rat agé de 10 mois, le taux moyen d'hormone lutéinisante sérique reste constant alors que la testostéronémie diminue de façon sensiblement identique et franche lors d'une infestation aigüe ou durant la première vague d'une infestation chronique .

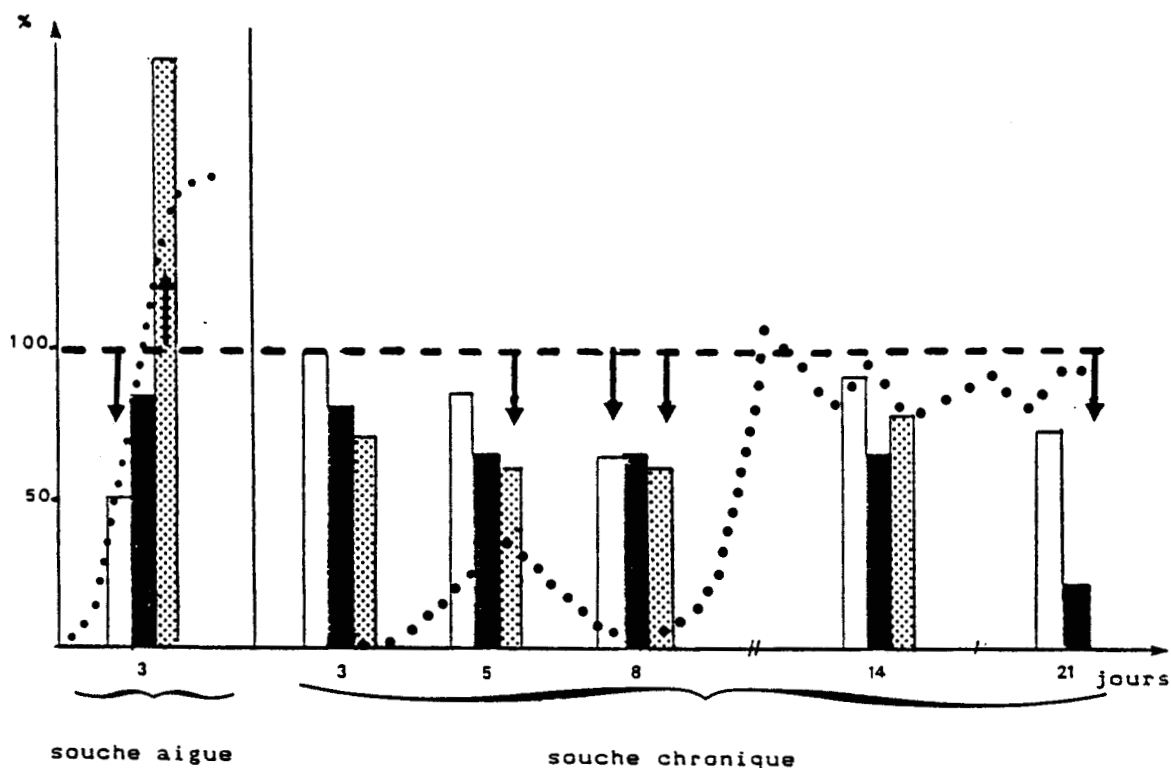
Une compétition entre la LH et une autre entité moléculaire d'origine parasitaire au niveau des récepteurs testiculaires de la stimuline pourrait-elle expliquer cette diminution de la stéroïdogénèse ?

L'intensité de la chute de la testostéronémie, effondrée en cas d'évolution aigüe, plus nuancée en cas d'évolution chronique serait alors en proportion de la parasitémie circulante.

Dans le cas de l'infestation chronique au delà du 1^{er} pic de parasitémie, l'accentuation de la baisse de testostérone est à rapprocher de la diminution importante de l'hormone lutéinisante circulante (21^{ème} jour), cet effondrement du taux de stimuline étant semble-t-il rythmé par les vagues successives de trypanolyse.

Chez le rat jeune, les mêmes hypothèses peuvent être retenues bien que l'évolution des paramètres, et en particulier le taux de testostérone, soit moins significatif dans ces variations. On note toutefois que l'effet majeur de l'infestation aigüe ou chronique entraîne un effondrement significatif de l'hormone lutéinisante sérique.

COMPARAISON D'UNE SOUCHE AIGUE ET CHRONIQUE CHEZ
LE RAT DE 10 MOIS
(EFFET SUR LA TESTOSTERONE ,LA LH SERIQUE ET HYPOPHYSAIRE)



Résultats exprimés en pourcentage (%) par rapport aux valeurs témoins.

* : Les variations significatives statistiquement sont soulignées d'une flèche

□ : TESTOSTERONE

■ : LH SERIQUE

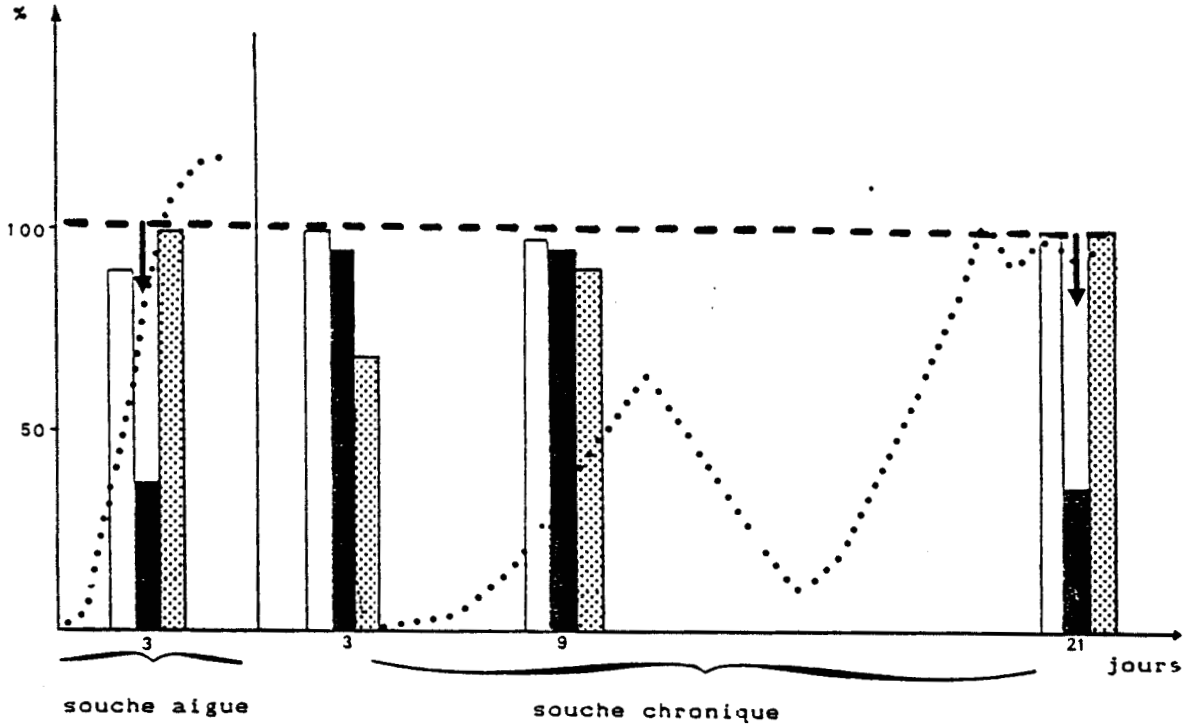
▨ : LH HYPOPHYSAIRE

..... Evolution de la parasitémie

FIGURE 17

COMPARAISON D'UNE SOUCHE AIGUE ET CHRONIQUE CHEZ
LE RAT DE 45 JOURS

(EFFET SUR LA TESTOSTERONE , LA LH SERIQUE ET HYPOPHYSAIRE)



Résultats exprimés en pourcentage (%) par rapport aux valeurs témoins.

- * : Les variations significatives statistiquement sont soulignées d'une flèche
- : TESTOSTERONE
- : LH SERIQUE
- ▨ : LH HYPOPHYSAIRE
- Evolution de la parasitémie

FIGURE 18

De ces observations et pour rechercher la responsabilité de constituants parasitaires dans le déséquilibre endocrinien du rat, nous avons recherché les effets gonadotropes ou antigonadotropes de matériel parasitaire injecté directement sur rats de 10 mois "plus sensibles" et "plus caractéristiques" dans leur évolution hypogonadique.

III) ETUDE DES DESEQUILIBRES ENDOCRINIENS CHEZ LE RAT APRES INJECTION DE MATERIEL PARASITAIRE

La relation entre l'antigène variable, élément constitutif principal du manteau de surface du parasite et les mécanismes de défense de celui-ci au regard de son hôte a provoqué de nombreux travaux dont la finalité était essentiellement de comprendre le phénomène de variation antigénique, le contrarier et ainsi rendre plus efficace les réponses immunitaires de l'hôte infesté.

L'étude du manteau, au niveau de son organisation, de la caractérisation de ses constituants, au delà de l'antigène variable, est toujours d'un grand intérêt puisque ce manteau représente l'interface fonctionnel entre le parasite et son hôte.

Avant d'utiliser le manteau et ses constituants dans le but de décrire leur responsabilité éventuelle dans les déséquilibres gonadiques, nous rappellerons l'essentiel des données acquises et notre contribution en ce domaine.

A) ASPECT BIOCHIMIQUE ET BIOSYNTHESE DES ANTIGENES VARIABLES

1) Aspect biochimique

a) Introduction

Le manteau de surface d'une épaisseur de 12 à 15 microns recouvre toute la surface du parasite. Il est constitué pour l'essentiel d'un assemblage d'environ 10^7 molécules, de nature glycoprotéique, toutes identiques et correspondant à l'antigène variable (CROSS 1975 (28); VICKERMAN 1984 (136)).

Expérimentalement, il a été possible de stabiliser des populations de formes sanguicoles de T.b.brucei antigéniquement

homogènes par passage sur rats et souris. L'inoculation expérimentale de tels clones permet d'obtenir des parasitémies de l'ordre de 10^9 cellules /ml de sang et de préparer des quantités telles de parasites qu'elles puissent autoriser des études biochimiques de leurs constituants membranaires de surface.

Plusieurs conditions de libération des antigènes variables ont été mises au point. Ces différents procédés livrent des formes antigéniques dont les différences s'expriment essentiellement dans leur définition de zone d'ancrage membranaire. Dès lors, est apparue la notion de forme dite "soluble" qui correspond à la forme spontanément libérée par le parasite dans le sang in vivo ou de forme dite "membranaire" d'antigène variable, plus complète possédant encore son système d'ancrage membranaire.

Parmi les conditions multiples de libération du manteau et donc de l'antigène variable, nous ne citerons que quelques unes ayant fait l'objet de travaux au laboratoire et ayant servi à ce travail de thèse.

b) Isolement et purification de la glycoprotéine de surface

α) Isolement des parasites

A partir du sang de rats parasités, l'isolement des trypanosomes s'effectue selon la méthode de LANHAM et GODFREY 1970 (83), par chromatographie d'échange ionique. La différence de charge en surface membranaire entre les parasites, les hématies et les éléments figurés du sang, permet la "purification" des parasites sur colonne de DEAE-cellulose en tampon phosphate (PSG) pH 8.0. L'éluat contenant les protéines sériques et les parasites est alors centrifugé à faible vitesse (1630g, 20minutes). Le culot parasitaire est soumis à plusieurs lavages en tampon PSG pour éliminer les protéines sériques du rat.

β) Libération du manteau de surface

* libération de la forme soluble

La libération de la forme soluble (sVSG) de l'antigène

variable peut s'effectuer :

- par rupture cellulaire (CROSS 1975 (28); ROVIS et coll. 1978 (119); STRICKLER et coll. 1978 (130); ONODERA et coll. 1981 (108)). Parmi les différentes techniques de libération proposées, nous retiendrons plus particulièrement la méthode préconisée par CROSS 1984 (27), correspondant à une rupture cellulaire par choc osmotique en tampon phosphate salin (PBS) de pH 8.0 enrichi en 0.1 mM N.p.tosylchlorométhyl cétone (TLCK) qui évite la dégradation protéolytique du matériel libéré à 37°C

- sans rupture cellulaire par utilisation de tampon acide isoosmotique pH 5.5 (BALTZ et coll. 1976 (6)). Cette technique consiste à mettre la population trypanosomale en suspension en tampon phosphate 0.125 M pH 5.5 contenant 1% de glucose, et enrichi en antiprotéases 0.2 mM (TLCK, N-éthylmaleimide (NEM), phénylméthyl sulfonylfluorure (PMSF)), une nuit à 4°C. La libération de l'antigène sous forme soluble s'effectue spontanément. La préparation antigénique est obtenue, après centrifugation à 3000g durant 15 minutes, dans le surnageant. Les parasites sont retrouvés dans le culot. L'intégrité cellulaire des parasites dépourvus de leur manteau de surface est respectée.

Dans ce mémoire, nous désignerons sous la terminologie de "surnageant pH 5.5 " et "culot pH 5.5", le résultat du protocole ici décrit.

* Libération de la forme membranaire

Les protocoles de libération de la forme membranaire peuvent être classés en 2 groupes principaux selon leur mode d'action :

- traitement des cellules par des détergents non ioniques ou ioniques qui destabilisent la membrane plasmique : Triton X100 (CARDOSO DE ALMEIDA et coll. 1983 (16), déoxycholate de sodium (FERGUSON et coll. 1984 (34)), n₈-octylglucopyranoside (GURNETT et coll. 1986 (51)), zwittergents (GRAB et coll. 1984 (46)).

- traitement acide qui précipite en une seule étape les protéines de surface :

acide trichloroacétique (JACKSON et coll. 1985 (64)), acide trifluoroacétique (CLARKE et coll. 1985 (20)).

Parmi ces différentes techniques, nous avons retenu

l'extraction par détergents (SDS 2%) (CARDOSO DE ALMEIDA et coll. 1983 (16), FERGUSON et coll. 1984 (34)), et l'extraction par l'acide trifluoroacétique.

Selon le protocole de libération adopté, l'antigène sera obtenu encore muni de son ancrage membranaire complet (mf VSG) ou amputé (s VSG). Par des approches différentes, la caractérisation des éléments structuraux constituant la molécule antigénique a été réalisée.

L'antigène se compose d'une séquence peptidique de 450 à 500 amino acides selon le variant étudié défini en deux domaines :

- une région N-terminale de séquence peptidique très variable d'un variant à l'autre, contenant 4 résidus de cystéine associés en 2 ponts disulfure intramoléculaires

- une région C-terminale, très polaire, très structurée d'homologie de séquence hautement conservée entre antigène variable de sérotype différent (MATTHYSENS et coll. 1981 (94)), possédant 8 résidus de cystéine associés en 2 groupes de deux ponts disulfure.

L'extrémité C-terminale de la protéine est substituée par un ensemble glycolipide complexe dont le rôle essentiel est l'ancrage dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique parasitaire.

La structure complète de la forme membranaire du variant MITat 1.4 a été proposée par FERGUSON 1988 (38) (figure 19). Cette schématisation de la structure C-terminale de la forme complète de l'antigène a pu être généralisée à d'autres variants (SCHMITZ et coll. 1987 (127)); en faisant apparaître toutefois une microhétérogénéité dans les branchements des résidus de mannose constituant le glycanne C-terminal.

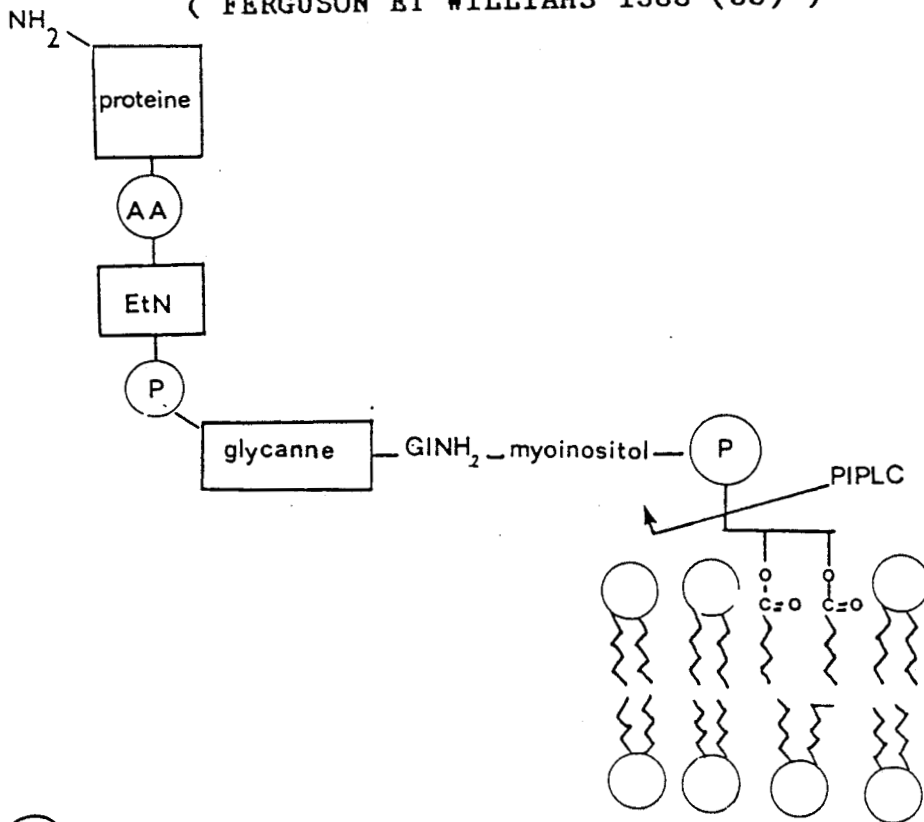
La forme soluble de l'antigène est libérée du manteau de surface par l'intervention d'une enzyme endogène de type phospholipase C qui clive la liaison 1,2 diacylglycérol-phosphate.

c) Organisation des antigènes variables

Nous nous sommes intéressés à l'organisation de l'antigène variable de surface à partir de deux variants AnTat 1.1 et AnTat 1.8. Ce travail a fait l'objet d'une publication : "Evidence of



SCHEMATISATION DE LA STRUCTURE
C-TERMINALE DE L'ANTIGENE VARIABLE
(FERGUSON ET WILLIAMS 1988 (35))



ⓐ Amino acide C terminal : - Acide Aspartique
- Sérrique
- Asparagine (VSG118)

EtN: Ethanolamine

hétérogénéité glycanique en fonction du variant

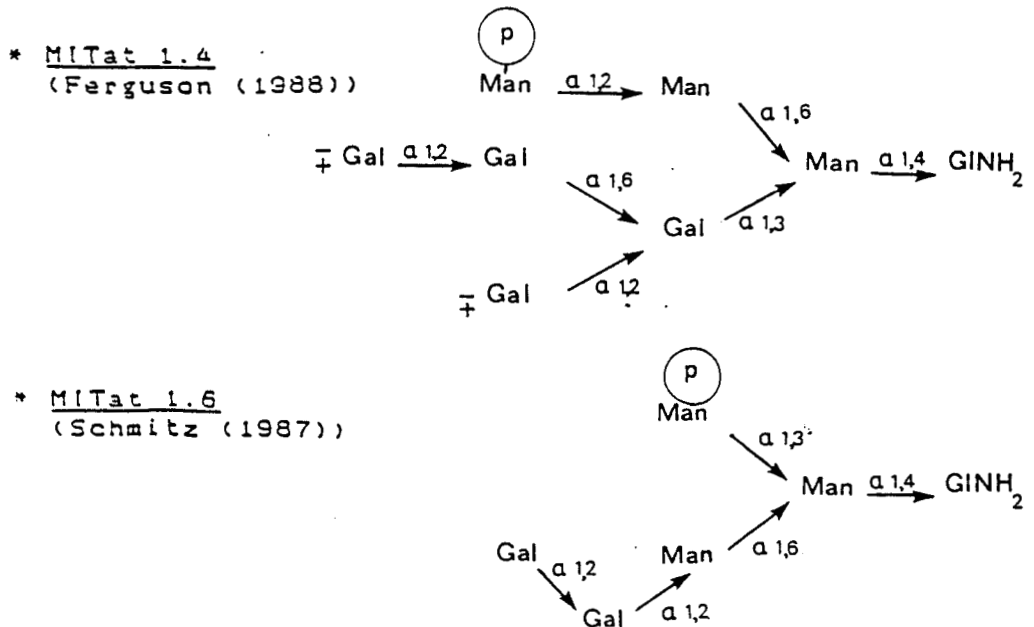


FIGURE 19

myristylated disulfide-linked dimer of variant surface glycoprotein of Trypanosoma brucei brucei" publiée dans Comparative Biochemistry and Physiology 1988 que nous avons inséré dans le mémoire.

Les résultats ont permis de mettre en évidence l'existence de formes membranaires identifiées après incorporation d'acide myristique (9,10 ³H), par électrophorèse et révélation par fluorographie et immunoblotting, sous une forme dimère sensible au β -mercaptoéthanol. L'agent réducteur scinde en effet la molécule antigénique native de taille moléculaire apparente 110000 daltons et livre la forme monomérique de 60000 daltons.

La présence de tunicamycine, antibiotique bloquant la synthèse et l'attachement des N-glycannes, additionnée au milieu de survie des trypanosomes ne modifie pas le transport de l'antigène variable radioactif à la surface du parasite. L'absence de N-glycanne entraîne une diminution sensible de la taille moléculaire de l'antigène membranaire mais n'empêche pas sa dimérisation.

Ces expériences nous ont permis de conclure à un agencement dimérique faisant intervenir vraisemblablement un pont disulfure présent dans les deux formes antigéniques (forme soluble et forme membranaire).

Ainsi, il semble que selon les variants étudiés, le processus de dimérisation, par interaction hydrophobe (AUFFRET et TURNER 1981 (5), GURNETT et coll. 1986 (51), STRICKLER et PATTON 1982 (131), FREYMAN et coll. 1984 (41)) ou liaison covalente par pont disulfure inter-antigène, soit un phénomène biologique important pour le trypanosome dans l'organisation de son manteau de surface.

On retiendra toutefois, et c'était le but de ce travail, que le dimère d'antigène variable est très certainement une réalité en surface parasitaire et y représente l'élément fonctionnel majeur du manteau.

Cependant, le lieu où ces mécanismes prennent place reste encore inconnu.

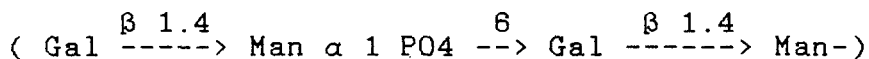
2) Biosynthèse des antigènes variables de surface

La synthèse du VSG débute par une séquence amino-terminale "signal" qui dirige le polypeptide naissant à la surface du réticulum endoplasmique (MAC CONNEL et coll. 1981 (96); BOOTHROYD et coll. 1981 (13)).

La protéine néosynthétisée reste provisoirement ancrée à la membrane du réticulum par la séquence aminoacide C-terminale. La structure particulière formée par l'association complexe éthanolamine glycosyl phosphatidyl inositol est transférée "en bloc" en moins d'une minute après l'achèvement du polypeptide. (BANGS et coll. 1985 (7); FERGUSON et coll. 1988 (35))(figure 20)

L'incorporation de différents précurseurs radioactifs (^{32}P , acide palmitique ^3H , acide oléique ^3H , acide myristique ^3H , galactose ^3H) permettait une approche structurale des précurseurs métaboliques de l'ancrage membranaire. Cette étude a fait l'objet d'une publication que nous insérons également dans ce mémoire: "Presence of lipophosphoglycan in two variant of trypanosoma brucei brucei", Biochemical Biophysical Research Communication (1988).

Dans notre étude, nous montrons un lipophosphoglycane similaire au glycolipide C décrit par KRAKOW et coll. 1986 (78), MENON et coll. 1988 (99) possédant des caractéristiques chromatographiques et électrophorétiques très semblables à celles d'une structure récemment décrite par TURCO et coll. 1987 (133) sur l'espèce Leishmania donovani. En effet, les auteurs ont mis en évidence l'existence d'un lipophosphoglycane (LPG) en situation membranaire localisée au voisinage d'une protéine complexe de définition proche de celle de l'antigène variable de trypanosome. Ce LPG est ancré dans la membrane plasmique parasitaire par l'intermédiaire d'un lysophosphatidylinositol substitué vraisemblablement par un acide gras saturé à longue chaîne (C24-C26), sa partie osidique est constituée d'unité de répétition phosphoryl galactosyl β mannose :

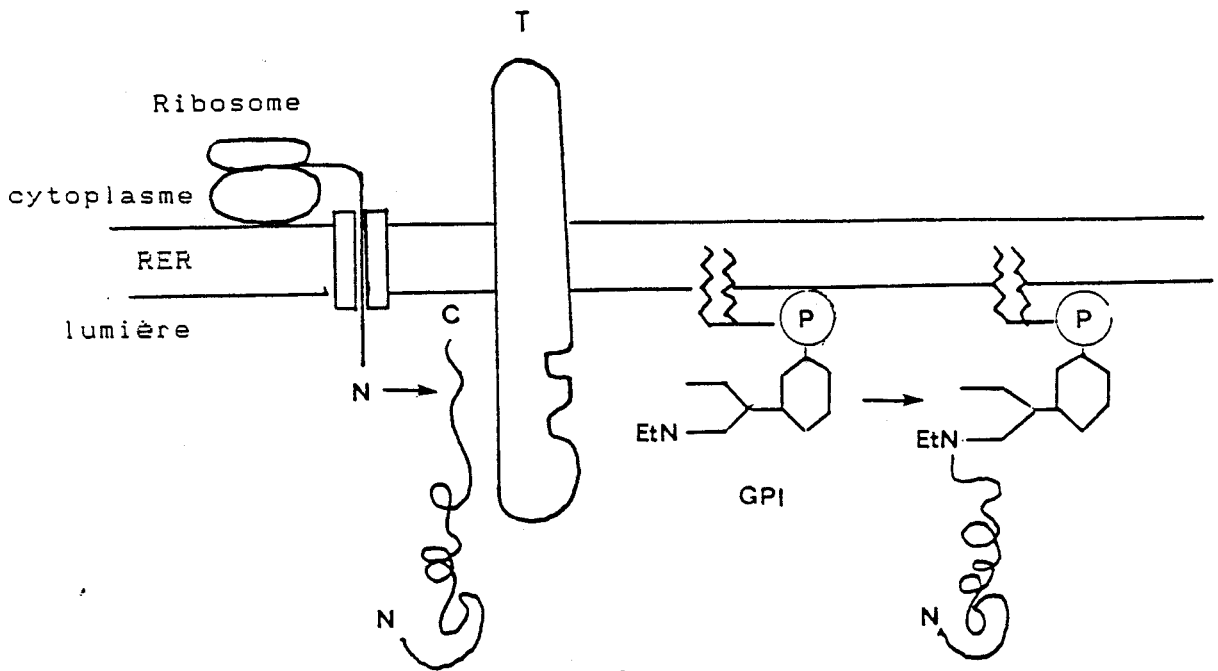


et d'un heptasaccharide non encore parfaitement caractérisé.

Au total, nos résultats et ceux de la littérature seraient en faveur d'une molécule glycophospholipidique commune aux Trypanosomatidae, dont le rôle interviendrait dans l'organisation des protéines antigéniques du manteau de surface des parasites.

Nous n'avons pu obtenir suffisamment de ce matériel original pour le tester sur rat et en observer les effets sur la stéroïdogénèse testiculaire. Ce projet demeure un objectif du laboratoire. On ne peut savoir en effet, si ce composant reste libre en surface parasitaire ou s'il est lié de façon covalente dans le cas de T.b.brucei.

SCHEMATISATION DE LA BIOSYNTHESE ET DE
LA MATURATION DU VSG
(FERGUSON 1988 (36))



Mécanismes d'action hypothétiques de la "VSG-transférase"(complexe T)
- complexe possédant à la fois un site d'action
protéasique et un site d'activité transférase
ou - enzyme de type transpeptidase

FIGURE 20

3) Libération des antigènes variables et protéases parasitaires

Arrivé en surface, l'antigène variable peut être libéré du manteau de surface par l'intermédiaire de la phospholipase C endogène. Le clivage de l'ancrage membranaire s'accompagne d'une production de diacylglycérol biologiquement actif dans la membrane (FERGUSON 1987 (37)). Le devenir de l'antigène variable de surface libéré dans le torrent circulatoire de l'hôte reste encore inconnu.

La formation d'immuncomplexe a été mise en évidence par LAMBERT et coll. 1977 (82), lors d'une infestation chronique dès le quatrième jour de parasitémie, avec un pic de concentration maximum entre le huitième et le douzième jour de l'infection. Ensuite, les antigènes parasitaires solubles sont en quantité circulante telle que non détectable. Récemment, l'intervention de la glycoprotéine de surface dans les mécanismes de régulation cellulaire de l'hôte infesté a été envisagée. ROMERO et coll. 1988 (118) et LOW 1989 (90) suggèrent que, par reconnaissance de certains récepteurs membranaires, l'antigène soluble pourrait jouer le rôle d'agent endocrine, paracrine ou encore autocrine modifiant ainsi les fonctions physiologiques natives de nombreuses cellules.

Cependant, outre l'antigène variable de surface, d'autres protéines sont sécrétées par le parasite dans le flux sanguin. Certaines d'entre elles sont reconnues pour posséder des activités enzymatiques et être à l'origine de réponse de type: inflammatoires (BOREHAM 1979 (14)), immunitaires (MORRISSON et coll. 1985 (102)) et tissulaires (BOID et coll. 1980 (11)).

Nous rappèlerons brièvement certaines données bibliographiques.

KNOWLES et coll. 1987 (76) 1989 (75), ont identifié dans le flux de l'animal infesté par une population pléomorphe de T.b. brucei une activité enzymatique parasitaire caractérisée par une taille moléculaire de 40000 daltons et spécifique des substrats dipeptidiques (Leu-Ala, Val-Leu, Pro-Leu) et tripeptidique (Tyr-Tyr-Tyr, Leu-Gly-Gly).

Les prélèvements sanguins issus d'animaux traités après 21 jours d'infestation par un agent trypanocide, le berinil, qui entraîne la disparition totale de la population infestante, contenait

durant plusieurs jours et à un taux très significatif, l'activité peptidasique.

LONSDALE-ECCLES et coll. 1986 (88), ont identifié une enzyme de type sérine alcaline protéase dont l'activité biologique est insensible aux antiprotéases naturelles de type trypsine et partiellement sensible à l' α_2 macroglobuline.

Ces résultats tendraient à confirmer l'hypothèse d'une accumulation d'enzymes parasitaires, libérés dans le sang et dont les taux circulants pourraient excéder les possibilités des inhibiteurs protéolytiques naturels présents chez l'hôte. Ces enzymes pourraient donc contribuer aux manifestations liées à la parasitémie.

Ajoutons que les protéases parasitaires intracellulaires peuvent également être libérées notamment lors des crises trypanolytiques en réponse à la réaction immunitaire de l'hôte ou encore lors de traitements par des agents trypanocides.

Récemment, LONSDALE-ECCLES et coll. 1986 (88) ont identifié dans les organites intracellulaires de type lysosomiaux de T.b.brucei variant MITat 1.2, une protéase de 27000 daltons, d'activité enzymatique optimum pH 5-6 et nécessitant de faibles concentrations d'agent réducteur tels que le β -mercaptoéthanol ou le dithiothréitol (DTT) pour être activée.

Expérimentalement, les études d'inhibition par les aminoacidechlorométhanes, l'iodoacétamide et le p-chloromercurobenzoate ont permis de définir une activité thiolprotéasique dont les propriétés catalytiques sont proches de la cathepsine lysosomale de type L de mammifères.

PAMER et coll. 1989 (109) confirmant ces résultats, ont retrouvé cette activité thiolprotéasique à chaque stade du cycle évolutif du parasite (forme stumpy, forme slender et forme procyclique). Par dosage enzymatique selon la méthode décrite par KEENE et coll. 1986 (70), l'activité protéolytique a été détectée dans le sang de souris infestée par un stock pléomorphe Gutat 3.1 dès le troisième jour suivant l'inoculation. Un résultat similaire a également été constaté pour une autre souche pléomorphe WRAtat 1.1.

Ainsi, ces travaux, s'ils commencent à cerner les facteurs

enzymatiques parasites, ne donnent pas encore de réponses précises sur les retentissements physiopathologiques éventuels.

Il était intéressant à ce stade, d'entreprendre l'étude des déséquilibres endocriniens par injection in vivo de matériel parasite.

B) DESEQUILIBRES ENDOCRINIENS CONSTATES APRES INJECTION DE MATERIEL TRYPANOSOMAL

Parmi les techniques de libération du manteau de surface, nous avons retenu le protocole décrit par BALTZ et coll. (1976)(6), qui permet d'obtenir l'antigène variable de façon spontanée c'est à dire sous "forme soluble" telle qu'elle est libérée par le trypanosome dans le torrent circulatoire de l'hôte.

En fonction de notre expérience et du constat de protéolyses possibles, nous avons systématiquement ajouté des antiprotéases aux différentes étapes de notre protocole de préparation. Nous avons renouvelé le même préparatif sans antiprotéases. Les différentes fractions ont ensuite été utilisées pour les tests à visée gonadotrope.

1) Etude des dysfonctions endocriniennes provoquées par l'injection d'un matériel parasite obtenu en présence d'antiprotéases

a) Préparation du matériel biologique

Toute la préparation du matériel biologique a été effectuée en présence d'inhibiteurs protéasiques à la concentration finale de 0.2 mM depuis l'isolement des parasites des éléments figurés du sang infesté (chromatographie d'échange ionique), jusqu'à la libération du manteau de surface par choc isoosmotique des parasites en tampon phosphate pH 5.5.

L'extrait antigénique (surnageant pH 5.5) et le culot parasite résiduel (culot pH 5.5) proviennent de l'infestation de 48 rats mâles âgés de plus de 10 mois.

Cette préparation a été injectée par voie intrapéritonéale à des

rats de même âge et de même poids :

- sur une première série d'animaux (n=12), nous avons injecté à chacun, 5ml du surnageant antigénique (surnageant pH 5.5). Ce volume correspond à la quantité d'extrait libéré d'une préparation parasitaire provenant de 4 rats.

6 animaux ont été sacrifiés une heure après l'injection et 6 rats sacrifiés 5 heures plus tard.

- à une seconde série d'animaux (n=12), nous avons injecté à chacun 5ml du culot parasitaire résiduel préalablement repris par un tampon PBS pH 7.2. Cette quantité correspond également à 4 fois la parasitémie aiguë d'un rat.

Le sacrifice des animaux s'est effectué selon la même répartition, c'est à dire 6 animaux tués une heure après l'injection du culot parasitaire et 6 animaux 5 heures plus tard.

Les séries contrôles sont constituées d'une part de 6 rats auxquels sont injectés 5ml d'un tampon phosphate pH 5.5 enrichi en antiprotéases et de 6 rats auxquels sont injectés 5ml de tampon phosphate PBS pH 7.2. Le sacrifice de ces animaux s'est effectué 5 heures après l'injection. Sur chacun des animaux nous avons déterminé par dosage radioimmunologique les taux d'oestradiol, de testostérone, d'hormone lutéinisante et d'hormone folliculostimulante sériques et hypophysaires.

Dans un premier temps nous discuterons de l'effet du culot parasitaire puis du surnageant antigénique.

b) Effet d'un culot parasitaire : culot pH 5.5

Le tableau XIII regroupe l'ensemble des résultats des dosages radioimmunologiques des différents paramètres sériques et hypophysaires. L'effet du culot parasitaire est discuté en fonction des valeurs obtenues chez les animaux témoins inoculés avec le tampon PBS.

a) Dosage des hormones stéroïdes sexuelles

L'intervalle de référence établi à partir des animaux témoins est évalué :

- pour l'oestradiol entre 10.5 et 16 ng/ml avec une valeur moyenne de 13.33 ± 0.92 ng/ml

TABLEAU XIII

TAUX DES HORMONAUX DES RATS SAINS ET DES RATS INOCULES
AVEC LE CULOT PARASITAIRE PREPARE EN PRESENCE
D'ANTIPROTEASES

: Rats témoins inoculés avec le tampon PBS:

rats	TESTOS- TERONE ($\mu\text{g/ml}$)	OESTRA- DIOL (ng/ml)	FSH SERIQUE (ng/ml)	FSH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH SERIQUE (ng/ml)
A	1.62	16	538	63.8	240.6	64
B	1.36	13	374.2	42.2	136.6	18.9
C	0.24	16	814.9	107.2	316.8	
D	0.61	13	531	95.8	219.2	8.9
E	4.1	10.5	500	89.2	235.5	15.7
F	0.84	11.5	739	66.6	234.2	21.1
MOYENNE	1.46 ± 0.56	13.33 ± 0.92	582.8 ± 66.0	77.4 ± 9.8	230.4 ± 23.4	25.7 ± 9.7

: Rats inoculés avec le culot parasitaire sacrifiés après 1 heure:

Rats	TESTOS- TERONE ($\mu\text{g/ml}$)	OESTRA- DIOL (ng/ml)	FSH SERIQUE (ng/ml)	FSH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH SERIQUE (ng/ml)
1	0.96	12	514.3	119	208.4	-
2	1.27	10	-	62	184.7	8.0
3	0.43	13	289.2	23.8	275.4	15.6
4	1.46	11	295.5	50.2	304.9	21.8
5	0.51	12.5	446.4	101	282.1	17.8
6	2.04	12	767	88.2	-	22.9
MOYENNE	1.11 ± 0.24	11.75 ± 0.44	462.4 ± 87.6	74.0 ± 14.3	261.1 ± 34.8	17.2 ± 2.6
proba- bilité	P>0.6 non signif.	P>0.1 non signif.	P>0.2 non signif.	P>0.6 non signif.	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.

: Rats inoculés avec le culot parasitaire sacrifiés après 5 heures:

Rats	TESTOS- TERONE ($\mu\text{g/ml}$)	OESTRA- DIOL (ng/ml)	FSH SERIQUE (ng/ml)	FSH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH SERIQUE (ng/ml)
7	0.53	12	274.7	26	129	32.1
8	0.47	9.5	288.4	14.4	108.6	12.4
9	0.31	12	297.1	48.4	176.3	26
10	0.95	12	396.1	65.9	147.2	27.2
11	0.39	10	484.2	24.8	89.395	19.2
12	0.25	12	322.1	45.8	167.9	8.9
MOYENNE	0.48 ± 0.10	11.25 ± 0.48	343.7 ± 33.1	37.5 ± 7.8	136.4 ± 13.8	20.9 ± 3.6
PROBA- BILITE	P>0.1 non signif.	0.1>P>0.05 non signif.	P<0.05 signif.	P<0.05 signif.	P<0.05 signif.	P>0.1 non signif.

- pour la testostérone entre 0.24 et 4.1 $\mu\text{g/ml}$ soit une valeur moyenne de $1.46 \pm 0.56 \mu\text{g/ml}$.

L'effet du culot parasitaire *in vivo* n'entraîne pas de profonds bouleversements de la sécrétion oestrogénique. Les taux sériques moyens calculés: $11.75 \pm 0.44 \text{ ng/ml}$ après une heure de test et $11.25 \pm 0.48 \text{ ng/ml}$ après 5 heures ne présentent pas de variation significative comparée à la valeur moyenne d'oestradiol des animaux témoins ($P > 0.1$).

Pour la testostéronémie, les taux diminuent passant de $1.11 \pm 0.24 \mu\text{g/ml}$ après une heure à $0.48 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$ après 5 heures. On remarquera pour cette dernière série expérimentale des concentrations individuelles toutes inférieures à $1 \mu\text{g/ml}$. Par le calcul du t-test ce dernier résultat n'est cependant pas significatif ($0.1 > P > 0.05$), les variations individuelles des témoins conduisant à une dispersion des résultats.

Il semble que l'action du culot parasitaire *in vivo* durant 5 heures soit insuffisant pour provoquer une hypoandrogénie.

β) Dosage radioimmunologique des gonadostimulines

* dosage des gonadostimulines sériques

- LH sérique

Les dosages radioimmunologiques de l'hormone lutéinisante circulante chez les animaux témoins montrent une dispersion importante des résultats. Les valeurs sont comprises entre 8.9 et 64 ng/ml . Le taux moyen calculé pour ce groupe d'animaux s'élève à $25.7 \pm 9.7 \text{ ng/ml}$.

La dispersion des valeurs de LH sérique est tout aussi importante après inoculation du culot parasitaire (valeurs passant de 8.0 à 32.1 ng/ml). On retrouve une valeur moyenne de $17.2 \pm 2.6 \text{ ng/ml}$ après une heure d'inoculation. Comparé à la série témoin, ce taux est sensiblement diminué mais de façon non significative ($P > 0.1$).

Après 5 heures, la concentration moyenne de LH calculée à $20.9 \pm 3.6 \text{ ng/ml}$ est proche du taux moyen normal, il est possible qu'un nouvel équilibre se soit établi entre la sécrétion hypophysaire et

une dégradation sérique durant les deux heures séparant ces deux expériences.

- FSH sérique

Les valeurs normales de FSH dosées chez les animaux témoins varient de 374.2 ng à 814.9 ng/ml pour un taux moyen calculé à 582.8 ± 66 ng/ml.

Une heure après l'injection du culot parasitaire, les valeurs de FSH se situent :

- pour 3 cas, dans l'intervalle normal de référence
- pour 2 cas, inférieures à la valeur normale la plus basse.

Le taux moyen est de 462.4 ± 87.6 ng/ml. Comparée à la moyenne des animaux témoin, cette sensible diminution n'est toutefois pas significative ($P > 0.1$).

En ce qui concerne la série expérimentale sacrifiée 5 heures plus tard, les taux de FSH sont :

- pour 3 cas, dans la limite inférieure des valeurs normales
- pour 3 cas, fortement diminués.

Pour ce groupe d'animaux, le taux moyen calculé à 343.7 ± 33.1 ng/ml fait apparaître une diminution hautement significative.

L'effet en 5 heures du culot parasitaire sur les gonadostimulines circulantes provoque donc une diminution accentuée des taux de FSH alors que les concentrations de LH sont semble-t-il moins altérées.

* Dosage des gonadostimulines hypophysaires

Les taux moyens normaux des gonadostimulines hypophysaires sont respectivement de 230.4 ± 23.4 µg/hypophyse pour la LH et de 77.4 ± 9.8 µg/hypophyse pour la FSH.

L'action du culot parasitaire durant une heure n'entraîne pas de profonds bouleversements de la synthèse des gonadostimulines.

Toutes les valeurs de LH hypophysaire sont comprises dans l'intervalle normal de référence. Pour la FSH, à l'exception d'un rat présentant une concentration faible à 23.8 µg/hypophyse,

toutes les valeurs retrouvées sont normales.

De façon non significative, il semble que les taux de LH soient sensiblement augmentés (moyenne = 261.1 ± 34.8 $\mu\text{g/hypophyse}$) alors que ceux de FSH sont diminués (moyenne = 74.0 ± 14.3 $\mu\text{g/hypophyse}$).

Par contre, après 5 heures, la moitié de la population testée (3 cas sur 6) présente un effondrement des taux de LH et de FSH, en ce qui concerne les 3 animaux restants, ces valeurs se situent dans la limite inférieure de la normale.

Les taux moyens de chaque gonadostimuline sont respectivement de 136.4 ± 13.8 $\mu\text{g/hypophyse}$ pour la LH et de 37.5 ± 7.8 $\mu\text{g/hypophyse}$ pour la FSH.

Dans les 2 cas, la diminution des taux des 2 gonadostimulines est significative ($P \leq 0.05$).

Au total, l'action du culot parasitaire préparé en présence d'antiprotéases provoque chez le rat âgé de 10 mois un déséquilibre hormonal qui se manifeste 5 heures après l'injection. Les principales modifications endocriniennes sont caractérisées par une diminution des deux gonadostimulines hypophysaires (LH et FSH). Les retentissements au niveau sérique sont variables; en effet, on constate que les taux de LH sérique restent inchangés et ceux de FSH sont fortement diminués. C'est probablement de ce déficit en gonadostimulines actives que l'amorce de l'hyposécrétion d'oestradiol et de testostérone est observée.

c) Effet d'un surnageant antigénique (surnageant pH 5.5)

Les bilans gonadiques (oestradiol, testostérone, LH, FSH circulantes; LH, FSH hypophysaires) de 2 séries d'animaux sacrifiés une heure et 5 heures après l'injection de l'extrait antigénique brut (surnageant pH 5.5) sont comparés à ceux obtenus à partir d'une série témoin constituée de 6 animaux ayant reçu une injection de tampon phosphate pH 5.5 enrichi en inhibiteurs protéasiques à la concentration finale 0.2 mM.

Les résultats sont rapportés dans le tableau XIV.

TABLEAU XIV

TAUX HORMONAUX DES RATS SAINS ET RATS INOCULES
AVEC LE SURNAGEANT PH 5.5 PREPARE EN PRESENCE D'ANTIPROTEASES

: Rats témoins inoculés avec le tampon phosphate pH 5.5:

Rats	TESTOS- TERONE ($\mu\text{g/ml}$)	OESTRA- DIOL (ng/ml)	FSH SERIQUE (ng/ml)	FSH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH SERIQUE (ng/ml)
A	0.4	16.5	367.1	64	251.3	13.6
B	0.26	13	548.6	30.2	246.5	10.2
C	0.38	15	974.3	62.4	128.1	19.45
D	1.16	16.5	454.9	58.4	221.09	15.15
E	2.19	17.5	375.2	30.6	211.37	59.04
F	3.06	16	353.3		161.41	22.25
MOYENNE	1.24 ± 0.47	15.7 ± 0.6	512.2 ± 97.1	49.1 ± 7.6	203.29 ± 19.7	23.3 ± 7.3

: Rats inoculés avec le surnageant PH 5.5 sacrifiés après 1 heure:

Rats	TESTOS- TERONE ($\mu\text{g/ml}$)	OESTRA- DIOL (ng/ml)	FSH SERIQUE (ng/ml)	FSH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH SERIQUE (ng/ml)
1	1.69	13.5	427.4	99.5	244	40.6
2	1.76	12	324.1	45	366.2	34.2
3	1.24	11	402.6	31.2	160	13.4
4	0.58	10.5	560.7	56	156	33.2
5	0.91	13	582.4		207	14.9
6	1.21	12.5	347.7	71.8	250	7.4
MOYENNE	1.23 ± 0.18	12 ± 0.4	440.8 ± 44.1	60.7 ± 11.7	230.5 ± 31.6	23.9 ± 5.5
PROBA- BILITE	P>0.1 non signif.	P<0.05 signif.	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.

: Rats inoculés avec le surnageant pH 5.5 sacrifiés après 5 heures:

Rats	TESTOS- TERONE ($\mu\text{g/ml}$)	OESTRA- DIOL (ng/ml)	FSH SERIQUE (ng/ml)	FSH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH SERIQUE (ng/ml)
1	0.57	8.5	381.3	56.9	287.2	19.0
2	1.3	10	492.2	24.4	212.8	22.3
3	0.59	13	521	48.4	156.6	16.6
4	1.74	10.5	333.9	48.4	130.6	34.2
5	3.3	14	496.2	63.6	133.8	23.0
6	1.18	11	387.6	35.4	198.3	27.4
MOYENNE	1.45 ± 0.41	11.1 ± 0.8	435.3 ± 31.4	44.4 ± 5.9	186.5 ± 24.3	23.7 ± 2.5
PROBA- BILITE	P>0.1 non signif.	P<0.05 signif.	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.	P>0.1 non signif.

α) Dosage des hormones stéroïdiennes sexuelles

Les intervalles de référence des hormones sexuelles établis à partir des animaux témoins sont :

- pour l'oestradiol, compris entre 13 et 17.5 ng/ml
(moyenne : 15.7 ± 0.6 ng/ml)
- pour la testostérone, compris entre 0.26 et 3.06 ng/ml
(moyenne = 1.24 ± 0.47 µg/ml)

Ces valeurs moyennes sont légèrement différentes de celles obtenues avec la série témoin précédemment utilisée qui avait reçu une injection de PBS. Ces différences très faibles sont, semble-t-il, beaucoup plus le résultat de variations individuelles qu'un effet propre au tampon phosphate pH 5.5 injecté.

L'injection du surnageant pH 5.5 une heure avant le sacrifice des animaux provoque une diminution significative des taux d'oestradiol (12 ± 0.4 ng/ml) ($P < 0.05$), tandis que la testostéronémie est inchangée (1.23 ± 0.18 µg/ml).

La baisse d'oestradiol est confirmée 5 heures après l'injection du surnageant pH 5.5. La majorité des cas présente des taux d'oestradiol fortement diminués (inférieur à 13 ng/ml), la valeur moyenne passant à 11.1 ± 0.8 ng/ml ($P < 0.05$). La testostéronémie demeure toujours inchangée, le taux moyen est de 1.45 ± 0.41 µg/ml.

Il semble que l'injection du surnageant pH 5.5 préparé en présence d'antiprotéases provoque une variation relativement sélective de la sécrétion d'oestradiol sans trouble de la biosynthèse de testostérone.

β) Dosage radioimmunologique des gonadostimulines

* Dosage des stimulines sériques (LH,FSH)

Aucune modification des concentrations sériques des gonadostimulines n'est constatée après action du surnageant pH 5.5

Toutes les valeurs de LH sériques dosées sont comprises dans l'intervalle normal de référence. Les taux moyens se situent après

une heure à 23.9 ± 5.5 ng/ml et après 5 heures à 23.7 ± 2.5 ng/ml contre 23.3 ± 7.3 ng/ml pour la série témoin.

Dans chacun des cas, les variations de concentration ne sont pas significatives ($P > 0.1$).

Ceci est également le cas pour la FSH sérique où les taux moyens oscillent entre 440.8 ± 44.1 ng/ml après une heure et 435.3 ± 31.4 ng/ml après 5 heures. Ces valeurs comparées au taux moyen normal (512.2 ± 97.1 ng/ml) sont sensiblement diminuées mais de façon encore non significative ($P > 0.1$).

* Dosages des gonadostimulines hypophysaires (LH, FSH)

De la même façon, nous ne notons aucune variation importante des gonadostimulines hypophysaires (LH, FSH) après injection de surnageant pH 5.5.

Pour la LH, à l'exception d'un seul rat où le taux hypophysaire est sensiblement augmenté, toutes les valeurs dosées une heure après l'injection test, sont comprises dans l'intervalle normal de référence. La concentration moyenne exprimée par hypophyse pour ce groupe d'animaux s'élève à 230.5 ± 31.6 µg contre 203.29 ± 19.7 µg pour la série témoin. Cette légère variation n'est pas significative ($P > 0.1$).

En 5 heures, les taux sont plus faibles que précédemment. Les valeurs minimales sont de l'ordre de 130-133 µg/hypophyse alors qu'elles dépassaient 156 µg/hypophyse après une heure d'action du surnageant antigénique. Cependant, toutes les valeurs de LH hypophysaire sont comprises dans l'intervalle normal des animaux témoins et le taux moyen à 186.5 ± 24.3 µg/hypophyse peut être considéré comme normal ($P > 0.1$).

Pour la FSH hypophysaire, on observe en une heure une légère augmentation du taux moyen de 60.7 ± 11.7 µg/hypophyse contre 49.1 ± 7.6 µg/hypophyse pour la série témoin. Dans cette série expérimentale, seuls deux animaux possèdent de fortes concentrations hypophysaires (99.5 µg - 71.8 µg). En 5 heures, on constate une diminution sensible du taux moyen à 44.4 ± 5.9 µg/hypophyse.

Dans les deux cas (1 heure et 5 heures), les variations de concentrations de FSH hypophysaire ne sont pas significatives.

Au total, l'analyse des bilans gonadiques effectués après l'injection d'un surnageant pH 5.5 préparé en présence d'antiprotéases ne fait pas apparaître de modification importante de la fonction gonadotrope. Aucune variation des paramètres circulants (testostérone, LH et FSH), et hypophysaires (LH,FSH) n'a été mise en évidence. En ce qui concerne la diminution d'oestradiol, celle-ci n'est pas totalement établie dans la mesure où la modification enregistrée n'est pas suffisante pour être significativement différente du taux moyen normal.

Dans ces conditions, il semble que les constituants parasitaires, libérés dans le tampon pH 5.5 et ayant franchi la barrière hémopéritonéale n'ont pas d'action directe ou indirecte sur la biosynthèse testiculaire.

Ainsi, des deux tests de stimulation pratiqués :

- l'un par injection de trypanosomes ayant subi un traitement visant à libérer leurs composants membranaires de surface (culot pH 5.5)

- l'autre par injection du manteau de surface libéré à pH 5.5,

les deux préparations étant stabilisées par antiprotéases, on retiendra que l'injection du culot se traduit en 5 heures par une diminution significative des gonadostimulines hypophysaires (LH et FSH), par une diminution significative de la FSH circulante, la LH circulante n'étant pas modifiée; et que l'injection du surnageant parasitaire a un effet apparemment comparable mais plus modeste dans son expression chiffrée dans la mesure où les gonadostimulines LH/FSH hypophysaires et circulantes semblent diminuées.

Nous avons alors complété cette étude en supprimant du protocole l'addition des antiprotéases. On peut, au vue des résultats, en effet s'interroger sur la responsabilité directe et même indirecte des protéases parasitaires dans la diminution des gonadostimulines hypophysaires constatées.

2) Etude des dysfonctions endocriniennes provoquées par l'injection in vivo de matériel trypanosomal obtenu sans antiprotéases

a) Préparation du matériel trypanosomal

Toute la préparation du matériel trypanosomal s'est effectuée sans antiprotéases depuis l'isolement des parasites par chromatographie d'échange ionique jusqu'à la libération du manteau de surface en tampon phosphate pH 5.5.

L'extrait antigénique (surnageant pH 5.5) provenant de l'infestation de 24 rats est injecté par voie intrapéritonéale à 6 rats males de 10 mois sous un volume de 5ml.

Le culot parasitaire (culot pH 5.5) est inoculé à 6 autres rats sous un même volume.

Ainsi, chaque rat aura reçu une préparation équivalente à la quantité parasitaire issu de 4 rats.

Chacune des deux séries expérimentales est accompagnée de 12 animaux contrôles comprenant :

- 6 animaux auxquels sont injectés 5 ml de tampon phosphate pH 5.5 sans antiprotéases

- 6 animaux auxquels sont injectés 5ml de tampon phosphate PBS pH 7.2.

Le sacrifice de ces animaux par décapitation est effectué 5 heures après l'inoculation.

Nous avons limité les dosages radioimmunologiques à ceux de la testostérone, de l'hormone lutéinisante sérique et hypophysaire.

b) Effet du culot parasitaire pH 5.5

Les valeurs de la testostérone, de la LH sérique et de la LH hypophysaire après injection du culot pH 5.5 sont analysées en fonction des résultats des animaux témoins inoculés par tampon PBS (tableau XV).

TABLEAU XV

TAUX HORMONAUX DES RATS TEMOINS (PBS PH 7.25) ET
DES RATS INOCULES AVEC LE CULOT PARASITAIRE PREPARE
EN ABSENCE D'ANTIPROTEASES

: Rats témoins inoculés avec le tampon PBS:

Rats	TESTOS- TERONE ($\mu\text{g/ml}$)	LH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH SERIQUE (ng/ml)
A	4.8	53	11
B	1.84	212	39
C	1.92	105	32
D	1.12	174	15
E	0.81	114	19
F	2.09	144	22
MOYENNE	2.10 ± 0.57	149.30 ± 19.7	23.0 ± 4.3

: Rats inoculés avec le culot pH 5.5 sans antiprotéases:

Rats	TESTOS- TERONE ($\mu\text{g/ml}$)	LH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH SERIQUE (ng/ml)
1	0.38		24
2	1.6	108	>0.5
3	0.51	368	12
4	0.19	282	>0.5
5	0.58	164	>0.5
6	0.12	322	19
MOYENNE	0.56 ± 0.21	248.80 ± 48.8	9.42 ± 4.2
PROBA- BILITE	P<0.05 signif.	P<0.05 signif.	P<0.05 signif.

α) La testostérone

L'effet du culot parasitaire conduit à une diminution nette de la testostéronémie. La valeur moyenne de $2.10 \pm 0.57 \mu\text{g/ml}$ pour les animaux témoins passe à $0.56 \pm 0.21 \mu\text{g/ml}$ pour les animaux tests.

La baisse de la testostéronémie est significative à $P < 0.05$.

β) Dosage radioimmunologique de l'hormone lutéinisante

* LH sérique

Les concentrations de la gonadostimuline relevées chez les animaux témoins se situent entre 11 et 39 ng/ml, soit une valeur moyenne calculée $23 \pm 4.3 \text{ ng/ml}$.

Parmi les 6 animaux inoculés, les taux de LH sérique sont :

- pour 2 cas, en limite normale
- pour un cas, de valeur basse
- pour 3 cas, à la limite de quantification malgré la sensibilité de la méthode radioimmunologique.

En dépit des 2 observations limite normale, les résultats moyens laissent apparaître des différences significatives entre animaux testés et animaux témoins (respectivement $9.4 \pm 4.2 \text{ ng/ml}$ contre $23 \pm 4.3 \text{ ng/ml}$) ($P < 0.05$).

Cette diminution de LH circulante est à rapprocher de la chute de testostéronémie également significative statistiquement.

Toutefois, à l'examen des valeurs de ces deux paramètres pour chaque rat pris individuellement, on s'aperçoit qu'il n'existe pas de relation nette de proportionalité entre la valeur de LH sérique et celle de la testostérone. Si l'on adopte le concept que la baisse de testostérone est induite uniquement par la baisse de LH sérique, on peut évoquer alors l'hypothèse que le taux de stimuline obtenue par dosage radioimmunologique ne reflète pas la quantité de LH "biologiquement active". On ne peut cependant pas exclure non plus totalement une action inhibitrice directe des

constituants parasitaires (enzymatiques ou non enzymatiques), sur la sécrétion de testostérone.

* Dosage de la LH hypophysaire

Chez les animaux infestés témoins le taux moyen de LH hypophysaire est de 149.3 ± 19.7 $\mu\text{g/hypophyse}$. Après action du culot parasitaire pH 5.5, cette valeur s'élève à 248.8 ± 48.8 $\mu\text{g/hypophyse}$, cette augmentation est significative ($P < 0.05$).

Ainsi, après 5 heures de stimulation par le culot parasitaire préparé sans antiprotéases, on constate que la fonction gonadotrope peut être rapidement altérée, par une diminution sensible de deux paramètres sériques (testostérone, LH) qui est accompagnée d'une augmentation de LH hypophysaire.

Le déficit gonadotrope ici rapporté est d'une intensité plus importante comparé aux observations faites après injection du culot parasitaire préparé en présence d'antiprotéases, le tableau d'hypogonadisme étant plus complet du fait du constat de réaction hypophysaire.

De cet ensemble de résultats, il est donc possible d'affirmer le rôle joué par les protéases parasitaires dans ces dysrégulations hormonales.

L'effet d'un surnageant antigénique pH 5.5 préparé sans antiprotéases a également été recherché adoptant un protocole identique.

c) Effet du surnageant antigénique pH 5.5

L'ensemble des résultats des dosages radioimmunologiques de la testostérone, de la LH sérique et hypophysaire est illustré par le tableau XVI

a) Dosage radioimmunologique de la testostérone

L'injection d'un extrait antigénique brut (surnageant pH 5.5) sans antiprotéases n'entraîne pas de modification de la testostéronémie. Dans la majorité des cas, les valeurs sont normales, le taux moyen se situe à 1.20 ± 0.36 $\mu\text{g/ml}$ contre 0.74 ± 0.13 $\mu\text{g/ml}$ pour la série témoin.

TABLEAU XVI

TAUX HORMONAUX DES RATS TEMOINS (TAMPON PH 5.5)
ET DES RATS INOCULES AVEC L'EXTRAIT ANTIGENIQUE PH 5.5
SANS ANTIPROTEASES.

:Rats témoins inoculés avec le tampon phosphate pH 5.5:

Rats	TESTOS- TERONE ($\mu\text{g/ml}$)	LH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH SERIQUE (ng/ml)
A	1.22	210	17
B	0.49	97.5	28
C	-	209	15
D	0.46	174	24
E	0.78	236	19
F	0.77	212.5	28
MOYENNE	0.74 ± 0.13	189.8 ± 20.1	21.83 ± 2.3

:Rats inoculés avec le surnageant antigénique pH 5.5:

Rats	TESTOS- TERONE ($\mu\text{g/ml}$)	LH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH SERIQUE (ng/ml)
1	1.17	211	17
2	0.35	245	36
3	1.84	265	8
4	1.05	235	14
5	0.26	131	0.5
6	2.58	289	36
MOYENNE	(des 6 rats)	(des 4 rats)	(des 6 rats) (des 4 rats)
	1.20 ± 0.36	229.33 ± 22.44	210.5 ± 28.7
			18.58 ± 5.9
PROBA- BILITE	P>0.1 non signif.	P<0.05 signif.	P<0.05 signif.
			P>0.1 non signif.
			P<0.05 signif.

β) Dosage radioimmunologique de l'hormone lutéinisante

* LH sérique

Le taux moyen de LH circulante passe de 21.8 ± 2.3 ng/ml pour la série témoin à 18.5 ± 5.9 ng/ml pour le groupe d'animaux expérimentaux. On note de grandes variations individuelles, sur les 6 animaux inoculés avec l'extrait antigénique :

- 2 rats possèdent des valeurs de LH sérique élevées, chacune à 36 ng/ml qui comparativement à la série témoin se situent au delà de la limite supérieure normale dosée à 28 ng/ml

- 4 animaux ont des taux beaucoup plus faibles passant de 17ng/ml à une valeur estimée à 0.5 ng/ml car en dessous du seuil de détection de la méthode radioimmunologique.

Si l'on compare le taux moyen de LH sérique des animaux témoins à celui des 4 animaux testés, on constate que la concentration de gonadostimuline diminue de façon significative à 9.8 ± 3.6 ng/ml.

Il est possible alors que les fortes concentrations notées chez les deux rats de la série expérimentale soient le résultat d'une mauvaise injection intrapéritonéale du matériel à tester. Cette hypothèse semblait déjà valable au regard des résultats de testostéronémie relevés chez l'un des animaux.

* Dosage de la LH hypophysaire

Les taux de LH hypophysaire après l'injection du surnageant antigénique pH 5.5 oscillent entre 131 et 289 µg/hypophyse. Notons que cette dernière valeur correspond à l'un des animaux pour lequel les taux de LH sérique et de testostérone avaient déjà été trouvés très élevés, ce qui avait fait discuter la qualité de l'injection intrapéritonéale; quoiqu'il en soit, le calcul statistique sur les 4 animaux à LH sérique significativement abaissée semble indiquer une réaction hypophysaire positive avec une légère augmentation à 210.5 ± 28.7 µg/hypophyse par rapport à 189.8 ± 20.1 µg/hypophyse pour la série témoin.

Au total, en 5 heures, l'effet du surnageant antigénique pH 5.5 préparé sans antiprotéases provoque une diminution marquée de la LH circulante sans retentissement au niveau testiculaire. Ces

observations déjà faites avec le culot pH 5.5 montrent qu'il n'existe pas de corrélation étroite entre la valeur de LH sérique dosée et le taux de testostérone.

En conclusion, l'injection d'extraits parasitaires induit chez l'hôte des modifications endocriniennes d'intensité différente selon que le matériel trypanosomal inoculé est préparé en présence ou en absence d'antiprotéases.

Nous avons regroupé sous formes d'histogrammes, les variations des différents paramètres sériques (testostérone, LH) et hypophysaire (LH) que nous avons suivis dans chacune des situations rapportées (figure 21).

L'essentiel se résume au fait que le culot parasitaire entraîne rapidement une altération de la fonction gonadique alors que l'effet du surnageant antigénique est plus nuancé.

L'addition d'antiprotéases au protocole provoque une diminution importante des effets des tests, que l'on utilise le culot ou le surnageant pH 5.5. Il semblerait donc que les protéases parasitaires jouent un rôle certain. Toutefois, l'analyse des résultats laisse aussi entendre que d'autres constituants du manteau de surface du trypanosomes pourraient aussi avoir un effet sur la fonction gonadotrope.

Nous avons recherché si l'antigène variable de surface, élément constitutif majeur du manteau pourrait jouer ce rôle.

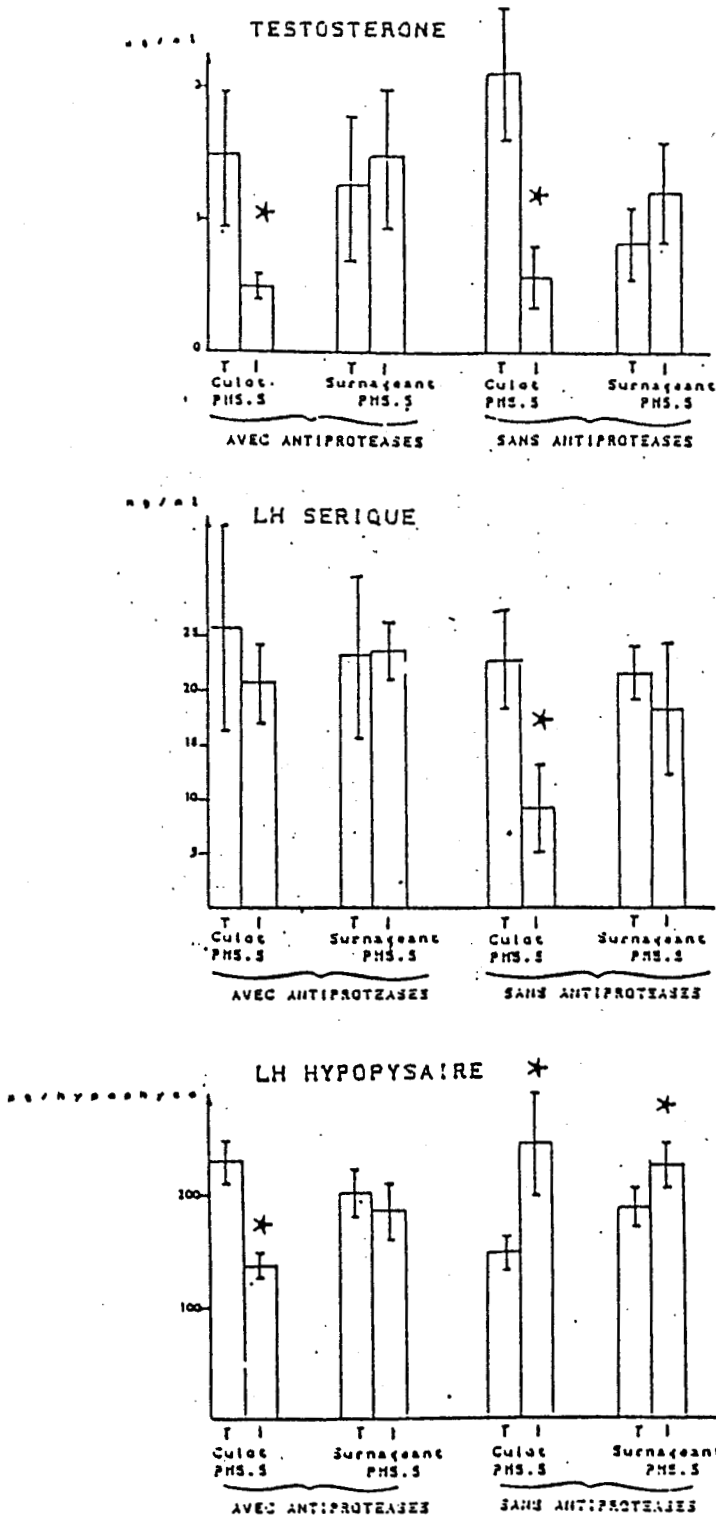
Actuellement, la fonction essentielle du manteau de surface décrite dans la littérature consiste en une barrière protectrice du trypanosome vis à vis des immuno globulines et d'autres systèmes de défense de l'hôte, mais peu de choses sont avancées concernant le devenir et l'éventuelle responsabilité biologique de l'antigène de surface une fois libéré dans le torrent circulatoire.

3) Etude de la fonction gonadique après injection de fractions antigéniques purifiées

a) Préparation du matériel biologique

Les techniques de purification de la forme soluble de

VARIATION DES TAUX DE TESTOSTERONE, DE LH SERIQUE
ET HYPOPHYSAIRE APRES 5 HEURES D'ACTION D'UN
MATERIEL TRYPANOSOMAL PH 5.5 PREPARE
AVEC OU SANS ANTIPROTEASES



Les variations significatives statistiquement sont soulignées d'une étoile .

FIGURE 21

l'antigène variable de surface par chromatographie d'affinité sur colonne de Concanavoline A sépharose permettent de préparer des quantités importantes de glycoprotéines de surface .

α) Purification de la "forme soluble" de l'antigène variable de T.b.brucei AnTat 1.1

A partir de l'extrait antigénique brut pH 5.5, l'antigène variable est purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de Concanavoline A sépharose.

L'extrait antigénique additionné d'antiprotéases est soumis à une dialyse contre le tampon d'équilibre de la colonne d'affinité (tampon phosphate 0.01 M, NaCl 0.5 M, MgCl₂ 1 mM et CaCl₂ 1 mM de pH 8.0) puis déposé sur colonne (BALTZ et coll 1976 (6)).

Les conditions d'éluion ont été légèrement modifiées par rapport à la description originale . Elles procèdent en plusieurs étapes selon un gradient discontinu qui verra utilisé successivement :

- le tampon d'équilibre qui permet d'obtenir une fraction non retenue sur la colonne d'affinité: fraction F₁ représentant essentiellement les antigènes communs non glycoprotéiques

- le même tampon enrichi en méthyl α-D-mannoside à 10% qui élue la fraction F₂

- en troisième étape, l'addition de β mercaptoéthanol à 1% au tampon précédent livre la fraction F₃

- enfin l'éluion par ce même tampon enrichi en SDS à 0.1% élue la fraction F₄.

Les différents éluats sont dialysés une semaine à 4°C contre de l'eau désionisée puis lyophilisés.

β) comportement des fractions chromatographiées en électrophorèse de polyacrylamide

L'étude électrophorétique en gel de polyacrylamide en présence de SDS montre en l'absence de traitement préalable des échantillons par le β mercaptoéthanol :

- pour la fraction F₁, une grande diversité de bandes affines

pour le bleu Coomassie dont les tailles moléculaires s'étendent pour l'essentiel de 67000 à 14400 daltons

- pour la fraction F₂, une bande de taille moléculaire apparente voisine de 110000 daltons

- pour les fractions F₃ et F₄, une bande majeure à 110000 avec une bande mineure à 60000 daltons (figure 22).

Lorsque ces fractions subissent préalablement à la migration électrophorétique un traitement par β mercaptoéthanol, elles se présentent:

- pour la fraction F₁, sous l'aspect de plusieurs bandes polydispersées de tailles moléculaires apparentes toujours comprises entre 20000 et 67000 daltons mais moins nombreuses et mieux individualisées

- pour les fractions F₂, F₃ et F₄, sous forme d'une bande de taille moléculaire apprente voisine de 60000 contaminée par des éléments mineurs au plan quantitatif de poids moléculaires inférieurs.

8) Caractérisation immunologique

L'immunoblotting des fractions F₃ et F₄ vis à vis d'un immunsérum préparé à partir de la fraction F₂ a révélé une réponse positive confirmant la présence d'antigène variable dans ces fractions (figure 23).

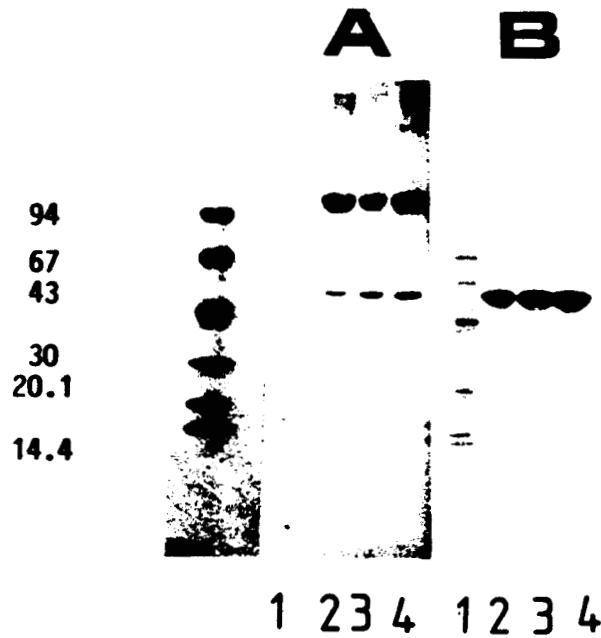
Les fractions F₂, F₃, F₄ identifiées à l'antigène variable se présentent donc essentiellement sous forme dimère (à 120000 daltons) sensible à un agent réducteur qui livre alors une forme monomère à 60000 daltons.

Les rendements en antigène variable par cette technique de purification sont à partir d'un rat infesté pour le variant AnTat 1.1 A de :

- 1.3 mg de fraction F₂
- 1.0 mg de fraction F₃
- 3.0 mg de fraction F₄

PROFIL ELECTROPHORETIQUE DES FRACTIONS ANTIGENIQUES
PURIFIEES SUR COLONNE DE CONCANAVALINE A-SEPHAROSE

GEL DE POLYACRYLAMIDE 5-30 % RESPECTIVEMENT EN L'ABSENCE (A)
ET EN PRESENCE (B) DE β -MERCAPTOETHANOL



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

- (2)- méthyl- α -D-mannoside à 10 %
- (3)- méthyl- α -D-mannoside à 10 % + β -mercaptoéthanol à 1 %
- (4)- méthyl- α -D-mannoside à 10 % + β -mercaptoéthanol à 1 % + SDS à 0.1 %

Tampon de dissolution des échantillons :

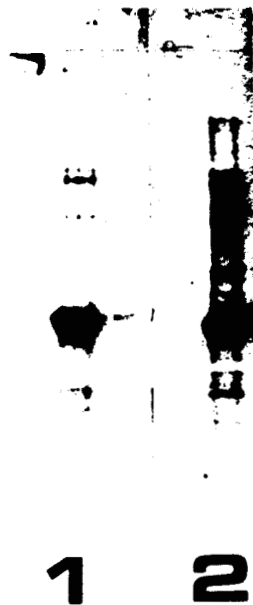
A : Tris-HCl 0.0625 M, SDS 2 %, glycérol 10 %, pH 6.8.

B : Tris-HCl 0.0625 M, SDS 2 %, β -mercaptoéthanol 5 %, glycérol 10 %,
pH 6.8.

FIGURE 22

REVELATION IMMUNOLOGIQUE DES FRACTIONS ANTIGENIQUES
PURIFIEES F₃, F₄ VIS A VIS D'UN IMMUNSERUM DRESSE
A PARTIR DE LA FRACTION F₂ (VARIANT AnTat 1.1 A)

IMMUNOTRANSFERT D'UN GEL DE POLYACRYLAMIDE
(GRADIENT 5 - 30 % EN PRESENCE DE SDS)



1 - FRACTION F₃
2 - FRACTION F₄

ELUEES DE CONCAVALINE A-SEPHAROSE

FIGURE 23

b) Protocole retenu pour le test gonadique antigène variable

Six rats mâles âgés de 10 mois ont été inoculés par un mélange des 3 fractions (F₂, F₃, F₄), en respectant le mieux possible les proportions de chaque fraction.

Ainsi une solution de:

- 30 mg de F₂
- 30 mg de F₃
- 50 mg de F₄

repris dans 30 ml de tampon phosphate pH 5.5 enrichi en antiprotéases (TLCK, PMSF, NEM) à la concentration finale (0.2 mM) est injecté par voie intrapéritonéale à raison de 5 ml par rat, ce qui représente par rat 4 fois la quantité d'antigène variable isolée par rat infesté.

Cinq animaux témoins, de même âge et de même poids ont accompagné cette série expérimentale. Ces animaux ont été inoculés avec 5 ml de tampon phosphate pH 5.5 enrichi en inhibiteurs protéasiques à 0.2 mM.

Les animaux sont sacrifiés dans les 5 heures suivant l'injection intrapéritonéale. Le sang est prélevé en vue des dosages radioimmunologiques de la testostérone et de la LH circulante ainsi que l'hypophyse pour le dosage de la LH hypophysaire.

c) Résultats des dosages radioimmunologiques

Les taux de testostérone, de LH sérique et de LH hypophysaire des animaux sains et infestés sont donnés dans le tableau XVII.

a) Dosage de la testostérone

L'inoculation des fractions glycoprotéiques purifiées, provoque chez le rat un effondrement des taux de testostérone, les valeurs sont comprises entre 0.07 et 0.65 µg/ml alors que l'intervalle normal de testostérone relevé dans la série d'animaux témoins se situe entre 1.02 et 2.35 µg/ml.

La valeur moyenne chute de 1.52 ± 0.24 µg/ml pour les animaux témoins à 0.31 ± 0.08 µg/ml pour les animaux infestés.

TABLEAU XVII

TAUX HORMONAUX DES RATS TEMOINS (TAMPON PH 5.5)
ET DES RATS INOCULES AVEC LES FRACTIONS ANTIGENIQUES
PURIFIEES

: Rats témoins :

Rats	TESTOS- TERONE ($\mu\text{g/ml}$)	LH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH SERIQUE (ng/ml)
A	1.02	191.6	28.2
B	1.66	210	20
C	1.53	163.4	22.8
D	2.35	257	30
E	1.02	299.8	28.2
MOYENNE	1.52 ± 0.24	224.3 ± 24.2	25.8 ± 1.8

: Rats inoculés avec F2, F3, F4 :

Rats	TESTOS- TERONE ($\mu\text{g/ml}$)	LH HYPO ($\mu\text{g/hypophyse}$)	LH SERIQUE (ng/ml)
1	0.42	123.2	6.6
2	0.65	180.2	13
3	0.07	161.3	33.2
4	0.13	142.6	32.4
5	0.26	121	11.6
6	0.34	161.2	-
MOYENNE	0.31 ± 0.08	148.3 ± 9.5	19.3 ± 5.5
PROBA- BILITE	$P < 0.01$ signif.	$P < 0.05$ signif.	$P > 0.05$ non signif.

Cette diminution importante de la testostéronémie est hautement significative et permet de démontrer une privation de la synthèse stéroïdienne testiculaire quasi complète dans les 5 heures suivant l'injection d'antigène variable.

β) Dosage de l'hormone lutéinisante

* Dosage de l'hormone lutéinisante sérique

Les taux de LH sérique de référence dosés chez les animaux témoins sont de l'ordre de 20 à 30 ng/ml (moyenne = 25.8 ± 1.8 ng/ml). Après injection des fractions purifiées d'antigène variable, une diminution (significative, $P < 0.01$, pour 3 animaux de la série expérimentale) de LH sérique à 10.4 ± 1.9 ng/ml est constatée alors que deux animaux de cette même série présentent un taux de LH ($32.4 - 33.2$ ng/ml) supérieur à la valeur normale la plus élevée. On remarquera pour ces deux derniers cas que les taux de testostérone correspondent aux valeurs les plus faibles dosées pour cette série expérimentale.

Il ne semble pas exister, nous le constatons cette fois encore, de relation étroite entre le taux de LH sérique dosé par méthode radioimmunologique et les valeurs de testostérone correspondantes.

Ces résultats montrent que l'injection de fractions antigéniques purifiées inhibent la sécrétion de testostérone.

L'hyposécrétion testiculaire de testostérone pourrait donc être en rapport avec :

- soit une reconnaissance directe de l'antigène de surface du trypanosome pour les récepteurs testiculaires de gonadostimulines circulantes

- soit par une reconnaissance directe de ces mêmes glycoprotéines par d'autres récepteurs à l'origine d'un système de contrôle négatif testiculaire.

* Dosage de l'hormone lutéinisante hypophysaire

Les valeurs d'hormone lutéinisante hypophysaire des animaux témoins varient de 163.4 à 299.8 µg/hypophyse. Chez les animaux

infestés, à l'exception d'un rat, toutes les valeurs d'hormone hypophysaire sont inférieures à la valeur normale la plus basse.

Les taux moyens exprimés par hypophyse passent de $224.3 \pm 24.2 \mu\text{g}$ chez les animaux témoins à $148.3 \pm 9.5 \mu\text{g}$ chez les animaux infestés. Cet effondrement du taux de LH hypophysaire après injection de l'extrait antigénique purifié est lui aussi significatif à $P < 0.05$.

Ainsi, de ces résultats, nous constatons que l'injection de la forme soluble de l'antigène variable purifié sur colonne de Concanavaline A-sépharose en quantité correspondante à 4 fois la parasitémie d'un rat provoque un déficit hormonal qui se traduit principalement par une baisse accentuée des taux de testostérone sérique et de LH hypophysaire avec une LH circulante apparemment conservée.

Il est surprenant et d'un grand intérêt de constater que l'injection d'antigène glycoprotéique de taille 110000 puisse interférer au niveau hypophysaire pour fortement freiner la synthèse de gonadostimuline. Est-ce un effet direct ? Est-ce un effet de la molécule native ou dégradée ? Ces éléments doivent être vérifiés.

En conclusion, l'injection in vivo de constituants parasitaires isolés a permis de mettre en évidence 2 mécanismes d'action sur la fonction gonadotrope :

- une action directe de fractions glycoprotéiques parasitaires purifiées (antigène variable) sur la sécrétion testiculaire et sur la fonction antéhypophysaire de LH, sans modification sensible des taux de LH sérique,

- une action directe de l'extrait antigénique brut (surnageant pH 5.5) et du culot parasite (culot pH 5.5) sur l'hormone lutéinisante circulante lorsque ces échantillons sont préparés en l'absence d'inhibiteurs de protéases, mettant en évidence l'intervention de protéases parasitaires.

Ces activités enzymatiques parasitaires sont actuellement à l'étude, elles ont été localisées dans le surnageant pH 5.5, dans le culot pH 5.5 et aussi pour certaines coéluées avec l'antigène variable lors de la chromatographie d'affinité sur Concanavaline A sépharose.

Il apparaissait alors intéressant d'envisager une approche expérimentale in vitro pour la mise en évidence de l'effet direct possible de ces enzymes sur la gonadostimuline responsable du contrôle testiculaire à savoir l'hormone lutéinisante qui a toujours été dosée dans les différents protocoles expérimentaux menés in vivo.

IV) ETUDE DE L'HORMONE LUTEINISANTE EN PRESENCE DE MATERIEL TRYPANOSOMAL IN VITRO

L'étude in vitro de l'effet du matériel trypanosomal sur une préparation d'hormone lutéinisante de rat purifiée a été envisagée après radioiodination de la glycoprotéine.

Le marquage de la stimuline hypophysaire (NIDDK - LHI7) à l'iode 125 I (IMS-30 Amersham) a été effectué selon la technique décrite par GREENWOOD et coll. 1963 (49), protocole que nous avons détaillé dans l'appendice technique.

L'hormone marquée est mise en contact avec le surnageant pH 5.5 ou avec le culot pH 5.5 obtenus lors du protocole de libération du VSG par choc isoosmotique des trypanosomes à pH 5.5. La cinétique d'incubation est effectuée à 37° C. Des prélèvements sont réalisés après 30 minutes, 2 heures et 6 heures. Le comportement électrophorétique de la LH 125 I est suivi en SDS PAGE puis révélé par autoradiographie.

A) RESULTATS

1) Etude électrophorétique de l'hormone lutéinisante de rat marquée à 125 I

La pureté de la préparation hormonale a été vérifiée par électrophorèse en présence de SDS.

Le comportement électrophorétique de l'hormone marquée déposée en tampon Tris HCl pH 6.8 glycérol 10% (LAEMMLI 1970 (81)), montre après autoradiographie du gel, 2 bandes radioactives:

- une bande représentative de la LH native de taille moléculaire apparente (Mr) 30000 daltons

- une bande de plus faible taille proche de 18000 daltons correspondant à la sous unité α libre de l'hormone.

La répartition de la radioactivité appréciée par un densitomètre type cliniscan 2 Helena, estime à 77% la radioactivité dans la forme native de LH et à 23% la radioactivité au niveau de la sous unité α (figure 24).

Rappelons que la LH est une association de sous-unités élémentaires α et β par interactions non covalentes.

Le traitement de l'hormone: 5 minutes à 100° C en milieu réducteur et en conditions dissociantes selon KRUMMEN et BALDWIN 1988 (79) (tampon Tris HCl 0.0625 M pH 6.8, SDS 6%, β mercaptoéthanol 10%) la sépare en effet en ses deux sous-unités α et β de tailles moléculaires apparentes respectives d'environ 18000 et 13000 daltons .

L'intégration densitométrique du profil électrophorétique de l'hormone totalement dissociée fait apparaitre un marquage nettement prédominant au niveau de la sous-unité α 78% contre 22% au niveau de la sous-unités β .

On comprend donc que la préparation de LH que nous avons pu utiliser était en partie dissociée et que le rapport relatif d'iode ^{125}I au niveau des sous-unités α et β ne permet pas la caractérisation de la sous-unité β sur une étude directe (figure 24)

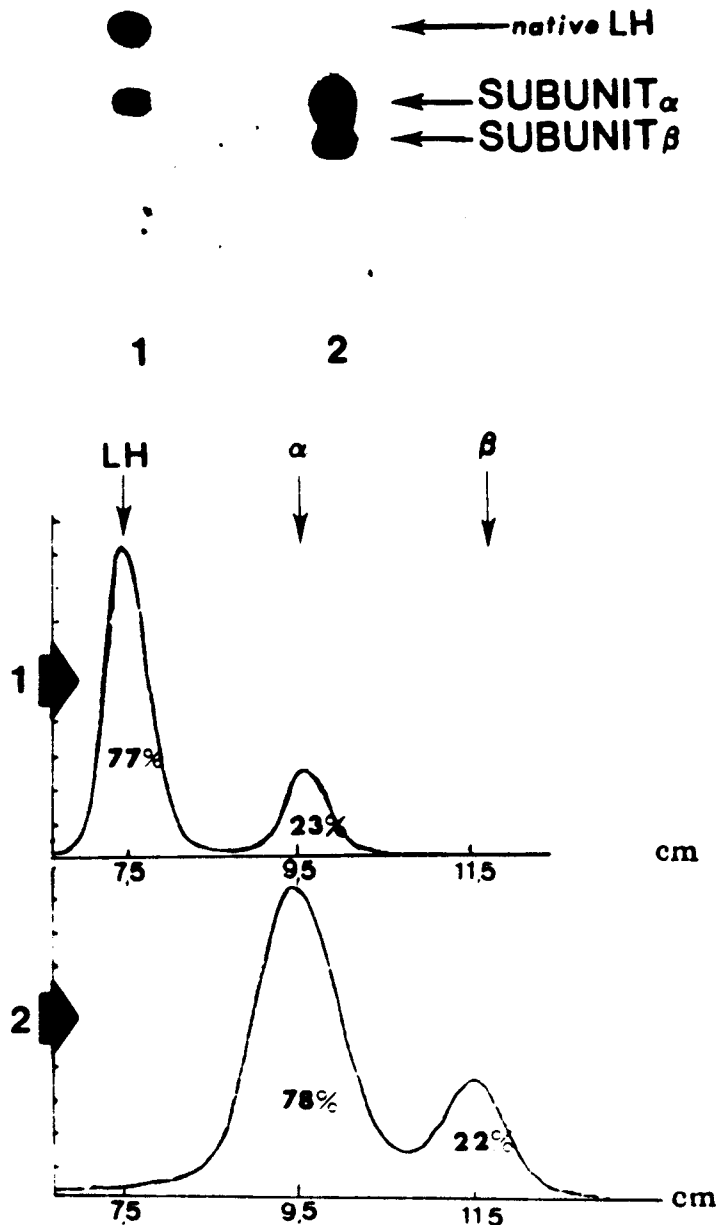
Ainsi caractérisée, la préparation de LH ^{125}I a été mise en contact avec les différentes fractions trypanosomales, incubée puis analysée en gel de polyacrylamide.

Cette étude in vitro a porté sur l'effet des préparations trypanosomales préparées en l'absence ou présence d'antiprotéases. Il s'agissait d'une part de l'extrait antigénique brut (surnageant pH 5.5) et d'autre part du culot parasitaire (culot pH 5.5) provenant d'une préparation d'environ 80 à 130 10^6 cellules soumises au choc isoosmotique (tampon phosphate pH 5.5).

°Nous remercions le groupe de Mr le professeur JUTISZ (Unité CNRS: laboratoire des Hormones polypeptidiques, 91198 Gif sur Yvette, France), qui nous a fourni l'hormone lutéinisante de rat en provenance du NIH qui a été retenu pour le marquage.8

ETUDE ELECTROPHORETIQUE DE LA LH ¹²⁵I ET ENREGISTREMENT
DENSITOMETRIQUE DE LA REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE

AUTORADIOGRAPHIE DU GEL DE POLYACRYLAMIDE 5-30 % EN PRESENCE DE SDS



Tampon de dissolution des échantillons :

1 : Tris-HCl 0.0625 M, glycérol 10 %, pH 6.8.

2 : Tris-HCl 0.0625 M, SDS 6 %, β -mercaptoéthanol 10 %, glycérol 10 %, pH 6.8.

FIGURE 24

La cinétique était réalisée à 37° C sur un échantillon de LH ^{125}I correspondant à 440000 cpm. Les prélèvements ont été effectués après 30 minutes, 2 heures et 6 heures. Sur chaque aliquot, 20000 cpm ont été prélevés et analysés en SDS-PAGE.

2) Etude électrophorétique de l'hormone marquée incubée en présence du culot parasitaire préparé avec ou sans antiprotéases (culot pH 5.5)

Le témoin est obtenu par incubation de la LH marquée dans le tampon phosphate (PBS) pH 7.2 ayant servi à la reprise du culot parasitaire après centrifugation de la préparation de trypanosomes ayant subi le choc isoosmotique à pH 5.5 en présence ou en absence d'antiprotéases. Aucune modification de la répartition de radioactivité (forme native, sous-unité α) n'est observée au cours de la cinétique, 30 minutes, 2 heures et 6 heures (figure 25).

a) Effet d'un culot parasitaire pH 5.5 préparé en présence d'antiprotéases

Dès 30 minutes d'incubation, on observe (figure 25), une diminution de la radioactivité de l'hormone native (12%) au profit des deux sous-unités libres α et β qui totalisent près de 88% de la radioactivité du matériel déposé. Après 2 heures de cinétique, la forme dimère de la LH tend à disparaître (7%) alors que s'intensifie le marquage de la sous-unité α (62%) et de la sous-unité β (31%). Après 6 heures, seules les deux sous-unités libres sont révélées avec cependant une diminution d'intensité de marquage de la bande représentative de la sous-unité α (48%) alors que la bande radioactive correspondant à la sous-unité β reste stable (42%).

L'effet "dissociant" du culot pH 5.5 apparaît donc très marqué. On note une diminution d'intensité de marquage de la sous-unité α qui met en évidence un processus de dégradation alors que la sous-unité β n'est pratiquement pas affectée.

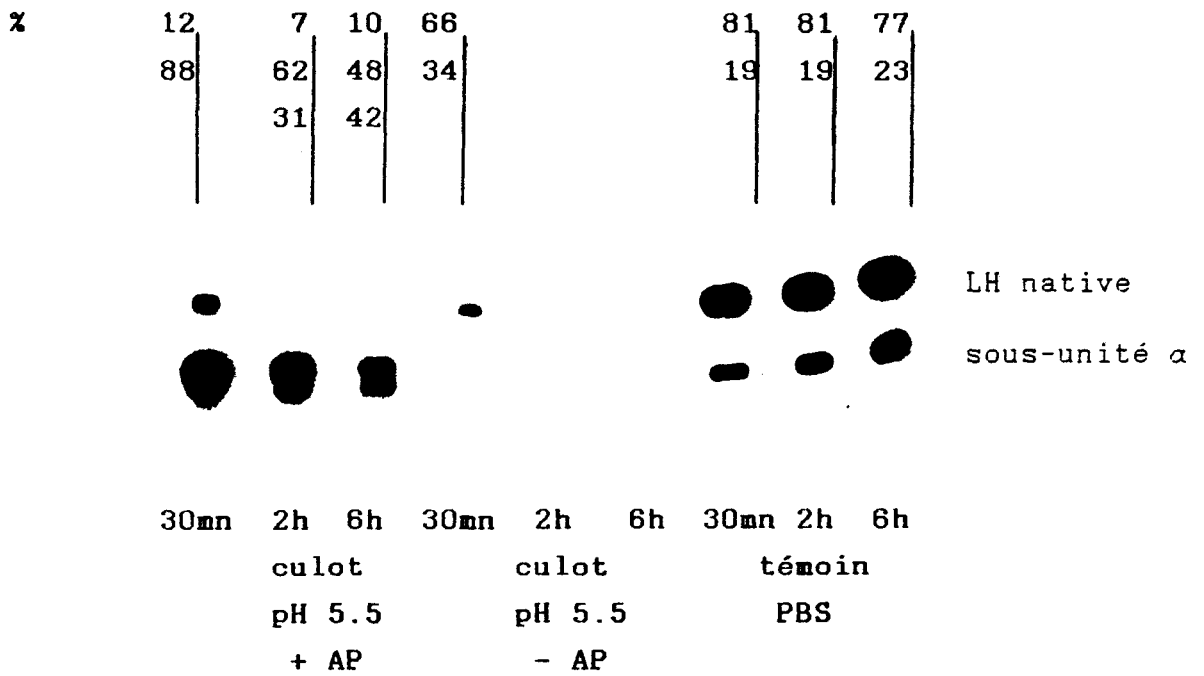
b) Effet d'un culot parasitaire pH 5.5 préparé sans antiprotéases

La protéolyse du matériel hormonal radioactif illustré par la

REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE ET PROFIL ELECTROPHORETIQUE
 DE LA LH ¹²⁵ I AU COURS DE LA CINETIQUE D'INCUBATION EN
 PRESENCE D'UN CULOT PH 5.5 AVEC OU SANS
 ANTIPROTEASES (± AP)

AUTORADIOGRAPHIE DU GEL DE POLYACRYLAMIDE 5-30% EN PRESENCE DE SDS.

REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE



Tampon de reprise des échantillons: Tris HCl 0.0625M
 glycérol 10%
 pH 6.8

FIGURE 25

figure 25 est très rapide . Après 30 minutes, l'hormone native ainsi que la sous-unité α sont à peine visibles en électrophorèse. Avec des incubations prolongées (2 heures puis 6 heures), tout le matériel hormonal radioactif est dégradé.

Le culot pH 5.5 préparé sans antiprotéases possède donc une action protéolytique intense qui s'exprime sur la molécule native et les sous-unités α et β .

Ainsi, ces résultats montrent que l'addition d'inhibiteurs protéasiques au protocole de libération du VSG réduit l'effet protéolytique du culot cellulaire, néanmoins on constate que celui-ci conserve une activité dissociante avec une dégradation essentiellement menée vers les sous-unités α . Sans préjuger du rôle des inhibiteurs naturels présents dans le sang d'un rat parasité on peut donc envisager la possibilité lors d'une immunolyse parasitaire de l'effet d'enzymes sur l'hormone lutéinisante circulante.

3) Etude électrophorétique de l'hormone marquée incubée en présence de l'extrait antigénique (surnageant pH 5.5) préparé avec ou sans antiprotéases

Les témoins retenus sont le produit de l'incubation de la LH marquée dans le tampon phosphate pH 5.5 ayant servi à la préparation des extraits parasitaires (surnageant pH 5.5). Aucune modification n'est notée au niveau du profil électrophorétique de l'hormone (figure 26).

a) Effet d'un surnageant pH 5.5 préparé avec antiprotéases

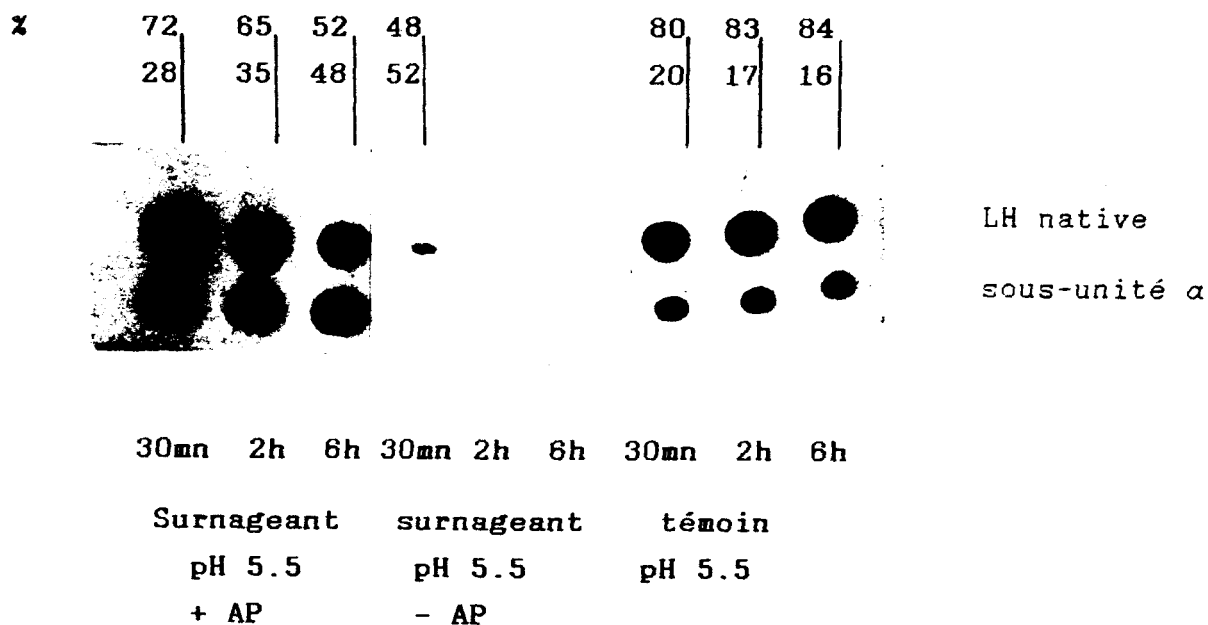
Si l'analyse électrophorétique du matériel radioactif montre un profil analogue à celui de l'échantillon témoin correspondant, en revanche, les enregistrements densitométriques des différents temps d'incubation (30 minutes, 2 heures, 6 heures), révèlent l'effet du surnageant pH 5.5 sur la LH, avec une baisse de radioactivité de l'hormone native passant de 72% à 30 minutes à 65% à 2 heures et 52% à 6 heures, au profit de la sous-unité α (28% à 30 minutes et 48% à 6 heures).

Le surnageant pH 5.5 avec antiprotéases provoque donc une dissociation de l'hormone marquée.

REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE ET PROFIL ELECTROPHORETIQUE
DE LA LH ¹²⁵ I AU COURS DE LA CINETIQUE D'INCUBATION EN
PRESENCE D'UN EXTRAIT ANTIGENIQUE PH 5.5 AVEC OU SANS
ANTIPROTEASES (±AP)

AUTORADIOGRAPHIE DU GEL DE POLYACRYLAMIDE 5-30% EN PRESENCE DE SDS.

REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE



Tampon de reprise des échantillons: Tris HCl 0.0625 M
glycérol 10 %
pH 6.8

FIGURE 26

b) Effet d'un surnageant pH 5.5 préparé sans antiprotéases

L'autoradiographie de l'électrophorèse de l'hormone marquée incubée dans l'extrait antigénique brut préparé sans inhibiteurs protéasiques montre dès 30 minutes une diminution de la radioactivité de la LH native ainsi que de la sous-unité α . Après 2 et 6 heures de réaction, le marquage radioactif est totalement absent du profil électrophorétique. La sous-unité β est aussi très rapidement détruite. (figure 26)

Au total, on insistera sur le fait que surnageant pH 5.5 et culot pH 5.5 préparés en présence d'antiprotéases ont un effet d'intensité et de qualité différentes sur l'hormone lutéinisante. On constate que le culot contribue activement à la dissociation de l'hormone lutéinisante en ses deux sous-unités α et β libres, dissociation qui s'accompagne d'une dégradation préférentielle de la sous-unité α . L'effet du surnageant pH 5.5 est lui, plus faiblement dissociant avec un effet protéolytique plus marqué vers la sous-unité β .

Afin de rapprocher ces résultats des expériences menées in vivo, il nous a semblé intéressant de compléter cette étude en étudiant l'effet du surnageant pH 5.5 sur l'hormone marquée dans ces conditions de pH physiologique.

c) Effet du pH sur l'activité protéolytique d'un surnageant pH 5.5 préparé en présence ou absence d'antiprotéases

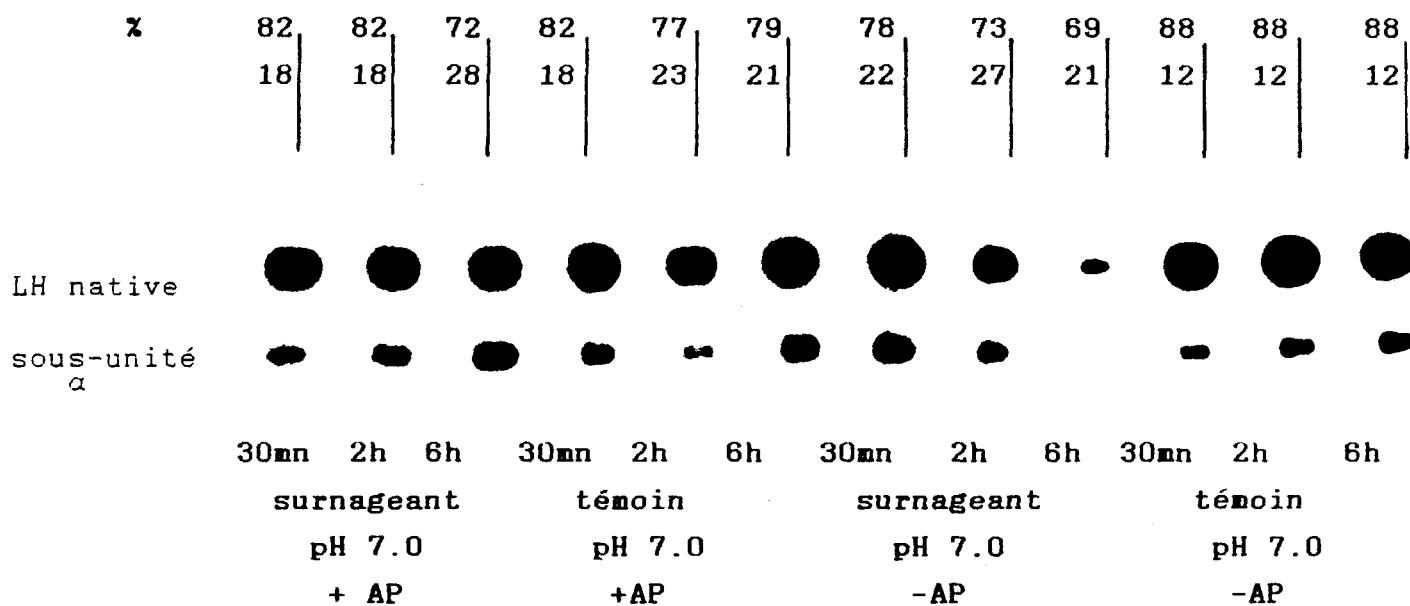
Les témoins ainsi que les extraits antigéniques préparés avec ou sans antiprotéases à pH 5.5 sont ramenés et stabilisés à pH 7.0 par addition de soude 1N. Les mêmes concentrations d'hormone marquée, les mêmes conditions de temps et de température d'incubation ont été conservées de même que le protocole analytique électrophorétique.

Les témoins correspondants à la cinétique de réaction de la LH ^{125}I dans le tampon phosphate pH 7.0 ne font pas apparaître de différences significatives tant au plan de la migration électrophorétique qu'à la répartition de radioactivité entre l'hormone native et sa sous-unité α libre en présence ou en l'absence d'antiprotéases (figure 27).

REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE ET PROFIL ELECTROPHORETIQUE
DE LA LH ¹²⁵ I AU COURS DE LA CINETIQUE D'INCUBATION EN
PRESENCE D'UN EXTRAIT ANTIGENIQUE PH 7.0 AVEC OU SANS
ANTIPROTEASES (± AP)

AUTORADIOGRAPHIE DU GEL DE POLYACRYLAMIDE 5-30% EN PRESENCE DE SDS.

REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE



Tampon de reprise des échantillons: Tris HCl 0.0625 M
glycérol 10 %
pH 6.8

FIGURE 27

Les profils électrophorétiques de l'hormone marquée en présence de l'extrait antigénique révèlent les points suivants :

- en présence d'inhibiteurs protéasiques, une faible variation de la distribution de radioactivité entre la forme complète de la LH et la sous-unité α seule est observée; puisque passant respectivement de 82%/18% à 30 minutes contre 72%/28% 6 heures plus tard. L'activité dissociante du surnageant antigénique est relativement modérée.

- en l'absence d'antiprotéases, le pourcentage relatif de la radioactivité représentative de l'hormone native passe de 78% à 30 minutes à 69% après 6 heures; quant à la sous-unité α , celle-ci disparaît progressivement au cours de la cinétique d'incubation.

L'action du surnageant antigénique à pH 7.0 entraîne une protéolyse particulièrement marquée de la sous-unité α ce qui pourrait s'expliquer par l'existence de sites de clivages protéolytiques masqués dans la configuration de l'hormone native.

Ainsi, l'action du surnageant antigénique pH 5.5 neutralisé à pH 7.0 possède un effet peu dissociant sur la LH en présence d'inhibiteurs protéasiques et contribue de façon plus nuancée à la dégradation de la gonadostimuline en absence d'antiprotéases.

Par rapport aux effets constatés par l'action du surnageant antigénique pH 5.5, on remarque que la neutralisation à pH 7.0 de ce surnageant amène les différences suivantes:

- une diminution de l'action dissociante,
- une diminution de l'intensité de protéolyse. Cette observation montre une action privilégiée d'enzymes dont le pH optimum se situe en zone acide. Ceci est le cas par exemple des enzymes lysosomiaux dont on sait que le pH optimum est de 5.8 (LONSDALE - ECCLES 1986 (88)).

4) Action d'un agent réducteur sur l'effet dissociant et protéolytique d'un matériel trypanosomal sur la LH ¹²⁵I

L'effet dissociant d'un agent réducteur a été illustré dans le mémoire. L'addition du DTT au surnageant pH 5.5 préparé en présence ou en absence d'antiprotéases, pourrait donc avoir un effet cumulatif dans la mesure où des thiols protéases ont été

caractérisées dans du matériel parasitaire. (LONSDALE - ECCLES et MPIMBALA 1986 (88), PAMER et coll. 1989 (109)).

Dans chacune des préparations précédemment étudiées, culots cellulaires, surnageants antigéniques pH 5.5 ou pH 7.0 préparés en la présence ou l'absence d'antiprotéases, la concentration du dithiothréitol (DTT) a été fixée à 1 mM. Les conditions opératoires de concentrations hormonales, de temps et de température d'incubation restent inchangées.

a) Addition de DTT au matériel trypanosomal préparé sans antiprotéases

A pH 5.5, les préparations d'hormone marquée résultant de l'incubation en présence d'une part des extraits parasitaires (surnageant et culot), et d'autre part en tampon phosphate enrichies en DTT, présentent les profils électrophorétiques suivants (figure 28).

Pour les échantillons témoins, nous ne constatons aucune modification du comportement électrophorétique de l'hormone marquée et de la sous-unité α libre; le pourcentage relatif de la radioactivité des deux bandes marquées reste inchangé avec ou sans DTT, à 81%/19% (30 minutes) contre 79%/21% (6 heures).

Dans les préparations trypanosomales, dès 30 minutes de contact, le matériel radioactif a totalement disparu du profil électrophorétique. L'effet protéolytique du culot comme du surnageant antigénique est immédiat.

La présence de DTT amplifie l'effet protéolytique des différents extraits parasitaires, ceci est en faveur d'une participation active des thiols protéases dans le processus de dégradation de la LH purifiée.

A pH 7.0, les profils électrophorétiques de la gonadostimuline marquée illustrés par la figure 29 montrent les résultats suivants:

- dans l'échantillon témoin contenant l'hormone marquée en tampon phosphate pH 7.0 sans antiprotéases, nous observons l'apparition des 2 sous-unités libres α et β au cours de la cinétique. Il y a donc à ce pH une action propre du DTT qui,

ELECTROAUTORADIOGRAMME DE LH ¹²⁵I EN PRESENCE
D'UN MATERIEL TRYPANOSOMAL PH 5.5 SANS
ANTIPROTEASES ENRICHI EN DTT 1mM

AUTORADIOGRAPHIE DU GEL DE POLYACRYLAMIDE 5-30% EN PRESENCE DE SDS.

REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE

z

81	83	79
19	17	21



LH native
sous-unité α

30mn	2h	6h	30mn	2h	6h	30mn	2h	6h
surnageant			culot			témoin		
pH 5.5 - AP			pH 5.5 - AP			pH 5.5		
+DTT			+DTT			+DTT		

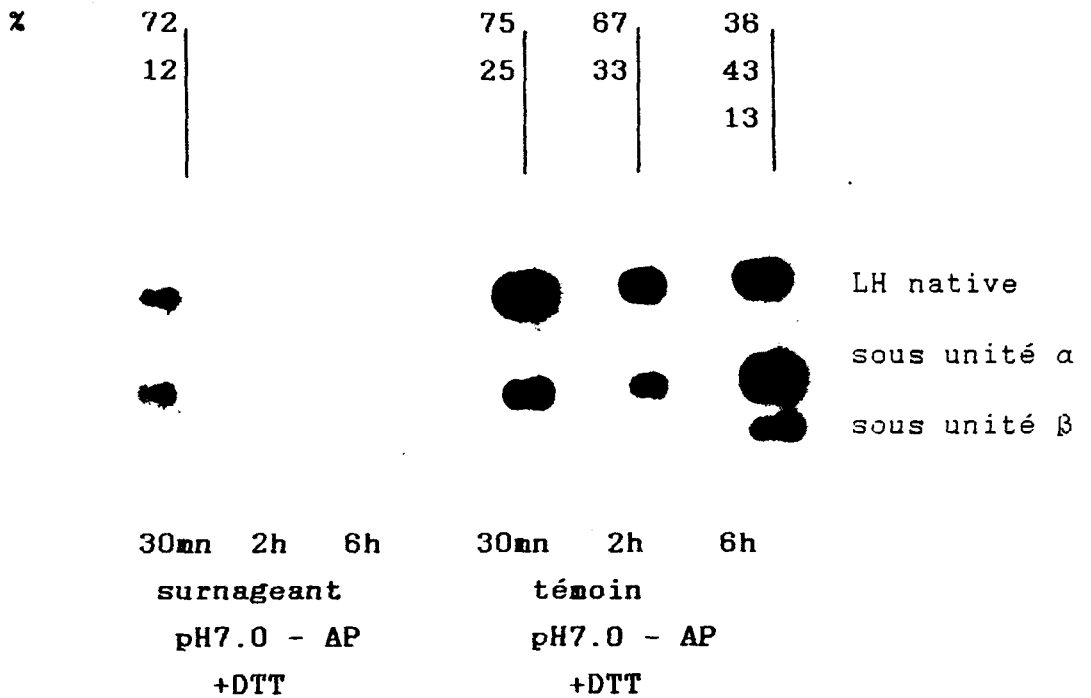
Tampon de reprise des échantillons: Tris HCl 0.0625 M
glycérol 10 %
pH 6.8

FIGURE 28

REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE ET PROFIL ELECTROPHORETIQUE
DE LA LH ¹²⁵I AU COURS DE LA CINETIQUE D'INCUBATION EN
PRESENCE D'UN EXTRAIT ANTIGENIQUE PH 7.0 - AP ENRICHI
EN DTT 1mM

AUTORADIOGRAPHIE DU GEL DE POLYACRYLAMIDE 5-30% EN PRESENCE DE SDS.

REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE



Tampon de reprise des échantillons: Tris HCl 0.0625 M
glycérol 10 %
pH 6.8

FIGURE 29

vraisemblablement, provoque le clivage de certains ponts disulfure. Or, comme l'association de la LH native est décrite de nature non covalente, on peut penser que la rupture des ponts intramoléculaire déstabilise les interactions maintenant la forme dimère de la LH provoquant la dissociation et la libération des deux sous-unités α et β .

L'étude comparative à 30 minutes, 2 heures et 6 heures d'un surnageant pH 5.5 additionné de DTT par rapport à un tampon pH 7.0 enrichi en DTT dans les mêmes conditions met en évidence sans aucun doute possible l'existence d'enzymes DTT sensibles parmi les enzymes de surface du trypanosome (figure 29).

L'autoradiogramme correspondant à l'extrait antigénique pH 7.0 montre une diminution progressive du matériel radioactif qui disparaît totalement dès 2 heures d'incubation.

Ainsi, en l'absence d'antiprotéases, l'addition de dithiothréitol aux préparations trypanosomales augmente leur effet protéolytique sur la LH, il faut toutefois noter que l'effet à pH 7.0 est moins complet que celui observé à pH 5.5.

b) Addition de DTT au matériel trypanosomal préparé avec antiprotéases

Les électroautoradiogrammes de l'hormone marquée après action du matériel trypanosomal (culot et surnageant) préparé à pH 5.5 avec antiprotéases sont illustrées dans la figure 30.

En présence d'un culot cellulaire pH 5.5, dès 30 minutes d'incubation, l'hormone lutéinisante est rapidement dissociée en ses deux sous-unités libres. Les pourcentages relatifs de radioactivité montrent que 90% du marquage se situe dans la zone de poids moléculaire correspondant aux sous-unités α et β libres, alors que l'hormone native ne représente plus que 10%.

En plus des bandes radioactives α et β , une bande de faible taille moléculaire. Son intensité reste constante au cours de la cinétique d'incubation (2 heures puis 6 heures) alors que l'on observe une diminution de la radioactivité des bandes correspondantes à la sous-unité α et à la sous-unité β .

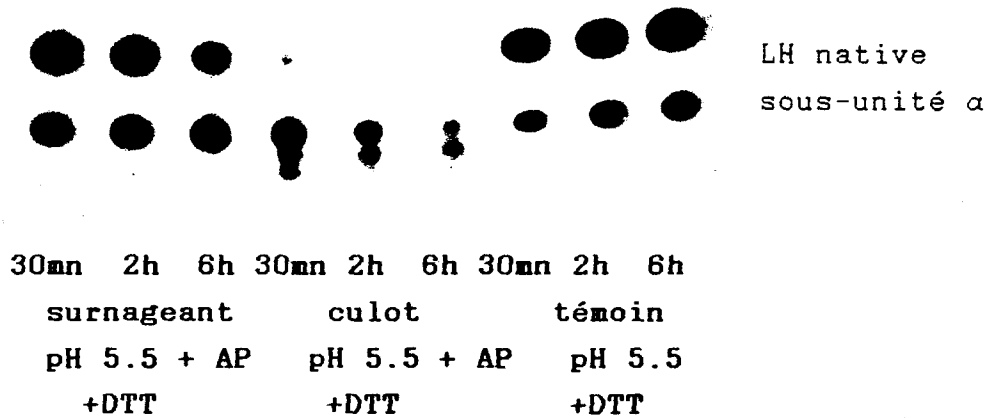
L'origine de cette entité n'est pas établie.

REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE ET PROFIL ELECTROPHORETIQUE
 DE LA LH ¹²⁵I AU COURS DE LA CINETIQUE D'INCUBATION EN
 PRESENCE D'UN MATERIEL TRYPANOSOMAL pH 5.5 AVEC
 ANTIPROTEASES (+ AP) ENRICHI EN DTT 1mM

AUTORADIOGRAPHIE DU GEL DE POLYACRYLAMIDE 5-30% EN PRESENCE DE SDS.

REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE

%	72	65	47	10	4	4	79	78	79
	28	35	49	90	53	36	21	22	21
			4		42	60			



Tampon de reprise des échantillons: Tris HCl 0.0625M
 glycérol 10 %
 pH 6.8

FIGURE 30

L'addition d'agent réducteur à la concentration finale de 1 mM augmente l'action dissociante du surnageant pH 5.5 puisqu'après 6 heures, la bande radioactive représentative de la β LH est révélée avec un pourcentage relatif de la radioactivité à 4% malgré, on le sait, la difficulté de la mise en évidence. Cette présence atteste de sa non dégradation.

L'influence éventuelle de l'agent réducteur a été étudiée (tableau XVIII). Les résultats semblent montrer d'une part que le DTT à lui seul n'a quasiment pas d'effet dissociant et d'autre part que l'addition de DTT au surnageant pH 5.5 n'augmente pas l'effet de la dissociation.

A pH 7.0, l'effet du surnageant antigénique enrichi en DTT 1mM sur l'hormone marquée est montré sur l'électroautoradiogramme illustré figure 31.

L'échantillon témoin correspondant à l'incubation de la LH 125 I en tampon phosphate enrichi en antiprotéases et en DTT possède un comportement électrophorétique identique au témoin précédant (tampon phosphate pH 7.0 plus DTT sans antiprotéases) à savoir l'apparition des deux sous-unités α et β libres au cours de la cinétique.

Comparativement à ce résultat, on constate que l'effet dissociant du surnageant antigénique pH 7.0 avec antiprotéases est plus intense. La radioactivité de l'hormone native diminue de façon accentuée au cours de la cinétique passant de 57% à 30 minutes à 10% après 6 heures alors que le marquage de sous-unité α et β s'intensifie, totalisant près de 43% à 30 minutes et 89% après 6 heures.

De la même façon nous pouvons comparer les pourcentages relatifs de radioactivité de l'hormone native par rapport à ceux obtenus dans l'expérience effectuée sans dithiothréitol (tableau XIX).

Comparativement au pH 5.5, le DTT provoque un effet dissociant non négligeable sur la LH à pH 7.0 et finalement l'addition au surnageant antigénique à pH 7.0 ne se traduit pas par une majoration significative de la dissociation engendrée par le DTT.

Au total, l'effet dissociant que l'on observe dans un surnageant antigénique pH 5.5 brut disparaît lorsqu'on amène ce même surnageant à pH 7.0. L'origine de la dissociation ne se rapproche pas d'un agent thiol réducteur.

TABLEAU XVIII

EFFET DU SURNAGEANT ANTIGÉNIQUE pH 5.5 AVEC
ANTIPROTEASES SUR LA LH ¹²⁵I EN PRESENCE OU
NON D'AGENT REDUCTEUR (DTT)

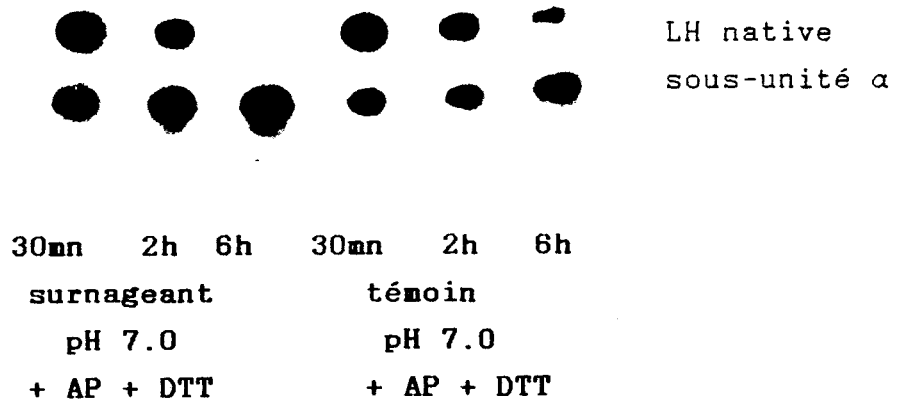
	% relatif décelé au niveau de la LH au temps	
<u>sans DTT</u>	30 min.	6 heures
témoin : tampon pH 5.5 +AP	81%	77%
surnageant antigénique pH 5.5 + AP	72%	52%
 <u>avec DTT</u>		
témoin : tampon pH 5.5 +AP	79%	79%
surnageant antigénique pH 5.5 + AP	72%	47%

REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE ET PROFIL ELECTROPHORETIQUE
 DE LA LH ¹²⁵ I AU COURS DE LA CINETIQUE D'INCUBATION EN
 PRESENCE D'UN EXTRAIT ANTIGENIQUE PH 7.0 + AP ENRICHI
 EN DTT 1mM

AUTORADIOGRAPHIE DU GEL DE POLYACRYLAMIDE 5-30% EN PRESENCE DE SDS.

REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE

z	57	38	10	66	56	26
	43	62	{90}	34	44	{74}



Tampon de reprise des échantillons: Tris HCl 0.0625 M
 glycérol 10 %
 pH 6.8

FIGURE 31

TABLEAU XIX

EFFET DU SURNAGEANT ANTIGÉNIQUE pH 7.0 AVEC
ANTIPROTEASES SUR LA LH ¹²⁵I EN PRESENCE OU
NON D'AGENT REDUCTEUR (DTT)

	% relatif décelé au niveau de la LH au temps	
<u>sans DTT</u>	30 min.	6 heures
témoin : tampon pH 7.0 +AP	82%	79%
surnageant antigénique pH 7.0 + AP	82%	72%
 <u>avec DTT</u>		
témoin : tampon pH 7.0 +AP	66%	26%
surnageant antigénique pH 7.0 + AP	57%	10%

On constate que la différence de pourcentage relatif de radioactivité de l'échantillon témoin et du surnageant antigénique avec antiprotéases à pH 7.0 est la même en présence ou en absence de dithiothéitol. Ce résultat montre que l'effet dissociant du surnageant antigénique avec antiprotéases est indépendant de la présence de l'agent réducteur.

B) DISCUSSION

Toutes ces études électrophorétiques mettent en évidence un processus de dégradation de la LH ^{125}I sous l'action des différentes préparations trypanosomales. L'intensité de réaction est différente selon les extraits parasitaires. Deux activités ont pu être décelées :

- un effet dissociant provoquant la libération des deux sous-unités libres α et β
- un effet protéolytique de qualité et d'intensité variable.

Nous avons regroupé et résumé les résultats obtenus sur extrait pH 5.5 et sur culot pH 5.5 dans le tableau XX.

L'effet dissociant de la LH est noté principalement après action de différents extraits parasitaires préparés en présence d'antiprotéases. L'action du culot pH 5.5 contribue plus activement à la destabilisation de l'édifice moléculaire de la forme dimère de la LH alors que l'effet du surnageant pH 5.5 est plus modéré. Ce dernier possède de plus, une action dissociante de qualité différente selon le pH; ainsi, nous avons pu montrer la participation plus accentuée de constituants enzymatiques, non inhibés par les inhibiteurs protéasiques, d'activité optimum à pH acide.

Dans chacune des situations (culot cellulaire, surnageant antigénique pH 5.5 et pH 7.0), l'addition d'agent réducteur augmente la dissociation de la LH native.

Or, dans cette expérience, nous avons montré que l'action du dithiothréitol possède à lui seul un effet dissociant sur la LH, notamment à pH 7.0. Dans ces conditions, l'action dissociante des extraits parasitaires amplifiée n'est pas le résultat d'un effet activateur du système enzymatique par le DTT.

TABLEAU XX

EFFET DES PREPARATIONS TRYPANOSOMALES
SUR LA LH 125I

	TEMOINS pH 5.5	TEMOINS pH 7.0	CULOT ph 5.5	SURNAGEANT pH 5.5	SURNAGEANT pH 5.5 amené à ph 7.0
-AP	LH dimère +ss unité α	LH dimère +ss unité α	LH dégradée ss unité α et β dégradées	LH dégradée ss unités α et β dégradées	LH dissociée puis dégradée
+AP	LH dimère +ss unité α	LH dimère +ss unité α	LH dissociée ss unité α dégradée	LH dimère + augment. ss unité α	LH dimère + augmentation faible de ss unité α
-AP +DDT	LH dimère +ss unité α	LH dimère +ss unités α et β	LH dégradée	LH dégradée	LH dégradée progressivement
+AP -DDT	LH dimère +ss unité α	LH dimère +ss unités α et β	LH dissociée dégradation progressive de α et β présence de produit de dégradation	LH dissociée progress. α + β	LH dissociée α + β

Enfin, l'effet protéolytique de matériels parasitaires préparés en l'absence d'antiprotéases sur la LH native ainsi que des deux sous-unités qui la composent, a été retrouvé. Ici encore, le degré de protéolyse varie selon les extraits étudiés. C'est dans le culot cellulaire pH 5.5 que l'activité est la plus intense et provoque la destruction complète de l'hormone. Selon le pH d'incubation, l'effet du surnageant pH 5.5 est modifié, on constate qu'à pH 7.0, l'efficacité de la protéolyse est moindre qu'à pH 5.5 mettant en évidence là encore, l'intervention de facteurs enzymatiques d'activité optimum à pH acide. L'addition de dithiothréitol permet cependant, d'augmenter l'effet protéolytique de la préparation antigénique qui reste de moindre efficacité que l'extrait antigénique à pH 5.5 enrichi de ce même agent réducteur.

Aussi, l'intervention de constituants enzymatiques, actifs sur l'hormone lutéinisante de rat, rend possible le développement de plusieurs hypothèses in vivo, notamment au cours de l'injection d'extraits parasitaires.

Au cours de l'injection de matériel trypanosomal préparé en présence d'inhibiteurs protéasiques, nous avons observé en ce qui concerne l'action du culot parasite pH 5.5, qu'il provoque in vivo une légère diminution de la testostéronémie ainsi que des deux stimulines sériques (LH, FSH) alors que les concentrations de gonadostimulines hypophysaires sont fortement diminuées. In vitro, nous avons montré que son effet principal sur la LH purifiée était fortement dissociant. De récents travaux (DIGHE et coll. 1979 (29), MOUGDAL et LI 1982 (103), et GRASSO et coll. 1985 (47)), ont montré qu'in vitro la sous-unité β libre est capable d'inhiber l'activité biologique de l'hCG et de la LH. On peut supposer que l'activité de la LH est altérée par l'effet dissociant du culot pH 5.5.

Le surnageant antigénique pH 5.5 et l'extrait antigénique pH 7.0 en présence d'antiprotéases dans les conditions in vitro possèdent une faible action dissociante sur la LH, les facteurs protéolytiques étant partiellement inhibés, il n'est donc pas surprenant de ne constater aucune modification significative in vivo des paramètres sériques (testostérone, LH et FSH), et hypophysaires (LH et FSH), après injection test chez le rat de ces extraits parasitaires. En ce qui concerne les faibles taux

d'oestradiol observés, il faut signaler que ces concentrations critiques doivent être maintenues pendant une période minimale d'au moins 30 heures pour induire des pics de FSH et LH (FERIN et VAN DE WIELLE 1982 (39)). L'expérimentation ici menée s'effectuant durant un délai relativement bref (5 heures), les conditions inhérentes au rétrocontrôle positif de l'oestradiol ne sont pas réunies pour induire expérimentalement une sécrétion de gonadotrophines. De plus, il a été montré qu'un pic de LH peut être induit par la diminution de l'oestradiol chez l'homme adulte à condition qu'il soit castré, car la sensibilité au rétrocontrôle positif de l'oestradiol est atténué par la testostérone (BARBARINO et coll. 1980 (8)).

Les résultats obtenus chez les rats testés avec les extraits parasitaires préparés en l'absence d'antiprotéases sont conformes, pour le culot pH 5.5, aux manipulations in vitro où il entraîne une dégradation rapide de la LH. In vivo, en effet nous avons confirmé ce résultat, les faibles taux de LH circulante conduisent à une hypostimulation de l'organe testiculaire qui se traduit par une diminution de la testostéronémie. Les concentrations élevées de LH hypophysaire sont alors régies par une boucle de contrôle positif par laquelle la testostérone est stimulateur de la synthèse de la gonadotropine.

Quant au surnageant pH 5.5 préparé en l'absence d'antiprotéases, il possède in vitro une activité protéolytique intense plus nette à pH acide qu'à pH physiologique, mais conduisant à une lyse de la majeure partie de l'hormone lutéinisante. In vivo, ce résultat est à rapprocher du dosage de la LH circulante où est confirmée la diminution de LH.

Finalement, on peut retenir de l'ensemble de ces résultats qu'au cours de l'injection expérimentale aux rats par du matériel trypanosomal, un déséquilibre endocrinien gonadique est observé en quelques heures. Il est tout à fait concevable de retenir la responsabilité d'enzymes d'origine parasitaire dans l'apparition de l'hypogonadisme, les études in vitro ayant permis de mettre en évidence une action directe d'enzyme(s) sur la LH de rat .

Cependant, il convient de rester prudent sur l'interprétation définitive de ces résultats. En effet, la présence d'antiprotéases sériques pourrait très largement limiter leur effet sauf si la

quantité d'enzymes ou la qualité de ces enzymes outrepassaient les mécanismes d'inhibition naturelle.

CONCLUSION

Les anomalies d'ordre gonadique chez les mammifères atteints de trypanosomiase ont été, depuis longtemps, observées et décrites au plan clinique alors que les mécanismes qui président à leur apparition sont encore mal connus.

Pour mieux comprendre l'origine et les modalités d'apparition de ces désordres endocriniens, nous avons dans un premier temps défini les états d'hypogonadismes chez le trypanosomé à travers l'étude de 79 sérums de sujets congolais (45 femmes, 34 hommes) trypanosomés suivis par le Service d'Epidémiologie et des Grandes Endémies de Brazzaville et 32 sérums de sujets contrôles indemmes de parasitose.

Un hypofonctionnement gonadique a pu ainsi être confirmé chez 50% des sujets trypanosomés, l'anomalie au plan biologique étant caractérisée par une diminution des taux d'hormones stéroïdiennes sexuelles circulantes (testostérone, oestradiol) sans pour cela observer une modification significative des concentrations sériques des gonadostimulines (LH, FSH).

L'exploration dynamique classique de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique a montré que les manifestations endocriniennes ne seraient ni d'origine primitive - la réponse gonadique est normale -, ni liées à une insuffisance de sécrétion hypophysaire gonadotrope - la réponse LH est significative sous LH-RH-.

Disposant d'un modèle expérimental de trypanosomiase chez le rat, nous avons exploré chez cet animal les déséquilibres gonadiques au cours d'infestations par des souches à évolution "aigüe" ou "chronique" de Trypanosoma brucei brucei. Les résultats, bien que rendus difficiles dans leur interprétation par de grandes variations individuelles en rapport avec le stress des animaux, mettent cependant en évidence que:

- la trypanosomiase "aigüe" (développée par le variant AnTat 1.1 A) chez le rat de 10 mois provoque une baisse sensible de la stéroïdogénèse et une accumulation intraglandulaire des gonadostimulines hypophysaires. Chez le rat de 45 jours seule la LH

sérique serait affectée et diminuée sans retentissement sur la valeur de la testostéronémie.

- la trypanosomiase "chronique" (développée par le variant AnTat 1.1 E) chez le rat de 10 mois provoque une baisse de la testostérone circulante et une diminution de la synthèse de LH par l'hypophyse, alors que le taux circulant de LH demeure dans les valeurs limites basses normales.

Ainsi ,Il apparaît que, sous infestation, le déséquilibre endocrinien puisse varier dans son intensité mais aussi dans son expression en fonction de l'âge de l'animal infesté et des caractéristiques biologiques de la souche parasitaire utilisée.

Ayant pu, à partir de trypanosomes multipliés sur rats, préparer des fractions représentatives de l'ensemble du matériel de surface du parasite ou, au contraire, du culot cellulaire, nous avons, par injection chez le rat, cherché à établir le rôle éventuel d'entités moléculaires parasitaires dans l'apparition du tableau d'hypogonadisme expérimental. Les réponses se sont avérées différentes lorsque les tests endocriniens étaient réalisés par injection de l'une ou l'autre des fractions et si ces dernières étaient isolées en présence ou en absence d'antiprotéases.

Dans les tests utilisant le matériel de surface isolé en présence d'inhibiteurs de protéases, on observe peu ou pas de modifications de la fonction de stéroïdogénèse gonadique. Il en va différemment en absence de ces antiprotéases. Dans ce cas, on note, en effet, une augmentation du contenu de la LH hypophysaire sans pour cela observer de retentissement significatif au niveau de la testostérone circulante.

L'injection du culot parasitaire est elle beaucoup plus riche de conséquences . L'effet est net sur les taux des paramètres sériques (testostérone, LH) qui s'effondrent. Le même résultat avec une intensité plus faible est enregistré en présence d'antiprotéases. Il apparaît donc possible, de retenir en hypothèse, que le culot parasitaire serait riche en enzymes susceptibles de dégrader les stimulines hypophysaires circulantes.

Pour tenter de répondre à cette question, une étude in vitro de l'effet des extraits parasitaires préparés en présence ou en

absence d'antiprotéases a été menée sur une préparation d'hormone lutéinisante radiomarquée. Bien que nous soyons conscients du fait que le marquage à l'iode ^{125}I soit un élément de dénaturation relative de la LH utilisée, les études électrophorétiques témoins ont permis de vérifier l'absence de remaniement important de la LH. Dans tous les tests de mise en présence de la LH avec les fractions parasitaires, un même pourcentage initial de forme dimère a été retrouvé représentant 80% de la radioactivité enregistrée sur le gel. On retiendra que les fractions (surface du parasite ou culot cellulaire) ont, en présence d'antiprotéases, un effet limité à une dissociation de la LH en ses deux sous-unités α et β ; alors qu'en absence d'antiprotéases, la LH est profondément modifiée avec disparition de la forme dimère et des sous-unités.

Enfin, l'injection de l'antigène variable purifié sous sa forme dimérique soluble chez des rats de 10 mois provoque un effondrement du taux de testostérone circulante et aussi une diminution très significative du contenu hypophysaire en LH.

Au total, l'ensemble de nos résultats nous amène à envisager plusieurs hypothèses quant au mécanismes d'apparition des dysrégulations hormonales :

1°) une action des protéases d'origine parasitaire, non inhibée par les antiprotéases circulantes du rat, et capable de provoquer la destruction de nombreuses hormones glycoprotéiques et notamment les gonadostimulines circulantes,

2°) un effet de "l'antigène variable" du trypanosome qui pourrait être une intervention de la glycoprotéine de surface au niveau d'éléments cellulaires divers impliqués par exemple, dans le contrôle immunitaire ou la régulation endocrinienne. Ce rôle pourrait être le fait de l'antigène variable "natif" ou d'éléments structuraux de plus faible taille moléculaire libérés par l'intervention de protéases parmi lesquelles, les enzymes parasitaires tiendraient une place privilégiée.

Ce mémoire n'a donc pas permis de préciser un mécanisme biologique à l'origine de l'hypogonadisme accompagnant la

trypanosomiase africaine , il a cependant amené des hypothèses qui nous conduisent à une étude approfondie des enzymes du trypanosome, à leur classement, à leur purification en vue in vivo d'observer de leurs effets et leurs participations à l'apparition de l'hypogonadisme.

De même, il apparaît très intéressant de définir le ou les domaines biologiquement actifs de l'antigène variable de surface dont on sait le rôle déterminant dans le dialogue hôte-parasite et dans l'évolution clinique de la trypanosomiase.

PLAN DE L'APPENDICE TECHNIQUE

I)METHODE D'ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE	p:161
A) <u>ELECTROPHORESES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS</u>	p:161
1)Principe	p:161
2)Technique	p:161
3) <u>Condition opératoires</u>	p:161
a)solution d'acrylamide	
b)composition des gels	
4) <u>Determination de la masse moléculaire</u>	p:163
B) <u>REVELATION AUTORADIOGRAPHIQUE</u>	p:163
1)Principe	p:163
2) <u>Condition opératoire</u>	p:163
C) <u>IMMUNOBLOTTING</u>	p:164
1)Principe	p:164
2) <u>Conditions opératoires</u>	p:164
II) DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE	p:166
A) <u>DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DIRECTE DES HORMONES STEROIDES SEXUELLES ET DES GONADOSTIMULINES SERIQUES HUMAINES</u>	p:166
1) Principe	p:166
2) Réactifs	p:166
a) Testosterone	
b) Oestradiol	
c) LH sérique	
d) FSH sérique	

3) <u>Mode opératoire</u>	p:167
a) Répartition des réactifs et incubation	
* testostérone et oestradiol	
* LH et FSH sériques	
b) Centrifugation - Elimination de surnageant - Comptage	
c) Sensibilité du dosage	
B) <u>DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUES DES GONADOTROPINES DE RAT</u>	p:168
1) <u>Préparations hormonales utilisées</u>	p:168
a) Pour le marquage	
b) Pour les courbes de référence et les contrôles de spécificité	
2) <u>Antisérums utilisés</u>	p:169
3) <u>Marquage</u>	p:169
4) <u>Préparation des échantillons à doser</u>	p:170
* hypophyse	
* serum	
5) <u>Technique de dosage</u>	p:171
C) <u>DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE LA LH-RH</u>	p:171
1) <u>Marquage du LH-RH</u>	p:171
2) <u>Antisérums</u>	p:172
3) <u>Extraits hypothalamiques</u>	p:172
4) <u>Dosage</u>	p:173
a) Expression des résultats	
b) Sensibilité des dosages	
III) <u>INCORPORATION DE PRECURSEURS RADIOACTIFS IN VITRO</u>	p:176
A) <u>MILIEUX DE SURVIE</u>	p:176
B) <u>CONDITIONS OPERATOIRES</u>	p:178
IV) <u>METHODES HISTOLOGIQUES</u>	p:179
A) <u>PREPARATION DES TISSUS</u>	p:179
1) <u>La fixation</u>	p:179
2) <u>Inclusion</u>	p:179
3) <u>Coupe</u>	p:179
4) <u>Déparaffinage</u>	p:179
5) <u>Coloration</u>	p:179

APPENDICE TECHNIQUE

I) METHODE D'ETUDE PHYSICOCHEMIE

A) ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS

1) Principe

L'électrophorèse en fonction de la masse moléculaire consiste à donner une densité de charge identique pour toutes les molécules étudiées. Ceci est obtenu en complexant les protéines avec le dodécyl sulfate de sodium (SDS) qui se fixe dans certaines conditions sur l'enchaînement peptidique lui conférant ainsi des charges négatives et ramène la séparation des molécules à une migration fonction de leur masse.

Le gradient d'acrylamide permet de plus, d'établir une relation linéaire entre la mobilité électrophorétique et le logarithme de la masse moléculaire.

2) Technique

Sur le plan expérimental, l'électrophorèse est réalisée suivant la méthode de LAEMMLI (1970)(81). Le gel de séparation 5-30% choisi est coulé entre 2 plaques de verre sur une épaisseur de 1.5 mm. Les échantillons sont déposés dans le gel à l'aide de compartiments réalisés grâce à un peigne déposé dans le gel supérieur à 5%.

La migration verticale s'effectue dans une cuve LKB 2001, sous une intensité constante réglée de 30 milliampères. Le temps d'électrophorèse est apprécié à l'aide d'un témoin coloré (bleu de bromophénol).

Après migration, le gel est démoulé puis immergé 2 heures dans un bain colorant de bleu Coomassie R, puis décoloré dans plusieurs bains successifs de solution décolorante.

3) Conditions opératoires

a) Solution d'acrylamide

Solution mère d'acrylamide : A

- acrylamide 48 g
- N.N'.méthylène bisacrylamide 1.28 g

- eau q.s.p 100 ml

Solution tampon gel à gradient : B

- Tris HCl 3 M pH 8.8

Solution tampon gel supérieur : C

- Tris HCl 1 M pH 6.8

b) Composition des gels

- composition du gel à gradient 5-30%

	solution à 5%	solution 30%
A	1.4 ml	8.4 ml
B	1.75 ml	1.75 ml
SDS 2%	0.7 ml	0.7 ml
eau distillée	10 ml	3 ml
saccharose	-	2.8 g
riboflavine 4ml/100ml	0.2 ml	0.2 ml
TEMED	15 μ l	10 μ l
persulfate d'ammonium 10%	25 μ l	10 μ l

- composition du gel supérieur à 5%

A	1 ml
C	1.25 ml
SDS 2%	0.5 ml
eau distillée	7.1 ml
riboflavine	0.2 ml
TEMED	40 μ l
persulfate d'ammonium	60 μ l

TEMED : N,N,N',N' tétraméthylènediamine

Avant dépôt, les échantillons sont dénaturés par ébullition durant 3 minutes, après dissolution dans le tampon de pH 6.8 contenant ou non un agent réducteur, le β -mercapto éthanol.

Tampon d'électrophorèse

- Tris 0.025 M
- glycofolle 0.192 M
- SDS 0.1 %

Colorant

- bleu coomassie R250 1.25 g
- éthanol 112 ml
- acide acétique 25 ml
- eau distillée 112 ml

Décolorant

- méthanol 350 ml
- acide acétique 70 ml
- eau distillée 500 ml

4) Détermination de la masse moléculaire

Un échantillon de témoin de masse moléculaire connu (kit de calibration de bas poids moléculaire Pharmacia) est déposé sur le gel dans les mêmes conditions que les échantillons et nous sert d'élément de référence.

La valeur de la masse moléculaire apparente est fonction du Rf qui est une relation de la distance de migration de la protéine rapportée à la distance de migration du front. Les valeurs enregistrées sont composées à la courbe étalon $f(Rf) = \text{Log}(MM)$

B) REVELATION AUTORADIOGRAPHIQUE

1) Principe

Un rayonnement α ou β traverse un milieu d'émulsion et provoque la précipitation des grains d'argent constituant le film photographique.

2) conditions opératoires

Préalablement à la migration électrophorétique, les échantillons radioactifs sont comptés :

- en scintillation liquide (LS 3801 Beckman)(^3H , ^{32}P)
- sur compteur gamma (LKB 1260 Multigamma II) (^{125}I)

Après migration électrophorétique des échantillons marqués au tritium, le gel de polyacrylamide est déposé dans un bain d'amplifly (Amersham) qui permet d'accroître l'intensité et la rapidité du phénomène d'impression des films sensibles.

En cas de matériel marqué ^{32}P ou ^{125}I , le gel est directement séché sous vide (Sécheur gel Bismad 1125B) sur support papier (Wathman 3) puis mis directement en contact d'un film KODAK XOMatS Les électrophorèses séchées sont stockées à -80°C en cassette PHILLIPS munie d'écran durant

- 4 heures pour les échantillons marqués ^{125}I ; ^{32}P
- 2 jours pour les échantillons marqués ^3H

La révélation des films est réalisé par passages successifs:

- 2 à 5 minutes dans un bain de révélation KODAK LX 24

- 2 minutes dans un bain d'eau désionisée
- 2 à 5 minutes dans un bain de fixateur KODAK AL 4
- rinçage à l'eau courante.

Les zones d'impression de la plaque photographique traduisent la distribution du matériel radioactif.

C) IMMUNOBLOTTING

1) Principe

Après électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose selon la méthode de VAENSSEN et coll. 1981 (135).

La membrane est mise en contact avec un immunosérum anti-VSG ou anti CRD fabriqué chez le lapin. Le complexe antigène-anticorps est mis en évidence par utilisation anticorps anti IgG de lapin marqué à la peroxydase (Institut Pasteur) et révélé par le 4-chloro 1-naphtol.

2) Conditions opératoires

Après migration électrophorétique, le SDS en excès est éliminé du gel par un bain en tampon Tris 0.025 M - glycoColle 0.192 M. Les bandes sont transférées sur nitro cellulose pendant une nuit en tampon Tris-glycoColle enrichi en méthanol à 20% sous un ampérage de 50 mA.

La membrane de nitrocellulose est ensuite rincée en tampon Tris 10 mM de pH 7.4 NaCl 0.9% pendant 15 minutes puis incubée pendant une heure à 45°C dans ce même tampon enrichi en sérum albumine bovine à 3% (fraction V pH 5.2, IBF) afin de saturer les sites aspécifiques et d'inhiber les peroxydases de la préparation. L'immunosérum spécifique dilué au 1/500 ème en tampon Tris 10 mM pH 7.4 - NaCl 0.9% - sérumalbumine 3% - sérum de veau 10% est mis en contact de la membrane. L'immunotraitement s'effectue une nuit à 20°C. Plusieurs lavages sont ensuite réalisés en tampon Tris 10 mM pH 7.4 NaCl 0.9%, puis dans le même tampon enrichi en Tween 0.1%.

Le traitement à la peroxydase s'effectue par incubation de la membrane de nitrocellulose 2 heures à 37°C en tampon Tris 10 mM pH 7.4 - NaCl 0.9% - BSA 3% contenant l'anticorps anti IgG marqué à la peroxydase en dilution finale 1/500 ème.

Une nouvelle série de rinçages est effectuée avant incubation

de la membrane dans la solution suivante :

- Tris 50 mM pH 7.6 200 ml
- 4-chloro 1 naphtol 100 mg (sigma N° C-8890)
- H₂O₂ 50 µl

II) DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE

A) DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DIRECTE DES HORMONES STEROIDES SEXUELLES ET DES GONADOSTIMULINES SERIQUES HUMAINES

Les dosages radioimmunologiques des hormones stéroïdes sexuelles issues d'échantillon sanguin humain ou de rat ainsi que les gonadostimulines circulantes humaines sont effectués de façon identique par utilisation d'une trousse commerciale.

1) Principe

Le dosage radioimmunologique direct des hormones gonadotropes dans le sérum repose sur la compétition entre l'hormone marquée à l'iode ^{125}I et l'hormone de l'échantillon à doser vis à vis d'un nombre limité de sites anticorps correspondant à l'hormone.

La quantité d'hormone marquée liée à l'anticorps est inversement proportionnelle à la quantité d'hormone non marquée présente dans l'échantillon.

2) Réactifs

a) Testostérone

Nous avons utilisé la trousse commerciale SB Testo, ORIS - Gif sur Yvette, qui contient :

- * Testostérone ^{125}I ($0.8 \mu\text{Ci} = 30 \text{KBq}$)
- * Testostérone standards : réactifs prêts à l'emploi contenant des sérums humains aux concentrations suivantes; 0 - 0.25 - 0.5 - 1 - 2.5 - 5 et 10 ng/ml.
- * Testostérone antisérum fabriqué chez le lapin
- * Réactif immunoprécipitant
- * sérum contrôle humain

b) Oestradiol

Nous avons utilisé la trousse commerciale ER 155 (BAXTER S.A, Allemagne) qui contient:

- * oestradiol ^{125}I ($2 \mu\text{Ci} = 74 \text{KBq}$)
- * oestradiol standards: réactifs prêts à l'emploi, contenant des sérums humains aux concentrations suivantes: 10, 40, 100, 400, 1000, 2000 $\mu\text{g/ml}$)
- * oestradiol antisérum fabriqué chez le lapin
- * réactif immunoprécipitant
- * sérum contrôle humain.

c) LH sérique

Utilisation de la trousse commerciale (LH-RIA 100 IRE, Belgique) qui contient:

- * LH ^{125}I ($2\mu\text{Ci} = 74\text{KBq}$)
- * LH standards: 0-0.5-1-2-5-10-20-50 ng/ml
- * LH antisérum fabriqué chez le lapin
- * réactif immunoabsorbant
- * sérum de contrôle humain.

d) FSH sérique

Utilisation de la trousse commerciale (FSH. RIA-100 IRE, Belgique) qui contient:

- * FSH ^{125}I ($2\mu\text{Ci} = 74\text{KBq}$)
- * FSH standards: 0-0.5-1-2-5-10-20-50 ng/ml
- * FSH antisérum fabriqué chez le lapin
- * réactif immunoabsorbant
- * sérum de contrôle humain

3) Mode opératoire

a) Répartition des réactifs et incubation

* **testostérone et oestradiol**

groupe de tubes	standards	échantillons	hormone ^{125}I		Antisérum	
			(Tes	E2)	(Tes	E2)
T	-	-	200	100	-	-
standards	50	-	200	100	200	100
échantillons à doser	-	50	200	100	200	100

Tes= TESTOSTERONE

E2 = OESTRADIOL

Les volumes sont exprimés en μl .

Les tubes sont agités manuellement durant 20 secondes puis incubés 2 heures 30 minutes à 24 heures à 37°C .

Tous les tubes sauf ceux du groupe T réservés à la détermination de la radioactivité totale sont additionnés de réactif précipitant (1 ml pour dosage de la testostérone - 500 μl pour dosage de l'oestradiol) puis incubés 15 minutes à température ambiante.

*** LH et FSH sériques**

groupe de tubes	standards	échantillons	gonadostimulines: 125I (LH ou FSH)	Antisérum
T	-	-	100	-
standards	100	-	100	100
échantillons à doser	-	100	100	100

Les tubes sont agités manuellement puis incubés 18 à 24 heures à température ambiante.

Tous les tubes sauf ceux du groupe T sont additionnés de 100 µl de réactif immunoabsorbant puis agités et incubés 20 minutes à température ambiante.

3ml de tampon phosphate 0.05 M pH 7.5 enrichi en Tween 0.6% sont additionnés à chaque tube à l'exception des tubes appartenant au groupe T.

b) Centrifugation - Elimination de surnageant - Comptage

Après incubation, les tubes sont centrifugés à 1500 g pendant 15 minutes. Le surnageant est éliminé. La mesure de la radioactivité présente dans le culot est comptée sur 60 secondes à l'aide d'un compteur gamma (LKB Rack Gamma).

c) Sensibilité du dosage

La sensibilité de la méthode a été évaluée par le fournisseur à

- * 80 ± 9 pg/ml pour la testostérone
- * 5.2 pg/ml pour l'oestradiol
- * 0.26 ± 0.03 ng/ml pour FSH
- * 0.25 ± 0.07 ng/ml pour LH

B) DOSAGES RADIOIMMUNOLOGIQUES DES GONADOTROPHINES DE RAT

Le principe du dosage radio-immunologique est fondé sur la compétition d'une hormone marquée et d'une hormone "froide" pour se fixer à un anticorps spécifique. Une quantité constante d'hormone marquée étant introduite, le pourcentage de la radioactivité fixée permet de connaître la quantité d'hormone "froide" contenue dans l'échantillon à doser.

1) Préparations hormonales utilisées

a) Pour le marquage

Ces préparations proviennent du NIDDK (National Institute of

Diabetes and Digestive and Kidney Diseases) Maryland, U.S.A.

Il s'agit de:

* la NIDDK rat: FSH I₈ possédant une activité biologique de 100 x NIH.FSH.S₁. La contamination en prolactine (Prl) et rGH est inférieure à 0.1%

* la NIDDK rat LH I₈ dont l'activité biologique est de 0.9 x NIH LH S₁.

La contamination en rFSH, rTSH, rGH et rPrl est inférieure à 0.1%.

b) Pour les courbes de référence et les contrôles de spécificité

* la NIDDK rat FSH RP₁ (activité biologique: 2.1 x NIDDK rat FSH S₁). Contamination en LH 0.02 x NIDDK LH S₁

* la NIDDK rat FSH RP₂ (activité biologique: 45 x NIDDK rat FSH RP₁)

* la NIDDK rat LH RP₂ (activité biologique: 61 x NIDDK rat LH RP₁).

2) Antisérums utilisés

* Le NIDDK anti rat FSH sérum 11, préparé chez le lapin, utilisé dans nos dosages à la dilution finale de 1/125000 dans le tampon Phosphate 0.01 M - EDTA

* Le NIDDK anti rat LH sérum 10, préparé chez le lapin, utilisé à la dilution finale de 1/180000.

3) Marquage

2.5 µg de NIDDK rat FSH I₈ sont marqués au ¹²⁵I Na (IMS 30 Amersham) selon une adaptation de la méthode à la chloramine T de GREENWOOD et coll. 1965 (49), dont les modalités sont les suivantes:

- à 25 µl d'¹²⁵I Na d'activité 0.5 mCi (18500 KBq) sont ajoutés:

- 2.5 µg de l'hormone à marquer diluée dans 25 µl d'eau

- 25 µl de tampon phosphate 0.5 m% tampon de SORENSSEN de pH 7.5 et de composition :

KH ₂ PO ₄	3.75 g
Na ₂ HPO ₄	38.95 g
H ₂ O	500 ml qsp

- 25 µl d'une solution phosphate 0.05 M (dilution au 1/10^{ème} du tampon SORENSEN) contenant 10 µg de chloramine T.

L'addition de chloramine T à une solution alcaline de protéine et d'iodure va oxyder l'iode et permettre ainsi son incorporation sur les noyaux tyrosyles de la protéine. La réaction s'effectue à pH 7.5 durant 30 secondes sous agitation.

La réaction est stoppée par addition de 100 µl de solution réductrice de métabisulfite de sodium (0.3 mg Na₂S₂O₅/ml de tampon phosphate 0.05 M).

Le produit de la réaction est ensuite dilué par addition de 200 µl d'une solution de iodure de potassium (10 mg KI/ml de tampon phosphate 0.05 M).

L'hormone marquée est séparée des sels radioactifs par chromatographie gel filtration sur Séphadex G50 équilibrée en tampon barbital sodique 0.07 M de pH 8.6 obtenu par dilution dans H₂O (7:3 V/V) du tampon barbital sodique 0.1 M:

C₈H₁₁N₂NaO₃ : 20.6 g
H₂O : 1000 ml qsp

La colonne est saturée par 20 mg d'albumine bovine en solution dans 1 ml de tampon barbital puis rincée par 3 volumes de colonne de tampon afin d'éliminer l'albumine en excès.

Les fractions sont récoltées ml par ml dans des tubes contenant chacun 1 ml de BSA à 5% dans le tampon barbital.

L'hormone est éluée en début de chromatographie

4) Préparations des échantillons à doser

* hypophyses

Après décongélation, les hypophyses sont homogénéisées individuellement au POTTER-ELVEHJEM dans 500 µl de tampon phosphate de sodium 0.01 M pH 7.5 :

- phosphate de sodium 0.01 M
- NaCl 0.15 M
- bacitracine 0.02 mM
- azide de Na 0.1 %
- EDTA 0.01 M

Le potter est rincé par 500 µl de ce même tampon. L'extrait

hypophysaire est ensuite centrifugé 10 minutes à 2500 g. 10 µl de surnageant sont prélevés et complétés à 2ml par addition du tampon phosphate 0.01 M sans EDTA, cette solution est fractionnée en 20-50-100 µl. Chaque préparation est ensuite amenée à un volume final de 100 µl par addition de tampon phosphate 0.01 M sans EDTA pH 7.5. Chaque tube reçoit ensuite 200 µl de tampon phosphate 0.01 M pH 7.5 enrichi d'albumine bovine à raison de 5 g/l.

*** sérums**

Les sérums sont décongelés puis répartis en deux échantillons de 100-200 µl qui sont ensuite dilués en tampon phosphate 0.01 M pH 7.5 sous un volume final de 300 µl.

5) Technique de dosage

A 0.1 ml d'hormones de références ou d'extraits hypophysaires ou d'échantillons sanguins à différentes concentrations sont ajoutés 0.1 ml d'antisérum dilué. L'incubation s'effectue durant 4 heures à température ambiante puis sont ajoutés: 0.1 ml d'hormone marquée diluée (environ 10 000 cpm) (temps d'incubation de 24 heures à température ambiante ou 48 heures à 4°C) puis, 50 µl de sérum de lapin normal diluée au 1/50^{ème} dans le tampon phosphate 0.01 M EDTA, et 50 µl d'antigammaglobuline de lapin diluée au 1/5^{ème} également dans le tampon phosphate 0.01 M. L'incubation s'effectue durant 24 heures à température ambiante ou 48 heures à 4°C). Le précipité de chaque tube est lavé par 3ml de tampon phosphate 0.01M. Les tubes sont ensuite centrifugés 15 minutes à 2500 g. Le surnageant est enlevé par aspiration, la radioactivité du précipité est comptée.

C) DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DU LH-RH

1) Marquage du LH-RH

Le marquage de la gonadolibérine commerciale (SERVA) s'effectue

selon le protocole suivant:

- 25 μ l d' 125 INa (0.5 mCi)
- 5 μ g de LH-RH dans 10 μ l de tampon phosphate 0.05 M
- 25 μ l de tampon phosphate SORENSEN pH 7.5 0.5 M
- 30 μ g de chloramine T dans 25 μ l de tampon phosphate 0.05 M.
temps de réaction sous agitation: 20 secondes
- arrêt de la réaction par 80 μ g de métabisulfite de sodium dans 25 μ l de tampon phosphate 0.05 M
- dilution puis rinçages de la fiole de réaction par une solution d'iode de potassium (10 mg KI/ml de tampon phosphate 0.05 M); 3 fois 50 μ l.

La préparation est déposée sur une colonne de QAE-séphadex A25 (16cmx1cm;3g de gel) équilibrée dans le tampon borate 0.1 M(pH9.2)

- H_3BO_3 0.2 M 4 ml
- $Na_2B_4O_7, 10 H_2O$ 0.05 M 16 ml
- gélatine 1 pour mille

La chromatographie sur résine d'échangeuses d'anions permet de séparer les 3 produits de la réaction:

- LH-RH non marqué, élué rapidement de la colonne
- LH-RH monoiodé
- LH-RH diiodé, d'avantage retenu sur la colonne

Les différences de migration sont suffisantes pour isoler quelques fractions de LH-RH monoiodé peu contaminées.

2) Antisérums

Les immunsérums anti LH-RH sont préparés au laboratoire INSERM U 156 par immunisation de lapins contre la molécule de LH-RH couplée à la sérum albumine humaine (HSA).

3) Extraits hypothalamiques

Les hypothalamus sont congelés à $-20^{\circ}C$ dans 200 μ l HCl 0.1 N

Après décongélation, 300 µl d'HCl 0.1 N sont ajoutés. Le tissu hypothalamique est broyé à 4°C au POTTER-ELVEHJEM. La préparation est neutralisée par addition de NaOH 1N. L'ensemble est ensuite centrifugé 10 minutes à 2500 g. Le surnageant est réparti en 2 fractions de 100 et 200 µl pour les dosages radioimmunologiques.

4) Dosage

Les extraits tissulaires sont complétés à 200 µl avec du tampon de dosage pH 7.5 de composition:

- phosphate	0.01 M	- EDTA	0.01 M
- NaCl	0.15 M	- Bacitracine	2.10^{-5} M
- NaN ₃	0.1%	- HSA	0.1 %

- 0.1ml d'antisérum anti LH-RH dilué au préalable à 1/16000^{ème} dans un tampon phosphate 0.01M sont ajoutés, suivi d'une agitation brève et d'une préincubation de 4 heures à température ambiante

- 0.1 ml de LH-RH marqué (8000-10000 cpm) sont additionnés, agitation brève puis incubation de 24 heures à température ambiante ou 48 heures à 4° C

- 50 µl de sérum de lapin normal dilué au 1/50^{ème} et 50 µl d'antigammaglobuline de lapin diluées au 1/5^{ème} sont ensuite ajoutés avant incubation de 24 heures à température ambiante ou 48 heures à 4°C.

Chaque tube est additionné de 3ml de tampon phosphate 0.01 M pH 7.5 sans HSA et centrifugé 10 minutes à 2500 g. Le surnageant est aspiré et la radioactivité du précipité est comptée.

a) Expression des résultats

La concentration de l'échantillon est calculée par comparaison à la courbe standard. Les modifications du pourcentage d'hormone marquée fixée aux anticorps en présence d'hormone froide sont exprimées par le rapport: $(B / B_0) \times 100$

- B_0 représente la radioactivité liée aux anticorps en l'absence de toute hormone "froide"
- B représente la radioactivité liée aux anticorps en présence de x ng d'hormone "froide"

La courbe d'étalonnage est obtenue en portant B/B_0 en fonction des concentrations standards.

b) Sensibilité des dosages

Méthode de calcul du coefficient de variation:

- La moyenne \bar{X} = somme des valeurs de x divisée par le nombre n d'échantillons : $\bar{X} = \sum x/n$
- écart d'une valeur à la moyenne : $X - \bar{X}$
- la variance S^2 (estimation de la variance σ^2 théorique)
$$S^2 = \sum x^2 / n - 1 \text{ (nombre de degrés de liberté)}$$
- l'écart type ou déviation standard S (estimation σ): $S = \sqrt{S^2}$
- erreur standard à la moyenne $S_m = S / \sqrt{n}$

On peut alors définir l'intervalle de confiance à 5% de risque ($p=0.05$), par la méthode du test-t de STUDENT-FISHER pour comparer deux séries de mesures A et B :

$$S^2 = \frac{(n_A - 1)S^2_A + (n_B - 1)S^2_B}{n_A + n_B - 2} \text{ (nombre de degrés de liberté)}$$

n_A = nombre d'échantillons (série A) S^2_A = variance de la série A

n_B = nombre d'échantillons (série B) S^2_B = variance de la série B

$$t = \frac{(\bar{X}_A - \bar{X}_B) \sqrt{(n_A n_B) / (S^2 (n_A + n_B))}}{\sqrt{S^2}}$$

\bar{X}_A et \bar{X}_B représentent la moyenne de chacune des 2 séries.

Soit la valeur $t = 0.05$ pour $(n-1)$ degrés de liberté (lue sur la table de FISHER et YATES) (tableau XXI) on assigne à la moyenne inconnue μ l'intervalle de confiance à 5% : $\bar{X} \pm t \times S_m$

La diminution est dite "significative" si la probabilité pour que B soit identique à A n'est pas supérieure à 5% ($P \leq 0.05$).

TABLEAU XXI

TABLE DE t (D'APRES FISCHER ET YATES)

d.d.l. \ P	0,90	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,158	1,000	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619
2	0,142	0,816	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,598
3	0,137	0,765	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924
4	0,134	0,741	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	0,132	0,727	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,131	0,718	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,130	0,711	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,130	0,706	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,129	0,703	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,129	0,700	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,129	0,697	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,695	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,694	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,692	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,691	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,690	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,689	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,127	0,688	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,688	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,687	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,686	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,127	0,686	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,685	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767
24	0,127	0,685	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,684	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,127	0,684	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,684	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690
28	0,127	0,683	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,127	0,683	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659
30	0,127	0,683	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
∞	0,126	0,674	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291

III) INCORPORATION DE PRECURSEURS RADIOACTIFS IN VITRO

A) Milieux de survie

En fonction des travaux de HIRUMI et coll. 1977 (54) et BRUN et coll. 1979 (15) plusieurs conditions de culture "in vitro" des trypanosomes ont été élaborées selon la nature des précurseurs radioactifs.

Le milieu de survie, adopté au laboratoire, est fondé sur la composition du milieu RPMI 1640 commercial (MOORE 1970 (99)). La composition détaillée du milieu figure dans le tableau XXII.

TABLEAU XXII

MILIEUX DE BASE

COMPOSITIONS EN SELS	mg/l de milieu	AMINO ACIDE DE MILIEU EAGLE	mg/l de milieu
CaCl ₂	200	L-arginine HCl	21
KCl	400	L-cystine	12
MgSO ₄ 7H ₂ O	100	L-histidine	8
NaCl	6000	L-isoleucine	26
NaHCO ₃	2000	L-lysine	29
NaH ₂ PO ₄	80	L-methionine	7.5
<hr/>		L-phénylalanine	16.5
VITAMINES DE MILIEU DE BASE EAGLE	mg/l de milieu	L-thréonine	74
Biotine	1	L-tryptophane	18
chlorure de choline	1	L-valine	23.5
acide folique	1	L-proline	1000
inositol	1.8	<hr/>	
nicotinamide	1	AUTRES COMPOSANTS	
D-Ca-pantothénale	1	glucose	20 g/l
Pyridoxal Hcl	1	rouge de phénol	50 mg/l
Riboflavine	0.1	streptomycine	500.10 ³ UI/l
thiamine Hcl	1	penicilline	500 mg/l
		glutamine	0.3 g/l

Suivant le radioisotope incorporé, ce milieu est sensiblement modifié tout en respectant une valeur de pH comprise entre 7.2 et 7.4 (tableau XXIII).

TABLEAU XXIII

MODIFICATION DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE
SURVIE EN FONCTION DES RADIOISOTOPES

	INCORPORATION DE MyrH ³ /PalmitateH ³ /Oléate H ³	INCORPORATION de Gal H ³	INCORPORATION de P ³²
sels	+	+	absence NaH ₂ PO ₄ substitué par 80 mg/l NaCl
vitamines	+	+	+
amino acides	+	+	+
autres composants	+	glucose à 0.2 g/l	+
sérum albumine bovine déli- pidée	1 g/l	-	-
sérum albumine	-	-	1 g/l
sérum de veau foetal	-	10%	-

Ce milieu suffit à une survie de 75.10⁶ trypanosomes par ml. L'incorporation "in vitro" s'effectue en flacon de culture de 25ml à 30°C sous agitation douce. Après incorporation du radioisotope sélectionné, la suspension parasitaire est maintenue à 4°C afin de stopper le métabolisme cellulaire.

Une centrifugation à 1500 g durant 5 minutes livre le culot parasitaire. Deux lavages par un tampon isotonique (TDB) de pH 7.4 sont ensuite effectués

- KCl 5 mM
- NaCl 80 mM
- MgSO₄, 7H₂O 1 mM
- Na₂HPO₄ 20 mM
- NaH₂PO₄ 2 mM
- glucose 10 mM

IV) METHODE IMMUNOHISTOCHIMIQUE

A) PREPARATION DES TISSUS

1) La fixation

Les testicules sont fixés 3 à 4 jours dans un mélange de BOUIN aqueux ordinaire sans acide acétique:

- 75 ml de solution aqueuse saturée d'acide picrique
- 25 ml de formaldéhyde 37%

2) Inclusion

Après rinçage à l'eau courante les pièces sont déshydratées par l'alcool éthylique, imprégnées par du toluène puis placées dans de la paraffine à 60°C selon la technique histologiques classique

3) Coupe

Le bloc de paraffine refroidi est coupé au microtome en coupes de 3 à 6 µm d'épaisseur. Les coupes sont étalées et collées sur lame par de la colle albumineuse.

4) Déparaffinage

Le déparaffinage s'effectue de la manière suivante:

- toluène : 3 bains de 15 minutes
- alcool 95° : 3 bains de 5 minutes
- alcool 70° : 5 minutes
- rinçage à l'eau courante jusqu'au blanchissement des coupes
- rinçage à l'eau distillée

5) Coloration

Les lames sont colorées à l'hématéine de Masson pendant 5 min. selon la technique de GABE et coll. (1968)(42).Après rinçage à l'eau distillée, les coupes sont ensuite placées dans de l'érythrosine en solution à 1% avec un contact de 10 min. La lame est à nouveau rincée à l'eau distillée puis colorée par une solution de vert FCF à 0.1 %. Les lames sont ensuite deshydratées et montées à l'EUKITT (PROLABO)

FIGURES

- 1-CYCLES EVOLUTIFS DES TRYPANOSOMES AFRICAINS
- 2-APPARITION DES DIFFERENTS VARIANTS AU COURS D'UNE INFESTATION CHRONIQUE
- 3-TAUX MENSUELS DE PROGESTERONE ET 17- β OESTRADIOL CHEZ DES CHEVRES INFESTEES ET NORMALES
- 4-SCHEMA ANATOMIQUE ET VASCULARISATION DE L'HYPOPHYSE
- 5-REGULATION DE L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-GONADOTROPE
- 6-SEQUENCE AMINOACIDE DE LA SOUS UNITE α DES GLYCOPROTEINES HORMONALES
- 7-DEGRE D'HETEROGENEITE DES SOUS UNITES α DES LH,FSH,hCG HUMAINES DANS LA REGION N-TERMINALE
- 8-SEQUENCE AMINO ACIDE DE LA SOUS UNITE β DES GLYCOPROTEINES HORMONALES
- 9-STRUCTURES ET REPARTITIONS DES N-GLYCANNES DESIALYLES OU SULFATES DES GLYCOPROTEINES HYPOPHYSAIRES BOVINES (b) OVINES (o) ET HUMAINES (h)
- 10-STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE LA SOUS UNITE α DES GLYCOPROTEINES HORMONALES HUMAINES
- 11-MODELE HYPOTHETIQUE DU ROLE DES CHAINES GYCANNIQUES DES GONADOTROPINES DANS LA TRANSDUCTION MEMBRANAIRE DU SIGNAL HORMONAL
- 12-CLONAGE DU VARIANT AnTat 1.1 A DE T.b.brucei
- 13-PROFIL D'UNE PARASITEMIE AIGUE DEVELOPPEE PAR T.b.brucei VARIANT AnTat 1.1 A MULTIPLIE SUR SOURIS
- 14-VARIATION DES TAUX HORMONAUX CHEZ LE RAT INFESTE EN FONCTION DE L'AGE
- 15-CLONAGE DU VARIANT AnTat 1.1 E DE T.b.brucei
- 16-EVOLUTION DE LA PARASITEMIE CHRONIQUE DEVELOPPEE PAR T.b.brucei VARIANT AnTat 1.1 E
- 17-COMPARAISON D'UNE SOUCHE AIGUE ET CHRONIQUE CHEZ LE RAT AGE DE 10 MOIS (EFFET SUR LA TESTOSTERONE, LA LH SERIQUE ET HYPOPHYSAIRE)

- 18-COMPARAISON D'UNE SOUCHE AIGUE ET CHRONIQUE CHEZ LE RAT AGE DE 45 JOURS (EFFETS SUR LA TESTOSTERONE, LA LH SERIQUE ET HYPOPHYSIAIRE)
- 19-SCHEMATISATION DE LA STRUCTURE C-TERMINALE DE L'ANTIGENE VARIABLE
- 20-SCHEMATISATION DE LA BIOSYNTHESE ET DU PROCESSING DU VSG
- 21-VARIATION DES TAUX DE TESTOSTERONE, DE LH SERIQUE ET HYPOPHYSIAIRE APRES 5 HEURES D'ACTION D'UN MATERIEL TRYPANOSOMAL PH5.5 PREPARE AVEC OU SANS ANTIPROTEASES
- 22-PROFIL ELECTROPHORETIQUE DES FRACTIONS ANTIGENIQUES PURIFIEES SUR COLONE DE CONCANAVALINE A SEPHAROSE
- 23-REVELATION IMMUNOLOGIQUE DES FRACTIONS ANTIGENIQUES PURIFIEES F3, F4 VIS A VIS D'UN IMMUNSERUM DRESSE A PARTIR DE LA FRACTION F2 (AnTat 1.1)
- 24-ETUDE ELECTROPHORETIQUE DE LA LH 125I PURIFIEE ET ENREGISTREMENT DENSITOMETRIQUE DE LA REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE
- 25-REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE ET PROFIL ELECTROPHORETIQUE DE LA LH 125I AU COURS DE LA CINETIQUE D'INCUBATION EN PRESENCE D'UN CULOT PH5.5 AVEC OU SANS ANTIPROTEASES (\pm AP)
- 26-REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE ET PROFIL ELECTROPHORETIQUE DE LA LH 125I AU COURS DE LA CINETIQUE D'INCUBATION EN PRESENCE D'UN EXTRAIT ANTIGENIQUE PH 5.5 AVEC OU SANS ANTIPROTEASES(\pm AP)
- 27-REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE ET PROFIL ELECTROPHORETIQUE DE LA LH125I AU COURS DE LA CINETIQUE D'INCUBATION EN PRESENCE D'UN EXTRAIT ANTIGENIQUE PH 7.0 AVEC OU SANS ANTIPROTEASES (\pm AP)
- 28-ELECTROAUTORADIOGRAMME DE LH 125I EN PRESENCE D'UN MATERIEL TRYPANOSOMAL PH 5.5 SANS ANTIPROTEASES ENRICHIS EN DTT 0.1mM
- 29-REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE ET PROFIL ELECTROPHORETIQUE DE LA LH125I AU COURS DE LA CINETIQUE D'INCUBATION EN PRESENCE D'UN EXTRAIT ANTIGENIQUE PH 7.0 -AP ENRICHIS EN DTT 0.1mM

30-REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE ET PROFIL ELECTROPHORETIQUE
DE LA LH 125I AU COURS DE LA CINETIQUE D'INCUBATION EN
PRESENCE D'UN MATERIEL TRYPANOSOMAL PH 5.5 AVEC
ANTIPROTEASES (+ AP) ENRICHI EN DTT 0.1mM

31-REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE ET PROFIL ELECTROPHORETIQUE
DE LA LH 125I AU COURS DE LA CINETIQUE D'INCUBATION EN
PRESENCE D'UN MATERIEL TRYPANOSOMAL PH 7.0 AVEC
ANTIPROTEASES (+ AP) ENRICHI EN DTT 0.1mM

TABLEAUX

- I-SCHEMA SIMPLIFIE DE LA CLASSIFICATION DES TRYPANOSOMATIDAE
- II-MODIFICATIONS TESTICULAIRES DE SOURIS INFESTEES PAR Trypanosoma brucei
- III-VARIATION DES TAUX DE TESTOSTERONE PLASMATIQUE DES BELIERS INFESTES PAR Trypanosoma b. congolense
- IV-TAUX PLASMATIQUES DE FSH ET LH CHEZ DES SUJETS TEMOINS ET DE PATIENTS ATTEINTS DE LA MALADIE DU SOMMEIL OU EN VOIE DE GUERISON
- V-DOSAGE DE LA PROLACTINE DANS 6 SERUMS DE FEMMES TRYPANOSOMEES
- VI-BILAN ENDOCRINIEN DE BASE DES RATS AGES DE 10 MOIS INFESTES OU NON PAR T.b.brucei AnTat 1.1 A
- VII-DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE LA LH-RH DES ANIMAUX SAINS ET PARASITES
- VIII-BILAN ENDOCRINIEN DE BASE DE RATS JEUNES INFESTES OU NON PAR T.b.brucei VARIANT AnTat 1.1 A
- IX-BILAN ENDOCRINIEN DE BASE DES RATS AGES DE 10 MOIS SAINS ET PARASITES PAR UNE SOUCHE CHRONIQUE DE T.b.brucei VARIANT AnTat 1.1 E
- X-BILAN ENDOCRINIEN DE BASE DES RATS AGES DE 10 MOIS SAINS ET PARASITES PAR UNE SOUCHE CHRONIQUE DE T.b.brucei VARIANT AnTat 1.1 E (suite)
- XI-BILAN ENDOCRINIEN DE BASE DES RATS AGES DE 45 JOURS SAINS ET PARASITES PAR UNE SOUCHE CHRONIQUE DE T.b.brucei VARIANT AnTat 1.1 E
- XII-BILAN ENDOCRINIEN DE BASE DES RATS AGES DE 45 JOURS SAINS ET PARASITES PAR UNE SOUCHE CHRONIQUE DE T.b.brucei VARIANT AnTat 1.1 E (suite)
- XIII-TAUX HORMONAUX DES RATS SAINS ET RATS INOCULES AVEC LE CULOT PARASITAIRE PREPARE EN PRESENCE D'ANTIPROTEASES

XIV-TAUX HORMONAUX DES RATS SAINS ET RATS INOCULES AVEC LE SURNAGEANT PH 5.5 PREPARE EN PRESENCE D'ANTIPROTEASES

XV-DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DES HORMONES (TESTOSTERONE, LH SERIQUE, LH HYPOPHYSIAIRE) CHEZ LES ANIMAUX TEMOINS (PBS PH 7.25) ET CHEZ LES ANIMAUX INOCULES AVEC LE CULOT PH 5.5 SANS ANTIPROTEASES

XVI-DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DES HORMONES (TESTOSTERONE, LH SERIQUE, LH HYPOPHYSIAIRE) CHEZ LES ANIMAUX TEMOINS (TAMPON PH 5.5) ET CHEZ LES ANIMAUX INOCULES AVEC L'EXTRAIT ANTIGENIQUE PH 5.5 SANS ANTIPROTEASES

XVII-DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DES HORMONES DES RATS TEMOINS (TAMPON PH 5.5) ET DES RATS INOCULES AVEC LES FRACTIONS ANTIGENIQUES PURIFIEES

XVIII-EFFET DU SURNAGEANT ANTIGENIQUE PH 5.5 AVEC ANTIPROTEASES SUR LA LH 125I EN PRESENCE OU NON D'AGENT REDUCTEUR (DTT)

XIX-EFFET DU SURNAGEANT ANTIGENIQUE PH 7.0 AVEC ANTIPROTEASES SUR LA LH 125I EN PRESENCE OU NON D'AGENT REDUCTEUR (DTT)

XX-EFFETS DES PREPARATION TRYPANOSOMALES SUR LA LH 125I

XXI-TABLE DE t

XXII-MILIEUX DE BASE POUR LA SURVIE DES TRYPANOSOMES

XXIII-MODIFICATION DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE SURVIE EN FONCTION DES RADIOISOTOPES

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ANOSA, V.O. (1983)
Diseases produced by Trypanosoma vivax in ruminants, horses and rodents

Zbl.vet.Med. B30 717-747
- 2 - ANOSA, V.O. and ISOUN T.T. (1980)
Further observations on the testicular pathology in Trypanosoma vivax infection of sheeps and goats.
Rest.Vet.Sci 18 151-160
- 3 - ANOSA, V.O. and KANEKO J.J. (1984)
Pathogenesis of Trypanosoma brucei infection in deermice (peromyscus maniculatus). Light and electron microscopic study of testicular lesions

Vet. Path. 21 233-246
- 4 - APTED, P.I.C. (1970)
Clinical manifestation and diagnosis of sleeping sickness.

In : the african Trypanosomiasis
Mulligan EW, Potts WH (Eds) London. Allen and Unwin 661-683
- 5 - AUFFRET, C.A. and TURNER, M.J. (1981)
Variant specific antigens of trypanosoma brucei exist in solution as glycoprotein dimers

Biochem.J. 193 647-650.
- 6 - BALTZ, T., BALTZ, D. and PAUTRIZEL, R. (1976)
Affinité de la Concanavoline A pour trypanosoma equiperdum. Applications à l'isolement de la fraction glycoprotéique spécifique du type antigénique.

Ann.Immunol.(Institut Pasteur). 127c 761-774
- 7 - BANGS, J.D., HERELD, D., KRAKOW, J.L, HART, G.W and ENGLUND, P.T. (1985)
Rapid processing of the carboxyl terminus of a trypanosome variant surface glycoprotein.
Proc.Natl. Acad. Sci. 82 3207-3211
- 8 - BARBARINO, A. and DEMARINIS, L. (1980)
Estrogen induction of LH release in castrated adult human males.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 51 280-

- 9 - BELCHETZ, P.E., PLANT, T.M., NAKAI, Y., KEOGH, E.J. and KNOBIL, E.
(1978)
Hypophyseal response to continuous and intermittent delivery
hypothalamic GnRH.
Science 202 631-
- 10 - BLUM, W.F.P., RIEGELBAUER, G. and GUPTA, D. (1985)
Heterogeneity of rat FSH by chromatofocusing : studies on in
vitro bioactivity of pituitary FSH forms and effect of
neuraminidase treatment.
J.Endocr. 105 17-27
- 11 - BOID, R., MAHMOUD, M.M. and GRAY, A.R. (1980)
Changes in the levels of some enzymes in dromedary camels
infected with trypanosoma evansi.
Res.Vet.Sci. 28 336-340.
- 12 - BOOTHBY, M., RUDDON, R.W., ANDERSON, C., MAC WILLIAMS, D. and
BOIME, I. (1981)
A single gonadotropin alpha- subunit gene in normal tissue
and tumor derived cell lines
J.Biol.Chem. 256 5121-5128
- 13 - BOOTHROYD, J.C., PAYNTER, C.A., CROSS, G.A.M., BERNARDS, A. and
BORST, P. (1981)
Variant surface glycoproteins of trypanosoma brucei are
synthesized with cleavage hydrophobic sequences at the
carboxyl and amino termini.
Nucl.Acids.Res. 9 4735-4743.
- 14 - BOREHAM, P.F.L. (1979)
The pathogenesis of african and american trypanosomiasis.
In Biochemistry and Physiology of Protozoa
Vol2 (Ed.M.LEVANDOWSKY and S.H. HUNTER) N.Y and LONDON
Academic Press. 429-457.
- 15 - BRUN, R. and JENNI, L. (1977)
A new semi-defined medium for Trypanosoma brucei spp.
Acta.Trop. 34 21-33
- 16 - CARDOSO DE ALMEIDA, M.L. and TURNER, M.J. (1983)
The membrane form of variant surface glycoproteins of
Trypanosoma brucei.
Nature 302 349-352

- 17 - CARMEL, P.W., ARAKI, S. and PERIN, M. (1976)
Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys:
evidence for pulsatile release of gonadotropin-releasing
hormone (GnRH)
Endocrinology, 99 243-
- 18 - CHOU, P.Y. and FASMAN, G.D. (1978)
Empirical predictions of conformation.
Ann.Rev.Biochem. 47 251-276.
- 19 - CHUNG, D., SAIRAM, M.R. and LI, C.H. (1973)
The primary structure of ovine interstitial cell-stimulating
hormone III : disulfide bridges of the alpha-subunit
Arch.biochem.Biophys. 159 678-682
- 20 - CLARKE, M.W., OLAFSON, R.W. and PEARSON, T.W. (1985)
Rapid preparative scale purification of myristylated variant
surface glycoprotein from african trypanosomes.
Mol.Biochem. 17 19-34.
- 21 - COMBARNOUS, Y. (1988)
Relations structure-activité des gonadotropines
Coll.Soc.Fr.Etudes.Fertil. 26 5-24
- 22 - COMBARNOUS, Y. and HENGE, M.H. (1981)
Equine follicle-stimulating hormone. Purification, acid
dissociation and binding to equine testicular tissue.
J.Biol.Chem. 256 9567-9572
- 23 - COMBARNOUS, Y. and HENNEN, G. (1974)
The disulfide bridges of porcine Luteinizing hormone alpha-
subunit.
Biochem.Soc.Trans. 2 915-917
- 24 - CONN, P.M. , STALEY, D. , HARRIS, C. , ANDREWS, W.G. , GOROSPE, W.C. ,
Mc ARDLE, C.A. , HUCKLE, W.R. and HANSEN, J. (1986)
Mechanism of action of gonadotropin releasing hormone.
Ann.Rev. 48 495-513.
- 25 - CORNELL, J.S. and PIERCE, J.G. (1974)
Studies in the disulfide bonds of glycoprotein hormones :
locations in the alpha chain based on partial reduction and
formation of ¹⁴C labeled S-carboxymethyl derivatives
J.Biol.Chem. 249 4166-4174

- 26 - COURTE,C.,HURAUULT,M.,COMBARNOUS,Y.,DE LA LOSA,P.and
JUTISZ,M. (1971)
Isolation from ovine Luteinizing hormone (LH)of several active
components and their characterization In structure-activity
relationships of protein and polypeptide hormones .
Margoulies and Greenwood eds.Excerpta Medica Fdn,Amsterdam.
362-365
- 27 - CROSS,G.A.M. (1984)
Release and purification of trypanosoma brucei variant
surface glycoprotein.
J.Cell.Bioch. 24 79-90
- 28 - CROSS,G.A.M. (1975)
Identification , purification and properties of clone
specific glycoprotein antigens constituting the surface
coat of Trypanosoma brucei
Parasitology,71 393-417
- 29 - DIGHE,R.R.,MURALIDHAR,K. and MOUGDAL,N.R. (1979)
Ability of human chorionic gonadotropin beta subunit to
inhibit the steroidogenic response to lutropin.
Biochem.J. 180 573-578.
- 30 - DONELSON,J.E. and TURNER,M.J. (1985)
How the Trypanosome changes its coat
Scientific American 252
- 31 - EDINGTON,G.M and GILLES,H.M. (1969)
Pathology in the tropics
ed. by E. Arnold. London 11 1-951
- 32 - EMEH,J.K.and NDUKA,E.U. (1983)
Circulating serum levels of gonadotropins in gambian sleeping
sickness
IRCS Medical 11 411
- 33 - EUZEBY I. (1986)
Protozoologie médicale comparée Vol 1: Généralités,
sarcomastigophores (flagelés, rhizopodes), ciliés
Collection fondation Marcel Merieux

- 34 - FERGUSON, M.A.J. and CROSS, G.A.M. (1984)
Myristylation of the membrane form of Trypanosoma brucei
variant surface glycoprotein
J. Biol. Chem. 259 3011-3015
- 35 - FERGUSON, M.A.J. and WILLIAMS, A.F. (1988)
Cell-surface anchoring of proteins via glycosylphosphati-
dylinositol structures.
Ann. Rev. Biochem. 57 285-320
- 36 - FERGUSON, M.A.J., DUSZENKO, M., LAMONT, G.S., OUERATH, P. and
CROSS, G.A.M. (1986)
Biosynthesis of Trypanosoma brucei variant surface
glycoproteins
J. Biol. Chem. 261 356-362
- 37 - FERGUSON, M.A.J., DWEK, R.A., HOMANS, S.W. and RADEMACHER, T.W.
(1987)
Structural studies on the glycosphospholipid membrane anchor
of Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein.
NATO ASI Series, Host-Parasite Cellular and Molecular
Interactions in Protozoal Infections.
Ed. K.P. Chang and D. Snary, Vol. H11 19-28.
- 38 - FERGUSON, M.A.J., HOMANS, S.W., DWEK, R.A. and RADEMACKER, T.W.
(1988)
Glycosylphosphatidylinositol moiety that anchors trypanosoma
brucei variant surface glycoprotein to the membrane.
Science. 239 753-759.
- 39 - FERIN, M. and VANDE WIELE, R.L. (1982)
controle neuro endocrinien de la fonction gonadotrope

ed. Flammarion Medecine/sciences Presses de l'universite de
Montreal. 1-14
- 40 - FIDDES, J.C. and GOODMAN, H.M. (1979)
Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for
the alpha subunit of human chorionic gonadotropin.
Nature (London) 281 351-356.

- 41 - FREYMAN, D.M., METCALF, P., TURNER, M.J. and WILEY, D.C. (1984)
6A°, resolution X-ray structure of a variable surface
glycoprotein from trypanosoma brucei.
Nature. 311 167-169.
- 42 - GABE, M. (1968)
Techniques Histologiques .
Eds Masson and Cie. 206-208.
- 43 - GALLAIS, P. and BADIÉ, M. (1952)
Recherches sur l'encéphalite de la Trypanosomiase humaine
africaine. Corrélations cliniques, anatomiques, électro-
encéphalographiques, biologiques.
Med. Trop. 6 633-675.
- 44 - GODINE, J.E., CHIN, W.W. and HABENER, J.F. (1982)
Alpha subunit of rat pituitary glycoprotein hormones Primary
structure of the precursor determined from the nucleotide
sequence of cloned cDNAs
J. Biol. Chem. 257 8368-8371.
- 45 - GOVERNAM, J.M., PARSON, T.F. and PIERCE, J.G. (1982)
Enzymatic deglycosylation of the subunits of chorionic
gonadotropin. Effects on formation of tertiary structure
and biological activity.
J. Biol. Chem. 257 15059-1506.
- 46 - GRAB, D.J., WEBSTER, P. and VERJEE, Y. (1984)
The intracellular pathway and assembly of newly formed
variable surface glycoprotein of Trypanosoma brucei
Proc. Natl. Acad. Sci. 81 7703-7707.
- 47 - GRASSO, P. and CRIP, T.M. (1985)
Prolactin-mediated progesterone secretion by cultured rat
granulosa cells: regulation by purified glycoprotein
hormones and their subunits.
Endocrinology. 116 319-
- 48 - GREEN, E.D. and BAENZIGER, J.U. (1988)
Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin,
and thyrotropin. II Distributions of sulfated and sialylated
oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary
glycoprotein hormones.
J. Biol. Chem. 263 36-45.

- 49 - GREENWOOD, F., HUNTER, W. and GLOBER, S. (1963)
Preparation of ¹³¹I labelled human growth hormone of high specific radioactivity.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 54 440-448.
- 50 - GRIFFIN, L. and ALLONBY, E.W. (1979)
Disease syndromes in sheep and goats naturally infected with trypanosoma congolense.
J. Comp. Path. 89 457-464.
- 51 - GURNETT, A.M., WARD, J., RAPER, J. and TURNER, M.J. (1986)
Purification and characterization of membrane-form variant surface glycoproteins of trypanosoma brucei.
Mol. Biochem. Parasitol. 20 1-13.
- 52 - HATTORI, M., OZAWA, K. and WAKABAYASHI, K. (1985)
Sialic acid moiety is responsible for the charge heterogeneity and biological potency of rat lutropin.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 127 501-508.
- 53 - HERBERT, W.J. and LUMSDEN, W.H. (1978)
Trypanosoma brucei: a rapid "matching" method for estimating the host's parasitemia.
Exp. Parasitol. 40 427-431.
- 54 - HIRUMI, H., DOYLE, J.J. and HIRUMI, K. (1977)
African trypanosomes: cultivation of animal infective Trypanosoma brucei in vitro
Science. 196 992-994.
- 55 - HOARE, C.A. (1972)
The trypanosomes of Mammals
Blackwell, Oxford
- 56 - HUAN, C.N., WEBB, L., LAMBERT, P.H. and MIESCHER, P.A. (1976)
Haemolytic aspects of trypanosoma brucei
In Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships
(Ed. H. Van den Bossche) Amsterdam : ELSEVIER 409-412.
- 57 - IKEDE, B.O. (1979)
Genital lesions in experimental chronic trypanosoma brucei infection in rams.
Res. Vet. Sci. 26 145-151.

- 58 - IKEDE, B.O. and AKPAVIE, S.O. (1982)
Delay in resolution of trypanosome-induced genital lesions in male rabbits infected with Trypanosoma brucei and treated with diminazid aceturate.
Res. Vet. Sci. 32 374-376.
- 59 - IKEDE, B.O., ELHASSAN, E. and AKPAVIE, S.O. (1988)
Reproductive disorders in african trypanosomiasis: a review .
Acta. Trop. 45 5-10.
- 60 - IKEDE, B.O. and LOSOS, G.J. (1972)
Pathology of the disease in sheep produced experimentally by trypanosoma brucei
Vet. Path. 9 278-289.
- 61 - INGHAM, K.C., WEINTRAUB, B.D. and EDELHOCH, H. (1976)
Kinetics of recombination of the subunits of human chorionic gonadotropin. Effect of subunit concentration.
Biochemistry 15 1720-1726.
- 62 - INVERSO, J.A., DE GEE, A.L.W and MANSFIELD, J.M. (1988)
Genetics of resistance to the african trypanosomes: VII.
Trypanosome virulence is not linked to variable surface glycoprotein expression.
J. Immunology 140 289-293.
- 63 - ISOUN, T.T. and ANOSA, V.O. (1974)
Lesions in the reproductive organs of sheep infected with Trypanosoma vivax.
Z. Tropenmed. parasit. 25 469-476.
- 64 - JACKSON, D.G., OWEN, M.J. and VOORHEIS, H.P. (1985)
A new method for the rapid purification of both the membrane bound and released forms of the variant surface glycoprotein from trypanosoma brucei.
Biochem. J. 230 195-202.
- 65 - JI, I., BOCK, J.H and JI, T.H. (1985)
Composition and peptide maps of cross-linked human chorio-gonadotropin-receptor complexes on porcine granulosa cells.
J. Biol. Chem. 260 12815-1282.

- 66 - JUTISZ, M. and SQUIRE, (1958)
Occurrence of several active components in sheep pituitary interstitial cell-stimulating hormone as evidenced by column electrophoresis.
Bull. Soc. Chim. Biol. 40 1875-1880.
- 67 - KAAAYA, G.P. and ODUOR-OKELO, D. (1980)
The effects of Trypanosoma congolense infection on the testis and epididymis of goat.
Bull. Anim. Health. Prod. Afr. 28 1-5.
- 68 - KEELS, B.A. and GROTJAN, H.E. (1985)
Characterization of rat pituitary luteinising hormone charge microheterogeneity in male and female rats using chromatofocusing: Effects of castration.
Endocrinology. 117 354-360.
- 69 - KEELS, B.A., SCHANBACHER, B.D. and GROTJAN, H.E. (1987)
Ovine luteinizing hormone. I : effects of castration and steroid administration on the charge heterogeneity of pituitary luteinizing hormone.
Biol. Reprod. 36 1102-1113.
- 70 - KEENE, W.E., PETTIT, M.G., ALLEN, S. and Mc KERROW, J.H. (1986)
The major neutral proteinase of entamoeba histolytica.
J. Exp. Med. 163 536-549.
- 71 - KEUTMANN, H.T., DAWSON, B., BISHOP, W.H. AND RYAN, R.J. (1978)
Structure of human luteinizing hormone alpha subunit
Endocr. Res. Comm. 5 57-
- 72 - KEUTMANN, H.T., JOHNSON, L. and RYAN, R.J. (1985)
Evidence for a conformational change in deglycosylated glycoprotein hormones.
FEBS Lett. 185 333-
- 73 - KEUTMANN, H.T., Mc ILROY, P.J., BERGERT, E.R. and RYAN, R.J. (1983)
Chemically deglycosylated human chorionic gonadotropin subunits: characterization and biological properties
Biochemistry. 22 3067-3072.

- 74 - KIESEL, L. and CATT, K.J. (1984)
Phosphatidic acid and the calcium dependent actions of GnRH
in pituitary gonadotrophs.
Arch. Biochem. Biophys. 231 202-210.
- 75 - KNOWLES, G., ABEBE, G. and BLACK, S.J. (1989)
Detection of parasite peptidase in the plasma of heifers
infected with Trypanosoma congolense.
Mol. Biochem. Parasit. 34 25-34.
- 76 - KNOWLES, G., BLACK, S.J. and WHITELAW, D.D. (1987)
Peptidase in the plasma of mice infected with Trypanosoma
brucei brucei.
Parasitology. 95 291-300.
- 77 - KORDON, C., ROTTEN, D. and SCHERRER, H. (1982)
Mediateurs du système nerveux central et contrôle des
fonctions gonadotropes femelles.
ed. Flammarion Médecine/Sciences Presses de l'Université de
Montreal 16-28.
- 78 - KRAKOW, J.L., HERELD, D., BANGS, J.D., HART, G.W. and ENGLUND, P.T.
(1986)
Identification of a glycolipid precursor of the trypanosoma
brucei variant surface glycoprotein
J. Biol. Chem. 261 12147-1215.
- 79 - KRUMMEN, L.A. and BALDWIN, D.M. (1988)
Regulation of luteinizing hormone subunit biosystems in
cultured male anterior pituitary cells: effects of gonado-
tropin-releasing hormone and testosterone.
Endocrinology. 123 1868-1878.
- 80 - LABUSQUIERE, R., DUTERTRE, J. and GATEFF, C. (1971)
Les trypanosomiasés humaines africaines.
Encyclopédie Médico-chirurgicale (PARIS) 8095 A1Q,9 1-14.
- 81 - LAEMLI, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of bacte-
riophage T4.
Nature. 227 660-685.

- 82 - LAMBERT, P.H. and GALVAO CASTRO, B. (1977)
Role de la réponse immune dans la pathologie de la trypanosomiase africaine.
Ann.Soc.Belge.Med.Trop. 57 267-269.
- 83 - LANHAM, S.M. and GODFREY, D.G. (1970)
Isolation of salivaria trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose.
Exp.Parasitol. 28 521-534.
- 84 - LEEFLANG, P. (1975)
The epizootiology of trypanosomiasis in ranch cattle (Shika, Agricultural Research Station, Northern Nigeria) at some distance from known primary foci of Savannah Tsetse.

Proceedings of the 14th meeting of the OAU/ISCTR, Dakar, Senegal 94-100.
- 85 - LEONG, D.A., FRAWLEY, L.S. and NEILL, J.D. (1983)
Neuroendocrine controle of prolactine secretion
Annu.Rev.Phys. 45 109-127.
- 86 - LI, C.H. and STARMAN, B. (1964)
Molecular weight of sheep pituitary interstitial cell-stimulating hormone
Nature (London) 202 291-292.
- 87 - LIU, W.K., YOUNG, J.D. and WARD, D.N. (1984)
Deglycosylated ovine lutropin : preparation and characterization by in vitro binding and steroidogenesis.
Mol.Cell.Endocrinol. 37 29-39.
- 88 - LONSDALE-ECCLES, J.D. and MPIMBAZA, G.W.N. (1986)
Thiol-dependent protease of african trypanosomes. Analysis by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gels co-polymerized with fibrinogen.
Eur.J.Biochem. 155 469-473.
- 89 - LOSOS, G.J. and IKEDE, B.O. (1972)
Review of pathology of diseases in domestic and laboratory animals caused by Trypanosoma congolense, T.vivax, T.brucei, T.rhodesiense and T.gambiense.
Vet.path.(Suppl.) 9 1-71.

- 90 - LOW, M.G. (1989)
Glycosyl-phosphatidylinositol: a versatile anchor for cell surface proteins.
FASEB.J. 3 1600-1608.
- 91 - MACFIE, J.W.S. (1913)
Trypanosomiasis of domestic animals in Northern Nigeria
Ann.Trop.Med. Parasit. 7 1-39.
- 92 - MANJUNATH, P., SAIRAM, M.R. and SAIRAM, J. (1982)
Studies on pituitary follitropin. X. Biochemical, receptor binding and immunological properties of deglycosylated ovine hormone .
Mol.Cell.Endocr. 28 125-138.
- 93 - MASAKE, R.A. (1980)
The pathogenesis of infection with Trypanosoma vivax in goats and cattle
Vet.Rec. 107 551-557.
- 94 - MATTHYSSEN, G. , MICHIELS, F. , HAMERS, R. , PAYS, E. and STEINERT, M. (1981)
Two variant surface glycoprotein of Trypanosoma brucei have a conserved C-terminus.
Nature 293 230-233.
- 95 - MATTERI , R.L. and PAPKOFF .H. (1987)
Characterization of equine luteinising hormone by chromatofocusing.
Biol.Reprod. 36 261-269.
- 96 - Mc CONNELL, J. , GURNETT, A.M. , CORDINGLEY, J.S. , WALDER, J.E. and TURNER, M.J. (1981)
Biosynthesis of trypanosoma brucei variant surface glycoprotein. Part I: synthesis size and processing of an N-terminal signal peptide.
Mol.Biochem.Parasitol. 4 225-242.
- 97 - MC NEILLAGE, G.J.C. and HERBERT, W.J. (1968)
Infectivity and virulence of Trypanosoma (trypanozoon) brucei for mice . II. Comparison of closely related trypanosome antigenic types.
J.Comp.Pathol. 78 345-

- 98 - MEITES, J., KAHN, R.H. AND NICOLL, C.S. (1961)
Prolactin production by rat pituitary in vitro
Proc.Soc.exp.Biol. 108 440-443.
- 99 - MENON, A.K., MAYOR, S., FERGUSON, M.A.J., DUZENKO, M. and
CROSS, G.A.M. (1988)
Candidate glycopospholipid precursor for the glycosylphos-
phatidylinositol membrane anchor of Trypanosoma brucei
variant surface glycoproteins.
J.Biol.Chem. 263 1970-1977.
- 100 - MILLER, C., ULLOA-AGUIRRE, A., HYLAND, L. and CHAPPEL, S. (1983)
Pituitary follicle-stimulating hormone heterogeneity :
assessment of biologic activities of each follicle
stimulating hormone form.
Fertil.and steril. 40 242-247.
- 101 - MOORE, H.J. (1970)
In vitro. 6 99-100.
- 102 - MORRISSON, W.I., MURRAY, M. and AKOL, G.W.O. (1985)
Immune responses of cattle to african trypanosomes.
In Immunology and Pathogenesis of trypanosomiasis
(Ed. I.R TIZARD) Florida :C.R.C.press. 104-431.
- 103 - MOUGDAL, N.R. and LI, C.H. (1982)
Beta subunits of human choriogonadotropin and ovine lutropin
are biologically active.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 79 2500-2503.
- 104 - MUTAYOBA, B.M., GOMBE, S., WAINDI, E.N and KAAYA, G.P. (1988)
Depression of ovarian function and plasma progesterone and
oestradiol 17 beta in female goats chronically infected with
Trypanosoma congolense
Acta Endocrinologica 117 477-484.
- 105 - NAOR, Z. and CATT, K.J. (1981)
Mechanism of action of GnRH, involvement of phospholipid
turnover in LH release.
J.Biol.Chem. 256 2226-2229.

- 106 - NILSON, J.H., THOMASON, A.R., CSERBAK, M.T., MONCMAN, C.L. and
WOYCHIK, R.P. (1983)
Nucleotide sequence of cDNA for the common alpha subunit of
the bovin pituitary glycoprotein hormones.
J. Biol. Chem. 258 4679-4686.
- 107 - OGWUD, O., NJOKU, C.O., OSORI, D.I.K. (1985)
Effects of experimental Trypanosoma vivax infection in
pregnancy and fertility of heifers.
Proceedings of the 18th meeting of the OAU/IRCTRC, Harare,
Zimbabwe
- 108 - ONODERA, M., ROSEN, N.L., LIFTER, J., HOTEZ, P.J., BOGUCKI, M.S.,
DAVIS, G., PATTON, C.L., KONISBERG, W.H. and RICHARDS, F.F. (1981)
Trypanosoma congolense: surface glycoproteins of two early
bloodstream variants II. Purification and partial chemical
characterization.
Exp. Parasit. 52 427-439.
- 109 - PAMER, E.G., SO, M. and DAVIS, C.E. (1989)
Identification of a developmentally regulated cysteine
protease of Trypanosoma brucei.
Mol. Biochem. Parasit. 33 27-32.
- 110 - PASTEELS, J.L. (1961)
Premiers résultats de culture combinée in vitro d'hypophyse
et d'hypothalamus dans le but d'en apprécier la sécrétion de
prolactine
C.R. Acad. Sci. (PARIS) 253 3074-3075.
- 111 - PERUZZI, M.R.I. (1928)
Pathologico-anatomical and serological observations on the
trypanosomiasis. Final report.
League of Nations International Committee on Human
Trypanosomiasis. 245-328.
- 112 - PIERCE, J.G. (1971)
The subunits of thyrotropin. Their relationship to other
glycoprotein hormones
Endocrinology. 89 1331-1344.



- 113 - PIERCE, J.G. (1976)
Structural homologies of glycoprotein hormones.
Excerpta Medica Intern. Congr. Serie 403 99-103.
- 114 - PIERCE, J.G. (1988)
Gonadotropins: chemistry and biosynthesis
The Physiology of Reproduction Ed. E. Knobil and J. Neill et al
Raven Press, Ltd., N.Y.
- 115 - PIERCE, J.G. and PARSON, T.F. (1981)
Glycoprotein hormones: structure and function.
Ann. Rev. Biochem. 50 465-495.
- 116 - REEVE, J.R., CHENG, K.W. and PIERCE, J.G. (1975)
Partial reduction of disulfide bonds in the hormone .
Specific subunits of TSH and LH.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 67 179-155.
- 117 - RIDET, J. (1953)
Etude des troubles du cycle menstruel chez la femme
trypanosomée à l'aide de frottis vaginaux.
Médecine Tropicale 13 514-519.
- 118 - ROMERO, G., LUTTRELL, L., ROGOL, A., ZELLER, K., HEWLETT, E. and
LARNER, J. (1988)
Phosphatidylinositol-glycan anchors of membrane proteins:
potential precursors of insuline mediators.
Science . 241 1670-1672.
- 119 - ROVIS, L., BARBET, A.F. and WILLIAMS, P.O. (1978)
Characterization of surface coat of Trypanosoma congolense.
Nature. 271 654-656.
- 120 - RYAN, R.J., KEUTMANN, H.T., CHARLESWORTH, M.C., Mc CORNICK, D.J.,
MILUS R.P., CALVO F.O and VUTYAVANICH T. (1987)
Structure_function relationships of gonadotropins.
Recent progress in hormone research. 43 383-489.
- 121 - SAIRAM, M.R. (1989)
Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal trans
duction
FASEB. 3 1915-1926.

- 122 - SAIRAM, M.R. (1982 a)
Les hormones gonadotropes de l'hypophyse humaine (FSH, LH et prolactine) structure et mécanisme d'action.
in Medecine de la reproduction : gynecologie endocrinienne
P. MAUVAIS-JARVIS, R. SITRUK-WARE, F. LABRIE.
Ed. Flammarion Med/Scien. Presse de l'Un. de Montréal 15-55.
- 123 - SAIRAM, M.R. (1982 b)
Effects of carbohydrate removal on the structure and activity of bovine lutropin.
Biochem. Biophys. Acta. 717 149-153.
- 124 - SAIRAM M.R., CHRETIEN M. and LI C.H (1978)
On the isolation of human pituitary hormones.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 47 1002-1008.
- 125 - SAIRAM, M.R., PAPKOFF, H. and LI, C.H. (1972)
Human pituitary interstitial cell stimulating hormone: primary structure of the alpha subunit.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 48 530-537.
- 126 - SAIRAM, M.R., SCHILLER, P.W. (1979)
Receptor binding, biological and immunological properties of chemically deglycosylated pituitary lutropin.
Arch. Biochem. Biophys. 197 294-
- 127 - SCHMITZ, B., KLEIN, R.A., DUNCAN, I.A., EGGE, H., GUNAWA, J. and PETER-KATALINIC, J. (1987)
MS and NMR analysis of the cross-reacting determinant glycan from Trypanosoma brucei brucei MITat 1.6 variant specific glycoprotein.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 146 1055-1063.
- 128 - STRICKLAND, T.W., PARSONS, T.F and PIERCE, J.G. (1985)
Structure of LH and hCG . In Luteinizing Hormone action and receptors
Ascoli M. Ed, CRC Press 1-15.
- 129 - STRICKLAND, T.W., PUETT, D. (1982)
The kinetic and equilibrium parameters of subunit association and gonadotropin dissociation
J. Biol. Chem. 257 2954-2960.

- 130 - STRICKLER, J.E., MANCINI, P.E and PATTON, C.L. (1978)
Trypanosoma brucei brucei: isolation of the major surface coat glycoprotein by lectin affinity chromatography.
Exp. Parasitol. 46 262-276.
- 131 - STRICKLER, J.E. and PATTON, C.L. (1982)
Trypanosoma brucei : effect of inhibition of N-linked glycosylation on the neighbor analysis of the major variable surface coat glycoprotein.
Mol. Biochem. Parasitol. 5 117-131.
- 132 - TIZARD, I. and HOLMES, W.L. (1976)
The generation of toxic activity from Trypanosoma congolense.
Experimentia. 32 1533-1534.
- 133 - TURCO, S.J., HULL, S.R., ORLANDI Jr, P.A., SPHEPHERD, S.D.,
HOMANS, S.W., DWEK R.A. and RADEMACHER T.W. (1987)
Structure of the major carbohydrate fragment of the leishmania donovani lipophosphoglycan.
Biochem. 26 6233-6238.
- 134 - ULLOA-AGUIRRE, A., MEJIA, J.J., DOMINGUEZ, R., GUEVARA-AGUIRRE, J.,
DIAZ-SANCHEZ, V. and LARREA, F. (1986)
Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in male rat: isoelectric focusing pattern throughtout sexual maturation.
J. Endocr. 110 539-549.
- 135 - VAENSSEN, R.T.M.J., KREIKE, J. and GROOT, G.S.P. (1981)
Protein transfert to nitrocellulose filters.
FEBS Lett. 124 193-196.
- 136 - VICKERMAN, K. (1984)
On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes
J. Cell. Sci. 5 163-193.
- 137 - VICKERMAN, K. and LUCKINS, A.G. (1969)
Localization of variable antigens in the surface coat of Trypanosoma brucei using ferritin-conjugate antibody.
Nature. 224 1125-1126.

- 138 - WAINDI, E.N., GOMBE, S. and ODUOR-OKELO, D. (1986)
Plasma testosterone in Trypanosoma congolense infected
toggernburg goats
Arch.Andrology 17 9-17.
- 139 - WEARE, J.A. and REICHTER, L.E. (1979)
Studies with carbodiimide-cross-linked derivations of bovine
lutropin: I. The effects of specific group modifications on
receptor site binding in testes
J.Biol.Chem. 254 6964-6971.
- 140 - WIDE, L. (1985)
Median charge and charge heterogeneity of human pituitary
FSH, LH, TSH: I. Zone electrophoresis in agarose suspension.
II. Relationship to sex and age.
Acta.Endocrinol. 109 181-197.
- 141 - WIDE, L. (1982)
Male and female forms of human follicle-stimulating hormone
in serum.
J.Clin.Endocr.Metab. 55 682-688.

FONCTION ENDOCRINE ET TRYPANOSOMIASE AFRICAINE

Bilan de 79 cas.

Par M. HUBLART (*), L. LAGOUCHE (*), A. RACADOT (*), A. BOERSMA (*),
P. DEGAND (*), F. NOIREAU (**), J. L. LEMESRE (**) & A. TOUDIC (**) (***)

RÉSUMÉ

Bien qu'une grande fréquence d'hypogonadisme ait été trouvée pendant la maladie du sommeil, les propriétés physiologiques des gonades ont été très peu étudiées. Nous avons rapporté ici l'exploration de l'axe gonadotrope de 79 malades infectés par Trypanosoma brucei gambiense. On a observé une diminution en œstradiol chez 50 % des femmes et dans les niveaux de testostérone chez 50 % des hommes alors qu'aucune diminution de gonadotropines pituitaires (FSH et LH) n'a été trouvée. Les résultats des tests gonade-adénohypophyse ont fait supposer que la dysfonction peut être d'origine centrale. Les études de l'axe thyroïdienne ont aussi été examinées : une diminution en T_3 et FT_3 (fraction libre) même si T_4 était normal. La relation spécifique entre hypogonadisme et infection trypanosomiale est discutée dans cet article.

Mots-clés : GONADES, AXE GONADOTROPE, *Trypanosoma brucei gambiense*, AXE THYROÏDIE.

ABSTRACT

Endocrine function and african trypanosomiasis:
Results from 79 cases.

Although the high frequency of hypogonadism was found during the sleeping sickness, the physiological properties of the gonads have been poorly studied. We reported here the exploration of the gonadotropic axis in 79 patients infected by Trypanosoma brucei gambiense. It has been noted a decrease in oestradiol for 50 % of women, in testosterone levels for 50 % of men whereas no decrease of pituitary gonadotropins (FSH and LH) was found. The results of the gonad adenohypophysial tests suggested that the dysfunction may be of central origin. The studies of thyrotropic axis were also examined : a decrease in T_3 and FT_3 (free fraction) even though T_4 was normal. The specific relationship between hypogonadism and trypanosomal infection is discussed in this report.

Key-words : GONAD, GONADOTROPIC AXIS, *Trypanosoma brucei gambiense*, THYROTROPIC AXIS.

(*) Unité INSERM n° 16, place de Verdun, 59045 Lille Cedex.

(**) ORSTOM, BP 181, Brazzaville, Congo.

(***) Symposium international sur les trypanosomiasis africaines, Limoges, 30 septembre-3 octobre 1987.

La trypanosomiase africaine s'accompagne au cours de son évolution de retentissements cliniques qui pour certains d'entre eux peuvent être rattachés à un déséquilibre endocrinien. Parmi ceux-ci les troubles de la fonction gonadique sont parmi les plus importants : impuissance, diminution de la libido chez l'homme, aménorrhée, tendance à la frigidité chez la femme. Ces dernières années peu de travaux (1) ont été consacrés aux modifications hormonales impliquées notamment dans la fonction gonadique. On peut toutefois rappeler qu'en 1953, RIDER (2) publie une étude réalisée chez la femme trypanosomée, à partir de frottis vaginaux et évoque la notion de modification des facteurs ovariens et hypophysaires.

Depuis 2 ans environ, une collaboration avec l'équipe d'entomologie médicale de l'ORSTOM à Brazzaville nous a conduit à étudier les variations des principaux paramètres endocriniens chez des sujets atteints de trypanosomiase à *Trypanosoma brucei gambiense*.

52 hommes et 54 femmes ont été étudiés. Le bilan endocrinien gonadique de base comprenait les dosages d'œstradiol, testostérone, FSH et LH. Dans une série de 10 hommes et 10 femmes, ce bilan a été complété par des épreuves dynamiques de stimulation : gonadique par HCG, hypophysaire par LH-RH.

Après avoir éliminé de l'étude les sujets impubères, les grossesses, les sujets âgés et ménopausés, nous rapportons les résultats de 45 sérums de femmes et 34 sérums d'hommes.

Le tableau I montre les résultats pour les femmes. Sur ce tableau figure la période de la maladie (P), les résultats du dosage d'œstradiol (E_2) dont les valeurs sont classées depuis les plus basses (10 pg/ml) jusque 30 pg/ml (limite inférieure des valeurs normales pour la phase folliculaire). Dans le bas du tableau figurent 3 cas dont on savait qu'au moment du prélèvement les femmes se situaient en phase progestative et pour qui les valeurs d'œstradiol sont inférieures à la valeur normale la plus basse de cette phase (150 pg/ml). On peut effectuer les commentaires suivants :

— les valeurs basses d'œstradiol ne sont pas en rapport avec une diminution de FSH et LH dont on peut voir que les valeurs se situent essentiellement dans l'intervalle normal de référence ou supérieur à cet intervalle ;

— il ne semble pas exister de relation entre l'importance de la diminution de l'œstradiol et la phase évolutive de la maladie. Les sujets en 2^e période n'ont pas toujours les valeurs les plus basses d'œstradiol. Beaucoup de sujets en 2^e période se situent dans les valeurs les moins basses.

Le tableau II rapporte les cas où les valeurs d'œstradiol se situent à l'intérieur ou au-delà de la fourchette normale de la phase folliculaire. Étant donné l'absence d'indication sur la période du cycle ovarien où ont été réalisés les prélèvements on ne peut juger du caractère normal ou non de ces résultats.

Le tableau III montre les résultats chez les hommes dans les cas où le taux de testostérone est inférieur à 3 ng/ml (limite inférieure des valeurs normales). Les résultats ont été également classés par ordre croissant des valeurs de testostérone. En ce qui concerne les variations de FSH et de LH on peut effectuer les mêmes remarques que pour la femme.

TABLEAU I
Résultats du bilan gonadique de base chez les femmes.

P	Age	E ₂	FSH	LH
1	46	10	21.9	15.4
2	25	10	1.4	0.6
-	52	10.5	14.1	4.1
-	47	12	2.9	0.5
2	55	12	15.3	5.0
2	50	12	11.3	5.8
1	31	13	12.4	3.4
1	14	13	3.2	1.0
-	30	13	2.5	2.2
1	15	17	2.7	1.0
2	23	17	2.5	1.9
2	46	18	4.5	2.1
1	22	20	4.0	1.6
2	21	22	1.9	1.3
2	28	25	3.4	3.7
2	21	26	3	1.7
2	52	26	2.1	1
2	25	27	3.6	2.0
2	35	28	6.9	2.3
1	18	42	0.3	>50
1	21	62	2.7	3.9
2	20	67	2	1.6

P : période de la maladie ; E₂ : œstradiol

Le tableau IV rapporte les observations dont les taux de testostérone se situent dans l'intervalle normal de référence.

On peut résumer l'ensemble de ces résultats de la façon suivante : sur 45 cas rapportés chez les femmes, 19 cas ont un œstradiol inférieur à 30 pg/ml, 3 cas (sérums prélevés en phase progestative) ont un œstradiol inférieur à 150 pg/ml et 23 cas ont un œstradiol supérieur à 30 pg/ml. Sur 34 cas rapportés chez les hommes, 16 ont une testostérone inférieure à 3 ng/ml et 18 sont normaux. Globalement, près de 50 % des sujets ont donc un hypofonctionnement gonadique mais qui est de degré variable. Chez les femmes, en l'absence de renseignement sur la période du cycle, il est possible que plus de 50 % des cas présentent un hypogonadisme.

TABLEAU II

Résultats du bilan gonadique de base chez les femmes.

	P	Age	E ₂	FSH	LH
:					
:					
:					
:					
:	-	30	36	2.8	2.1
:	1	35	35	3.6	2.7
:	2	35	35	4.1	1.2
:	1	16	36	2.2	1.9
:	-	17	37	2.2	2.3
:	2	15	40	4	6.9
:	-	28	41	2.6	0.9
:	1	16	41	3.4	3.6
:	1	50	41	18.1	7.0
:	-	21	45	3.4	0.9
:	-	22	48	3.4	0.8
:	2	31	48	2.4	0.9
:	2	25	72	2.9	3.0
:	1	40	77	2.3	0.9
:	1	43	79	3.6	1.9
:	-	20	80	2.5	0.8
:	-	29	80	3.8	7
:	1	33	82	2.5	1.6
:	1	35	83	2.2	1.5
:	-	25	83	2.4	2.8
:	2	37	134	5.5	8.5
:	2	57	212	2.4	1.3
:	2	45	247	10.5	9.1

Ces hypogonadismes n'apparaissent pas d'origine hypophysaire hypogonadotrope. L'étude comparative des variations de l'hormonémie périphérique et des stimulines hypophysaires FSH et LH montre les résultats suivants. Chez la femme, 2 cas ont une diminution isolée de LH mais 11 cas (près de 50 % des observations) ont des valeurs normales alors que 4 cas ont une augmentation isolée de FSH et 4 cas ont une augmentation de FSH et de LH (ceci est une réponse attendue vis-à-vis de la diminution de l'œstradiol). Chez l'homme, 1 cas a une diminution isolée de LH, 2 cas ont une FSH et LH normales alors que 3 cas et 6 cas ont une augmentation isolée respectivement de LH et de FSH; enfin, 4 cas ont une élévation simultanée des 2 stimulines.

Comme on vient de le voir, le mécanisme de la survenue de l'hypogonadisme n'est pas pour près de 95 % des cas lié à une hyposécrétion des gonadostimu-

TABLEAU III
Résultats du bilan gonadique de base chez les hommes.

P	Age	Testostérone	E ₂	FSH	LH
-	18	0.1	10.5	7.1	1.5
-	35	0.21	44	4.7	3.9
2	36	0.92	9	2.2	1.8
2	40	1.19	28	5.1	6.4
2	47	1.21	18	12.9	9.6
1	46	1.98	17	3.7	3.2
-	38	1.7	14	2.3	0.6
-	23	1.9	15	5.3	0.9
-	28	1.2	14	7.1	1.7
2	25	2.06	16	4.5	1.4
2	44	2.1	19	3.2	2.1
1	42	2.2	13	2.1	3.1
2	55	2.3	19	2.5	2.4
1	17	2.38	15	2.2	3.3
1	22	2.48	14	3.5	2.2
2	56	2.9	21	2.9	3.4

TABLEAU IV
Résultats du bilan gonadique de base chez les hommes.

P	Age	Testostérone	E ₂	FSH	LH
2	55	3.1	21	2.5	1.7
2	29	3.07	20	2.2	1.8
2	38	3.27	22	2.4	1.2
-	40	3.5	18.5	3.8	6.1
-	50	3.2	18	3.2	1.2
-	45	3.5	17.5	1.5	0.8
1	44	3.67	19	4.9	2.9
-	52	3.7	14.5	3.8	1.6
1	38	3.88	15	3.1	2.2
2	19	4.06	22	2.1	0.6
2	42	4.11	21	3.4	2.0
2	21	4.8	25	1.8	1.5
1	42	4.52	28	2.9	2.9
1	20	4.90	28	1.3	1.6
1	17	4.99	28	2.8	2.1
2	15	5.1	21	2.7	1.5
-	42	5.4	32	1.6	2.5
2	29	6.02	27	1.6	1.1

lines hypophysaires FSH et LH. Afin de mieux approcher le ou les mécanismes de ces hypogonadismes nous avons pu explorer une série de 20 sujets trypanosomés (10 hommes et 10 femmes) par des tests de stimulation gonadique et hypophysaire. La stimulation gonadique est obtenue par injection intra-musculaire de 5 000 UI d'HCG suivi après 24 heures d'un dosage d'œstradiol et après 72 heures d'un dosage de testostérone. La stimulation antéhypophysaire de FSH et LH est obtenue par une injection intraveineuse de 100 µg de LH-RH suivie après 30 minutes d'un dosage de FSH et de LH.

Le tableau V illustre les résultats chez les hommes trypanosomés (9 cas sont rapportés). Dans près de 90 % des cas la stimulation gonadique par HCG est positive : les valeurs d'œstradiol et de testostérone sont doublées, triplées ou plus. Après injection de LH-RH, la réponse hypophysaire en ce qui concerne la LH est positive dans près de 90 % des cas alors qu'au niveau de la FSH seuls 2 cas sont positifs.

TABLEAU V
*Épreuves de stimulation gonadique et hypophysaire
chez les hommes trypanosomés : 9 cas.*

Age			* HCG		FSH	LH	** LH.RH	
	E ₂	Test	E ₂	Test			FSH	LH
50	18	3.2	<u>121</u>	<u>10.8</u>	3.2	1.2	3.4	<u>3.7</u>
29	14	1.9	<u>57</u>	<u>4.8</u>	7.1	1.7	<u>12.4</u>	<u>15.8</u>
59	14.5	3.7	<u>38.5</u>	<u>9.5</u>	3.8	1.6	<u>5.9</u>	<u>5.1</u>
38	14	1.7	<u>63</u>	<u>8.3</u>	2.3	0.6	3.3	<u>3.6</u>
40	18.5	3.5	59	<u>8.1</u>	3.8	6.1	4.6	<u>10.7</u>
23	15	1.9	<u>53</u>	<u>8.9</u>	5.3	0.9	<u>11.1</u>	<u>6.6</u>
42	32	5.4	<u>62</u>	<u>4.2</u>	1.6	2.5	<u>1.4</u>	<u>6.1</u>
18	10.5	0.1	10.5	<u>1.15</u>	7.1	1.5	9.1	<u>1.6</u>
45	17.5	3.5	<u>91</u>	<u>12.1</u>	1.5	0.8	1.3	<u>2.1</u>

Les valeurs soulignées correspondent à une réponse positive sous stimulation.

* valeurs de l'œstradiol (E₂) et de la testostérone (Test) après stimulation par l'hormone gonadotrophique chorionique (HCG).

** valeurs de la FSH et de la LH après stimulation par LH.RH ou gonadolibérine.

Chez les femmes (tableau VI), 7 cas sont rapportés après étude dynamique. La stimulation gonadique est négative dans tous les cas. Il faut rappeler que chez la femme, la réponse œstrogénique après HCG est fonction du degré de maturation du follicule ovarien qui est dépendante de la sécrétion de FSH. Effectivement, après LH-RH, la réponse hypophysaire est positive dans 100 % des cas pour la LH, pour la FSH seuls 3 cas sur 7 répondent à la stimulation.

TABLEAU VI
Épreuves de stimulation gonadique et hypophysaire
chez les femmes trypanosomées : 7 cas.

Age		* HCG				** LH.RH	
		E ₂	E ₂	FSH	LH	FSH	LH
20	aménorrhée	80	62	2.5	0.8	3.1	<u>6.4</u>
47	"	12	17.5	2.9	0.5	<u>8.3</u>	<u>7.5</u>
52	"	10.5	12	14.1	4.1	<u>19.5</u>	<u>9.3</u>
30	"	13	23	2.5	2.2	4.4	<u>10.1</u>
21	"	45	38	3.4	0.9	<u>5.1</u>	<u>3.9</u>
22	cycle 1	48	50	3.4	0.8	3.7	<u>2.5</u>
28	aménorrhée	41	35	2.6	0.9	<u>4.7</u>	<u>7.8</u>

Les valeurs soulignées correspondent à une réponse positive sous stimulation.

* valeurs de l'oestradiol (E₂) après stimulation par l'hormone gonadotrope chorionique (HCG).

** valeurs de la FSH et de la LH après stimulation par LH.RH ou gonadolibérine.

Quant aux mécanismes des hypogonadismes constatés, l'ensemble de ces explorations permet les remarques suivantes :

— dans la majorité des cas, les taux circulants des hormones hypophysaires gonadotropes ne sont pas diminués ;

— la réactivité hypophysaire à la diminution de la testostérone et de l'oestradiol s'avère très variable : absence de réactivité, réactivité dissociée au niveau de la FSH et de la LH ou réactivité des 2 stimulines. La répartition de ces différents types de réactivité est, on l'a vu, variable chez les hommes et chez les femmes ;

— chez l'homme tout au moins, l'hypogonadisme n'apparaît pas être d'origine primitivement testiculaire puisque l'épreuve de stimulation à l'HCG s'est montrée positive dans près de 90 % des cas ;

— la stimulation hypophysaire de l'axe gonadotrope par LH-RH s'est avérée positive dans 90 à 100 % des cas en ce qui concerne la réponse au niveau de LH.

Toutes ces données peuvent faire évoquer un déséquilibre à un niveau supra- ou extra-hypophysaire sans toutefois que l'on puisse éliminer toute responsabilité hypophysaire au niveau de la FSH.

L'axe gonadotrope n'a pas été le seul exploré. Nous rapportons les résultats sur le tableau VII de l'exploration de l'axe thyroïdienne. On notera essentiellement la diminution dans la majorité des cas de la T₃ et de sa fraction libre (FT₃) alors que la T₄ reste normale. Ces résultats font évoquer pour ces sujets un tableau de basse T₃ qui est décrit notamment au cours de l'évolution de maladies graves s'accompagnant d'une altération de l'état général. Dans ce contexte,

TABLEAU VII
Bilan thyroïdien de sujets trypanosomés.

Sexe	T4	T3	FT3	FT4	RT3	TUS
F	63	0.8	3.4	9	0.15	0.38
M	44	0.6	2.8	5.5	0.06	0.64
M	<23	<0.45	1.7	10.7	0.03	0.30
M	62	0.5	2.7	8.9	0.13	1.20
F	78	<0.45	2.2	12.6	0.33	1.16
M	53	0.5	2.5	6.9	0.12	3.4
F	74	<0.45	2.2	9.2	0.28	4.8
M	60	0.6	3.1	9.6	0.27	1.0
F	46	<0.45	1.8	8.2	0.17	1.18
F	59	<0.45	1.6	7.5	0.22	5.6
M	78	0.75	3.8	10.4	0.15	2.9
F	57	0.6	3.5	8.4	0.08	2.1
M	60	1.25	5.7	8	0.14	0.29
F	81	0.5	3	10.8	0.21	0.88
M	85	0.9	4.3	12.3	0.21	0.42
F	85	0.7	4	12.1	0.16	0.38
F	88	0.9	3.6	9.2	0.20	1.80
F	42	<0.45	2.6	7.6	0.11	3.62
M	33	<0.45	2.4	9.8	0.06	5.6
M	65	1.0	3.6	8	0.13	0.72

Les valeurs soulignées sont inférieures aux valeurs normales.

<u>Valeurs normales</u> :	T3	0.8	à	1.8 ng/ml
	T4	45	à	115 ng/ml
	FT3	4.8	à	9.8 pmole/l
	FT4	10.5	à	21.5 pmole/l
	TUS	0.15	à	3 uUI/ml
	RT3	0.09	à	0.35 ng/ml

la T₃ inverse est habituellement élevée ce qui n'apparaît pas dans nos observations où la RT₃ reste normale dans tous les cas. Ceci nous amène à discuter du caractère spécifique des anomalies endocriniennes constatées. On vient de le voir, les anomalies de l'axe thyroïdienne ne cadrent pas parfaitement avec un tableau de basse T₃ non spécifique. Il est également décrit des anomalies gonadiques non spécifiques au cours des maladies graves. On ne peut pas complètement éliminer cette éventualité dans les tableaux rapportés. Cependant certaines particularités peuvent être soulignées. L'hypogonadisme n'est pas retrouvé chez tous les sujets trypanosomés. Nous l'avons signalé, l'importance de l'hypogonadisme n'est pas en relation avec le degré d'évolution de la maladie. Dans les hypogonadismes non spécifiques on note une diminution de la protéine transporteur des hormones sexuelles (SBP). Nous n'avons pas retrouvé cette variation au niveau des 20 cas où nous avons réalisé ce dosage. Au contraire, la SBP s'est trouvée assez souvent augmentée. Enfin, la majorité des hypogonadismes

rapportés ne s'accompagne pas d'une diminution des gonadostimulines hypophysaires alors que dans les hypogonadismes non spécifiques cette diminution est habituellement rencontrée.

La variabilité individuelle des sujets trypanosomés pour l'apparition d'un hypogonadisme oriente plutôt vers une réponse spécifique de l'hôte vis-à-vis du parasite, réponse qui est modulée par la sensibilité variable de l'organisme à l'infestation par le trypanosome.

BIBLIOGRAPHIE

1. EMEH (J. K.) & NDUKA (E. E.). — Circulating serum levels of gonadotropins in gambian sleeping sickness. *IRCS Medical Science*, 1983, 11, 44.
2. RIDET (J.). — Étude des troubles du cycle menstruel chez la femme trypanosomée à l'aide de frottis vaginaux. *Medecine tropicale*, 1953, 13, 514-519.

GONADOTROPIC AXIS AND *TRYPANOSOMA BRUCEI* GAMBIENSE INFECTION

by

A. BOERSMA¹, F. NOIREAU², M. HUBLART¹, F. BOUTIGNON¹,
J.L. LEMESRE², A. RACADOT³ & P. DEGAND¹

¹Unité INSERM N°16, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

²Laboratoire d'Entomologie Médicale, ORSTOM,

BP 181, Brazzaville, République Populaire du Congo

³Laboratoire de Biochimie Endocrinologique, U.S.N. A. Centre Hospitalier
Regional, Rue du Professeur Laguesse, 59037 Lille, Cedex, France

Summary — A gonad endocrine survey on 46 Congolese patients (15 women and 31 men) with parasitologically confirmed trypanosomiasis found amenorrhoea in 60% of the women and impotence in 70% of the men. The basic gonad endocrine examination showed a decrease in oestradiol levels in about 65% of the women. Both amenorrhoea and low oestrogen levels were observed in the second phase (P2) of the disease, but low oestrogen levels were sometimes noted in the first phase of the disease (P1). In the men, about 50% of the cases (P2) showed a decrease in testosterone. However, as in the women, the variation of testosterone was also observed in the first phase (P1). A static and dynamic examination of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis was undertaken in order to investigate the origin of these hypogonadisms. A supra- or extra-hypophyseal origin is discussed.

Keywords : African Trypanosomiasis; *Trypanosoma brucei gambiense*; Gonadotropic Axis.

Introduction

Gonad anomalies during experimental *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* and *T. brucei* infection have been reported by various authors (1, 4, 5, 7). In humans, African trypanosomiasis induces genital dysfunction such as menstrual disorders, sterility, abortion in women, and impotence in men (2). The mechanism of these clinical disorders has been interpreted in various ways. Initially, the transmission of trypanosomes from mother to foetus was incriminated in abortions and was also thought to account for the death of premature babies. Subsequently, the fact that genital function was affected in both sexes suggested that this infection may result in disorders in the endocrine balance. Indeed, Ridet, by studying vaginal smears of women with trypanosomiasis, suggested as early as 1953 that modifications in ovarian and pituitary hormone factors may be related to the development of the parasite (6). Since then, little research has been undertaken on gonad function in trypanosomiasis, despite the high frequency of hypogonadism (3).

In this work, we attempt to describe these endocrine dysfunctions and to determine whether they originate in the hypothalamus, the pituitary gland or the gonads.

Materials and methods

Population studied

74 subjects were examined just before adequate treatment. After lifting the clinical anonymity, 46 Congolese patients with parasitologically confirmed trypanosomiasis presenting variable degrees of modification in the cerebrospinal fluid (C.S.F.) were included in the study. This population comprised:

31 men aged between 17 and 52 years (average age: 34 years), ten were in the first phase and 21 in the second phase of the disease.

15 women aged between 18 and 52 years (average age: 32 years), five were in the first phase, and 10 in the second phase of the disease.

These phases were defined according to the C.S.F. cell counting:

First phase (P1): less than 5 cells per mm^3 .

Second phase (P2): 5 or more cells per mm^3 .

The 28 subjects excluded from the study comprised:

- 12 impubertal subjects;
- 8 premenopausal or menopausal subjects;
- 3 subjects with post-gravid amenorrhoea;
- 5 subjects aged over 52 years.

A population control of 32 subjects from the same locality serologically and parasitologically negative was taken as reference and comprised:

- 22 men aged between 20 and 52 years (average age: 32 years)
- 10 women aged between 18 and 38 years (average age: 27 years).

They were found clinically asymptomatic.

Clinical examination

All the fifteen women were questioned in order to determine the stage of the ovarian cycle at the time of the endocrine examination.

Among 31 men, 10 patients were clinically examined, especially to search for sexual impotence.

Gonad endocrine examination

Basal hormone assays

The basic examination including oestradiol, testosterone, pituitary gonadotropins (F.S.H. and L.H.) was carried out in all patients and controls. The assays were performed by radio-immunological techniques:

- Oestradiol: direct R.I oestradiol kit (R.I.S. Wurenlingen, Switzerland), normal values (pg/ml): men 15-45; women in follicular phase 30-50, luteal phase 150-230;

- Testosterone: SB-testo kit (ORIS, Gif-sur-Yvette, France) normal values (ng/ml) men 3-10;
- F.S.H.: F.S.H.-RIA-100 kit (IRE, Fleurus, Belgium), normal values (ng/lm): men 1.3-2.3; women in follicular phase 1.6-3.2; luteal phase 0.8-2.4;
- L.H.: L.H.-RIA-100 kit (IRE, Fleurus, Belgium) normal values (ng/ml): men: 0.8-2.2; women in follicular phase 1.3, luteal phase 0.5-2.5.

The normal values are those usually given for each kit.

Dynamic stimulation tests

Among 15 women and 31 men suffering of trypanosomiasis, for 10 women as well as 10 men, additional dynamic stimulation tests for responses to gonadal and pituitary biological activities were performed. The results of these tests were expressed by comparison with the initial basal values obtained in each examined patient. The procedures followed were:

- gonad stimulation by I.M. injection of 5000 IU of chorionic gonadotrophin h.C.G. (Chorionic gonadotrophin «Endo», Organon) followed by the oestradiol assay after 24 hours, and testosterone assay after 72 hours;
- pituitary stimulation by IV injection of 100 μ g of L.H.R.H. (stimu-L.H., Roussel), followed by F.S.H. and L.H. assays after 30 minutes.

Results

The clinical investigations concerning amenorrhoea in woman and impotence in man are reported in Table 1. The results of basal endocrine gonadal levels (oestradiol, testosterone, F.S.H. and L.H.) are shown in Table 2 for women and in Tables 3 and 4 for men.

TABLE 1
Clinical anomalies in 15 women and 10 men with trypanosomiasis in the first (P₁) or second (P₂) phase of the disease

Phase	Women		Men	
	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂
Number of cases	5	10	2	8
Amenorrhoea	1	8	—	—
Impotence	—	—	1	6

For women, the oestradiol ratios were diminished until 30 μ g/ml for 6 cases (Patients 5 to 10), and 4 cases (Patients 1 to 4) in the luteal phase gave ratios lower than 150 μ g/ml (normal lower limit of oestradiol level for luteal phase). Fig. 1 illustrates the values of oestradiol for women suffering from trypanosomiasis in the different clinical phases (P1 and P2 phases)

compared to the control population from the same area. Thus, oestradiol levels were found insufficient for 10 women among the 15 and it has been noted that for 4 cases, the patients were in P1 phase.

TABLE 2
Gonadal endocrine results in the women
Patients 1 to 5 with only the basal endocrine examination
Patients 6 to 15 with both basal endocrine examination and dynamic stimulation tests

Patients	Age	Evolutionary Phase	Amenorrhoea	E ₂ pg/ml	FSH ng/ml	LH ng/ml	HCG E ₂ pg/ml	LHRH FSH ng/ml	LH ng/ml
1	18	1	- (L)	42	0.3	ND	ND	ND	ND
2	21	1	- (L)	62	2.7	3.9	ND	ND	ND
3	20	2	- (L)	67	2	1.6	ND	ND	ND
4	52	2	- (L)	26	2.1	1	ND	ND	ND
5	21	2	+	26	3	1.7	ND	ND	ND
6	47	2	+	12	2.9	0.5	17.5	8.3	7.3
7	30	2	+	13	2.5	2.2	23	4.4	10.1
8	50	1	+	16	2.7	3	18	5.3	22
9	37	1	- (F)	27	1.5	2.2	48	2.4	10.6
10	24	2	+	16	3.4	3.3	14	5	4.3
11	17	2	+	40	1.4	1.7	57	3.1	5.9
12	20	2	+	80	2.5	0.8	62	3.1	6.4
13	21	2	+	45	3.4	0.9	38	5.1	3.9
14	22	1	- (F)	48	3.4	0.8	50	3.7	2.5
15	28	2	+	41	2.6	0.9	35	4.7	7.8

F: Follicular phase

L: Luteal phase

E₂: oestradiol

ND: not determined

TABLE 3
Gonadal endocrine results in the men (21 patients)
undergoing only the basal endocrine examination

Patients	Age	Phase	Test. ng/ml	FSH ng/ml	LH ng/ml
1	42	1	2.2	2.1	3.1
2	22	1	2.5	2.2	3.5
3	17	1	2.4	3.3	2.2
4	46	1	1.9	3.2	3.7
5	36	2	0.9	2.2	1.8
6	44	2	2.1	3.2	2.1
7	47	2	1.2	9.6	12.1
8	40	2	1.2	6.4	5.1
9	26	2	2	1.4	4.5
10	21	2	4.8	1.8	1.5
11	15	2	5.1	2.7	1.5
12	44	1	3.6	2.9	4.9
13	17	1	5	2.1	2.8
14	38	1	3.8	2.2	3.1
15	42	1	4.5	2.9	2.9
16	42	2	4.1	2	3.4
17	29	2	3.1	1.8	2.2
18	29	2	6	1.1	1.6
19	38	2	3.3	1.2	2.4
20	20	2	4.9	1.6	1.3
21	19	2	4	0.6	2.1

Test = Testostérone

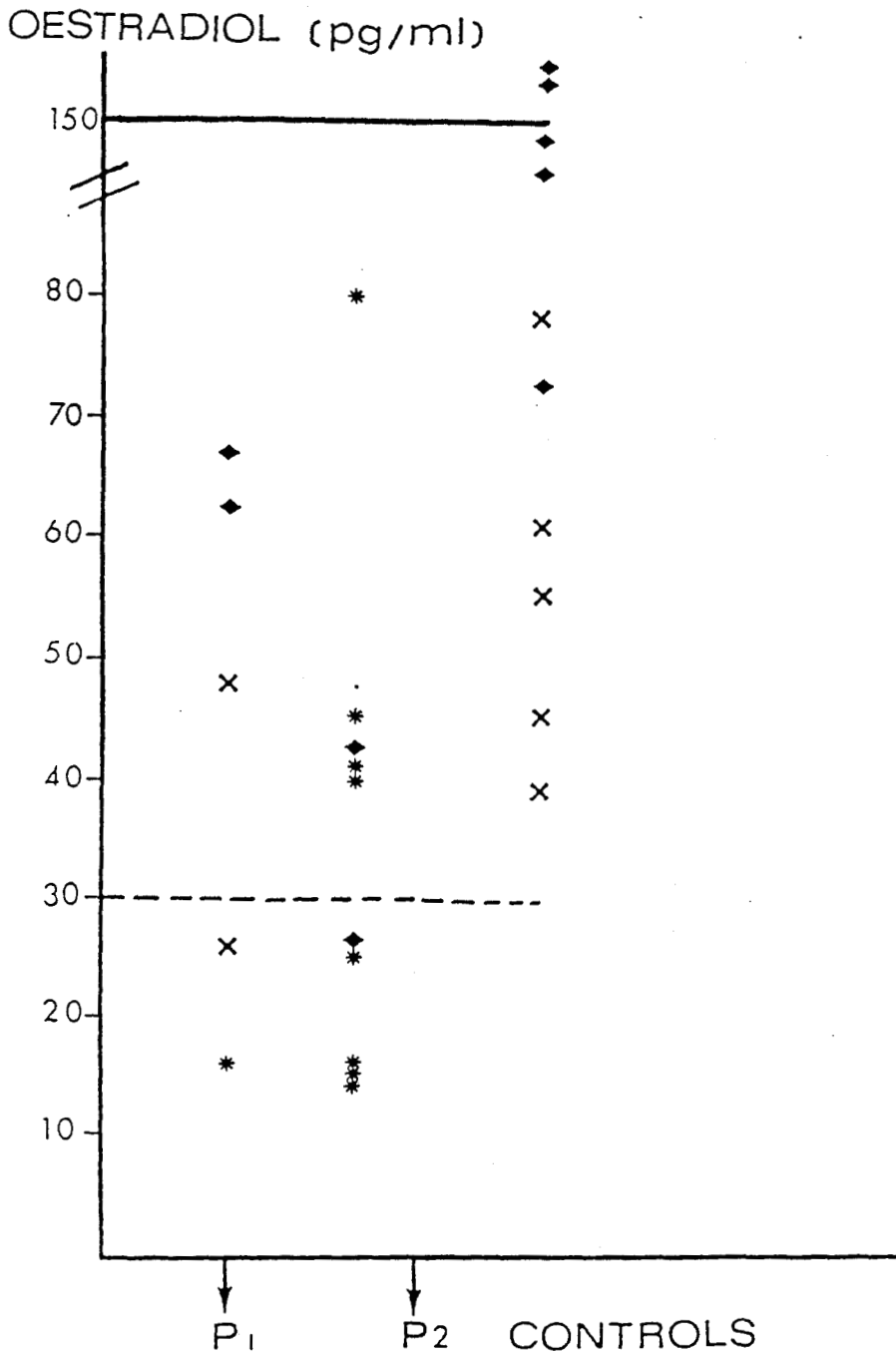


Figure 1.
Results of oestradiol assays in control women (10 cases).

* amenorrheal women
 X non-amenorrheal women examined in the follicular phase
 non-amenorrheal women examined in luteal phase
 - - - - - lowest limit of normal values in follicular phase (30 pg/ml)
 _____ lowest limit of normal values in luteal phase (150 pg/ml).

For men, 14 cases (Patients 1 to 9 and 22 to 26) indicated that the testosterone level was lower or equal (1 Patient) at 3ng/ml. In Fig. 2 the values obtained for men suffering from trypanosomiasis (in the two phases, P1 and P2) are presented in comparison with the values obtained for the control population (all the values were higher than 3ng/ml). Thus, among 31 men 14 patients presented a decrease of the plasma testosterone ratio and we noted that 4 cases were in P1 phase.

TESTOSTERONE [ng/ml]

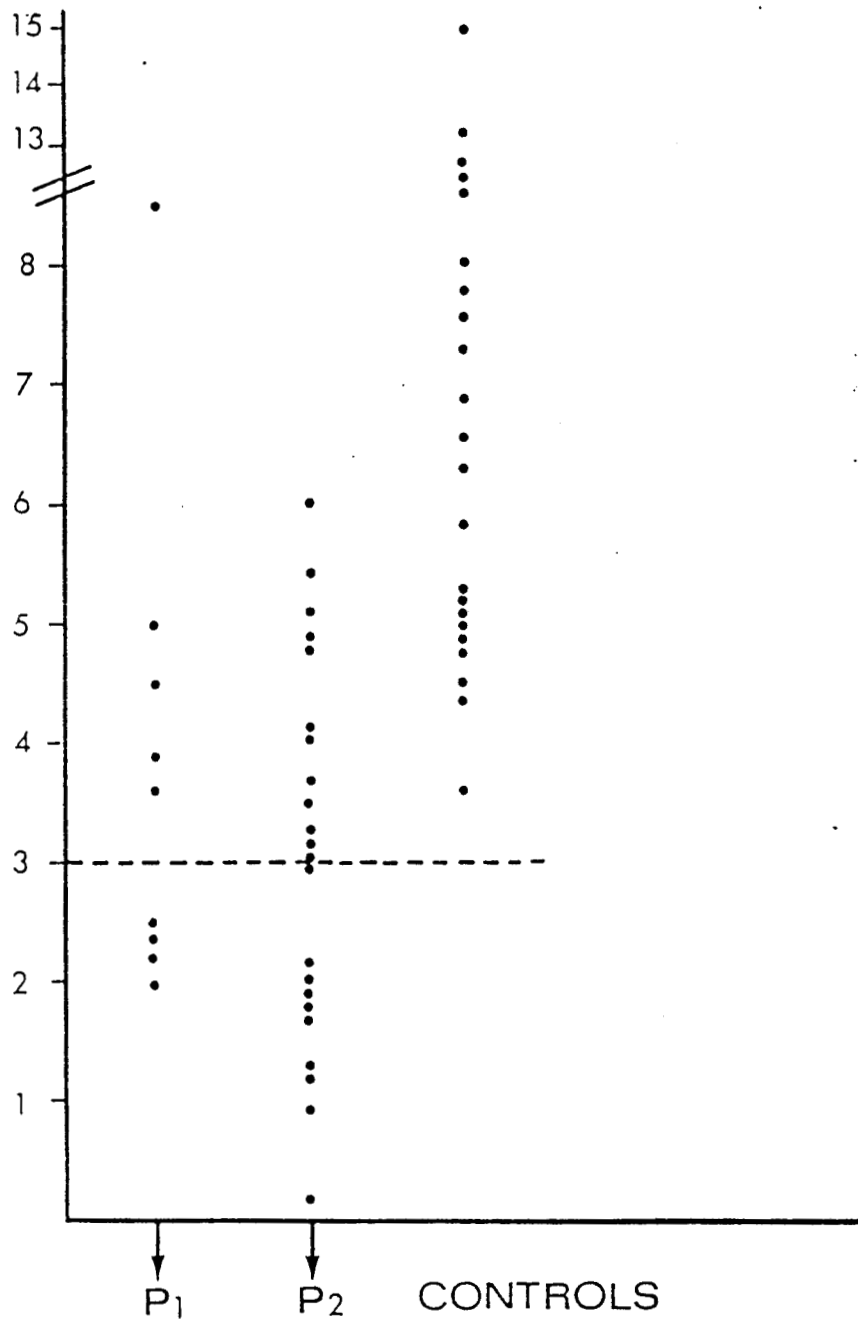


Figure 2.
Results of testosterone assays
in 22 male controls and 31 male patients with trypanosomiasis.

----- lowest limit of normal values (3 ng/ml).

Table 5 shows the results of the pituitary gonadotropin (F.S.H. and L.H.) assays for the cases in which gonad insufficiency (decrease in oestradiol or testosterone) was observed. The results show that there was no decrease in pituitary gonadotropins in men and a decrease was observed in only one woman for F.S.H. (Patient 1) and for L.H. (Patient 6).

In order to determine the origin of the anomaly, resulting in the hypogonadisms, we explored the hypothalamic-pituitary gonad axis by dynamic stimulation tests. Gonad stimulation was carried out by human chorionic gonadotrophin (h.C.G.) and the adenohipophyseal stimulation by gonadolibe-

rin (L.H.-R.H.). The results for women are shown in Table 2 and for men in Table 4.

TABLE 4
Gonadal endocrine results in the men (10 patients)
undergoing basal endocrine examination and dynamic stimulation tests

Patients	Evolutive		Impotence	Test ng/ml	FSH ng/ml	LH ng/ml	HCG Test ng/ml	LHRH	
	Age	PHase						FSH ng/ml	LH ng/ml
22	28	2	+	1.9	7.1	1.7	4.8	12.4	15.8
23	28	2	+	1.7	2.3	0.8	8.3	3.3	3.6
24	23	2	-	1.9	5.3	0.9	8.9	11.1	6.6
25	18	2	+	0.1	7.1	1.5	1.2	9.1	1.6
26	46	2	+	3	1.8	2.8	12.8	3	7.2
27	50	2	+	3.2	3.2	1.2	10.8	3.4	3.7
28	40	2	+	3.5	3.8	6.1	8.1	4.6	10.7
29	42	1	+	5.4	1.6	2.5	4.2	1.4	6.1
30	45	2	-	3.5	1.5	0.8	12.1	1.3	2.1
31	52	1	-	9.5	2.7	5.6	16.4	3.2	10.9

Test = Testostérone.

TABLE 5
Variations in the gonadotropins (FSH and LH)
in the cases in which decreased levels of
oestradiol and testosterone were observed in
women and men respectively

	FSH		LH	
	Women	Men	Women	Men
Decreased	1	0	1	0
Normal	9	6	7	8
Increased	0	8	2	6

With regard to gonad stimulation, it was noted that:

- the response in men was clearly positive in all cases in which testosterone ratios were decreased (Patients 22 to 26);
- in women the results were more difficult to interpret, since the capacity of the oestrogen response after h.C.G. depends on the degree of maturation of the ovarian follicle at the time of the test.

With regard to hypophyseal stimulation:

- the response was clearly positive for L.H.;
- the response was less systematic for F.S.H., especially in men.

Discussion

This endocrine survey realized on 46 Congolese subjects (15 women and 31 men) with parasitologically confirmed trypanosomiasis revealed a high frequency of gonad hypofunction. Indeed, 60% of the women presented amenorrhoea and 70% of the men were impotent. The basal gonad examination revealed a decrease in oestradiol in approximately 65% of the

women, half of whom presented amenorrhoea. Amenorrhoea and reduced oestrogen levels occurred mainly during the second progressive phase (P2) of trypanosomiasis. However the assay of oestradiol sometimes decreases prior to the occurrence of amenorrhoea in the first phase. In men, a decrease in testosterone was observed in nearly 50% of the patients (period 2). Four of the ten subjects presenting a similar state were in phase P1.

The static and dynamic exploration of the hypothalamic-pituitary-gonad axis was an essential point in understanding the mechanism causing gonad hypofunction. The hypofunction did not appear to be of gonad origin since in most cases, particularly in men, the response is positive. Neither do the assay results of the pituitary gonadotropins F.S.H. and L.H. in the basal state and after stimulation by L.H-R.H indicate insufficiency in the gonadotropic adenohypophyseal function. Indeed, in nearly 90% of the women, and 100% of the men, a decrease in circulating pituitary gonadotropins was not observed. In addition, the response of the adenohypophysis to stimulation by L.H-R.H was found to be positive in most cases. These findings suggest that trypanosomiasis due to *T.b. gambiense* causes hypogonadism which may be due to supra or extra hypophyseal origin but the mechanism remains to be determined. At the present time no formal proof of the parasitic origin of this type of hypogonadism has been found. Hypogonadism has been described essentially in the course of serious illness involving impairment of the general condition. Contrary to the observations reported here, these hypogonadisms occur with an insufficient secretion of pituitary gonadotropins and hyporeactivity of the L.H.-R.H. stimulation test (8, 9).

All these data demonstrate the variability of the individual response to trypanosome infection and suggest that the mechanism causing gonad hypofunction may be more specifically linked to host-parasite relationships.

It is therefore essential to develop and study experimental models in order to understand these endocrine dysfunctions in African trypanosomiasis.

Finally, it seems that the gonad anomalies may involve the central nervous system at supra or extrapituitary level and the findings of the decrease of the oestradiol or the testosterone rate in some cases as early as the P1 phase, suggest that these parameters should be effectively considered for an early screening of the central nervous system attack and for a more adequate therapeutic indication.

Acknowledgements — This work was supported by grants from the Commission of the European Communities (T.S.D.-146-F (M.R.) and received financial support from the UNDP/World Bank/WHO special programme for Research and Training in Tropical Diseases.

Axe gonadotropique et infection par *Trypanosoma brucei gambiense*.

Résumé — Une enquête endocrinologique gonadique chez 46 patients (15 femmes et 31 hommes) atteints d'une trypanosomiase parasitologiquement confirmée retrouve une aménorrhée chez 60% des femmes et une impuissance chez 70% des hommes. Le bilan endocrinien gonadique de base montre une diminution des taux d'oestradiol chez à peu près 65% des femmes. Aménorrhée et valeurs basses d'oestradiol sont retrouvées au cours de la seconde phase (P2) de la maladie, mais des taux bas d'oestradiol peuvent être parfois notés au cours de la première phase (P1). Chez l'homme, près de 50% des cas (P2) montrent une diminution des taux de testostérone. Cependant, comme chez la femme, la variation de la testostérone était aussi observée au cours de la première phase (P1). Une exploration statique et dynamique de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique a été réalisée afin de situer l'origine de ces hypogonadismes. L'origine supra- ou extra-hypophysaire est discutée.

Gonadotrope as en *Trypanosoma brucei gambiense* infectie.

Samenvatting — Een endocrinologisch onderzoek van de geslachtsklieren bij 46 Congolese patiënten (15 vrouwen en 31 mannen) met parasitologisch bevestigde trypanosomiasis, stelde bij 60% van de vrouwen amenorree vast en bij 70% van de mannen impotentie. Het endocrien basisonderzoek toonde bij 65% van de vrouwen een daling van de hoeveelheid oestradiol aan. Zowel amenorree als lage oestrogeenspiegels werden in de tweede fase (P2) van de ziekte gevonden, maar in de eerste fase van de ziekte (P1) werden ook soms lage oestrogeenspiegels genoteerd. Bij de mannen werd een daling van testosteroone vastgesteld in ongeveer 50% van de gevallen (P2). Nochtans werd er, net zoals bij de vrouwen, ook variatie in testosteroone gehalte waargenomen gedurende de eerste fase (P1). Een statisch en dynamisch onderzoek van de as hypothalamus-hypofyse-geslachtsklieren werd uitgevoerd om de oorsprong van deze hypogonadismen te situeren. Een supra- of extra-hypofysaire oorsprong wordt besproken.

Received for publication on October 18, 1988.

REFERENCES

1. Anosa VO, Isoun TT: Further observations on the testicular pathology in *Trypanosoma vivax* infection of sheep and goats. *Res. Vet. Sci.*, 1980, 28, 151-160.
2. Apted PIC: Clinical manifestations and diagnosis of sleeping sickness. In: *The African Trypanosomiasis* (Eds. HW Mulligan and WH Putts), London, Allen and Unwin, 1970, 661-683.
3. Emeh JK, Nduka EE ; Circulating serum levels of gonadotropins in gambian sleeping sickness. *I.R.C.S. Medical Science*, 1983, 11, 44.
4. Ikede BO: Genital lesions in experimental chronic *Trypanosoma brucei* infection in rams. *Res. Vet. Sci.*, 1979, 26, 145-151.
5. Isoun TT, Anosa VO: Lesions in reproductive organs of sheep and goats experimentally infected with *T. vivax*. *Tropenmed. Parasitol.*, 1974, 25, 469-476.
6. Ridet J: Etude des troubles du cycle menstruel chez la femme trypanosomée à l'aide de frottis vaginaux. *Médecine Tropicale*, 1953, 13, 514-519.
7. Waindi EN, Gombe S, Odvor-Okelo D: Plasma testosterone in *Trypanosoma congolense* infected toggerburg goats. *Arch. Androl.*, 1986, 17, 9-17.
8. Warner BA, Dudau ML, Santen RJ: Effects of ageing and illness on the pituitary testicular axis in men ; qualitative as well as quantitative changes in luteinizing hormone. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 1986, 60, 263-268.
9. Woolf PO, Hamill RW, McDonald JV, Lee LA, Kelly M: transient hypogonadotropic hypogonadism caused by critical illness. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 1985, 60, 444-450.

EVIDENCE OF MYRISTYLATED DISULFIDE-LINKED DIMER OF VARIANT SURFACE GLYCOPROTEIN OF *TRYPANOSOMA BRUCEI-BRUCEI*

MARYLÈNE HUBLART, LUCIA MENDONÇA-PREVIATO,* FRANÇOIS BOUTIGNON, GUILLEMETTE HUET-DUVILLIER and PIERRE DEGAND†

Unité INSERM No. 16, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France (Tel: 20 97-26-15)

(Received 1 June 1988)

Abstract—1. Variant surface glycoprotein (VSGs) of *Trypanosoma brucei-brucei* may exist as a disulfide-linked dimer in both forms: myristylated (mfVSG) and non-myristylated (sVSG), as judge by fluorography and immunoblotting of SDS-PAGE under non-reducing conditions.

2. The dimeric VSG form is labeled with [³H]-myristic acid in our incorporation conditions.

3. AnTat 1.1 trypanosomes preincubated with tunicamycin and incubated with [³H]-myristic acid synthesized a labeled molecule that has an apparent molecular weight slightly smaller than the native form, and that also corresponds to a disulfide-linked dimer.

INTRODUCTION

The sequential expression of different variant surface glycoproteins (VSGs) enables the parasitic protozoan *Trypanosoma brucei* to evade the immune response of its mammalian hosts (Vickerman, 1978; Cross, 1978). The VSGs can be isolated from the parasite in a soluble form (sVSG) after mechanical or osmotic disruption of the trypanosomes (Cross, 1975); or in an amphiphilic membrane form (mfVSG) after solubilization of trypanosomes in detergent at 100°C or in the presence of 10 mM Zn²⁺ (Cardoso de Almeida and Turner, 1983). The purification of membrane form VSGs was also described through the use of TFA (Clarke *et al.*, 1985) or pCMPSA (Turner *et al.*, 1985). The mfVSG has a lower apparent molecular weight on SDS-PAGE and a lower affinity for anti-CRD antibody as compared to sVSG (Cardoso de Almeida and Turner, 1983). There are two different types of oligosaccharide in the VSG of *T. brucei* (Holder, 1983); one is asparagine-linked and the other is a glycolipid which becomes linked to the α -carboxyl group of the C-terminal amino acid residue (Holder, 1983). The lipid moiety consists in dimyristyl-phosphatidylinositol (Ferguson *et al.*,

1985). The structure of the carbohydrate of the glycolipid from variant MITat 1.4 is studied by Ferguson *et al.* (1987), and from the variant MITat 1.6 by Schmitz *et al.* (1987).

In this paper we describe studies on mfVSG and sVSG of *T. brucei* AnTat 1.1 and AnTat 1.8 which show the selective incorporation of myristic acid into a dimeric form of mfVSG.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Trypanosomes

Cells of the *T. brucei* clones AnTat 1.1 and AnTat 1.8 were purified from infected rat blood as described by Lanham (1968).

Biosynthetic labeling of mfVSG with [9,10-³H]-myristic acid

Purified trypanosomes were washed twice (1500 g for 15 min at 4°C) with phosphate saline glucose buffer (PSG), containing 38 mM Na₂HPO₄, 29 mM NaCl and 83 mM glucose pH 8.0 and incubated for 30 min at 30°C at a concentration of 7.5 × 10⁷ cells/ml in culture medium RPMI 1640, slightly modified without glutathione and supplemented with 0.1% proline, 0.015% threonine, and [9,10-³H]-myristic acid (22.4 Ci/mmol, used at 50 μ Ci/ml) complexed to defatted bovine serum albumin.

Extraction procedures of trypanosomes biosynthetically labeled with [9,10-³H] myristic acid

(i) Trypanosomes were extracted three times by 0.1% TFA pH 1.1 (Clarke *et al.*, 1985); (ii) trypanosomes were suspended in PBGS containing 125 mM phosphate buffer pH 5.5 1% glucose supplemented with 0.2 mM anti-proteases phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), N- α -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), N-ethylmaleimide (NEM) (Baltz *et al.*, 1976), at 4°C for 30 min or overnight; (iii) trypanosomes were suspended in 0.01 M PBS pH 7.2 containing 1 mM of each antiprotease at 37°C for 5 min. Following centrifugation in a microfuge for 30 sec at 20°C the supernatants and the respective pellets (TFA, PBGS and PBS) were analysed by SDS-PAGE. An aliquot of trypanosomes was directly solubilized in electrophoresis sample

*On leave from the Universidade Federal do Rio de Janeiro and CNPq, Brazil.

†Author to whom correspondence should be addressed.

Abbreviations used—AnTat, Anvers trypanozoon antigenic type; BSA, bovine serum albumin; CRD, cross reacting determinant; ESB, electrophoresis sample buffer; mfVSG, membrane form variant-specific glycoprotein; MITat, Molteno Institute Trypanozoon antigenic type; NEM, N-ethylmaleimide; PAGE, polyacrylamide-gel electrophoresis; PBGS, phosphate saline glucose buffer, pH 5.5; PBS, phosphate saline buffer, pH 7.2; PSG phosphate saline glucose buffer, pH 8.0; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; SDS, sodium dodecyl sulfate; sVSG, soluble form variant-specific glycoprotein; TLCK, N- α -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone; TFA, trifluoroacetic acid; TU, tunicamycin.

buffer (ESB), containing 0.625 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol and also analysed by SDS-PAGE.

SDS-Polyacrylamide gels and Western blotting

Samples were analysed by SDS-PAGE, according to the method of Laemmli (1970) on 5–30% acrylamide gels. The migrations were performed with unreduced and reduced samples by 5% 2-mercaptoethanol in the ESB at 100°C for 3 min. Gels were stained with Coomassie Blue R-250, and radiolabeled components were located by impregnation of the gels with AMPLIFY (Amersham), followed by fluorography at –80°C. Also sVSG and mfVSG were detected on immunoblots following electrophoretic transfer to nitrocellulose of proteins separated by SDS-PAGE and incubated with antibody (Gomes *et al.*, 1986). Immunoblots were also analysed by fluorography as described above.

Antisera

Antiserum against the variable surface antigen of AnTat 1.1 was prepared by Dr T. Vervoort (Institut for Tropical Medicine Antwerpen, Belgium). Antiserum against the CRD, raised against sVSG Mtat 1.2, was a generous gift of Dr M. Ferguson of the Department of Biochemistry, University of Oxford, England.

Effect of tunicamycin on VSG molecular form

Trypanosome suspensions were preincubated for 30 min in the presence or absence of 40 ng of antibiotic tunicamycin (TU) prior to addition of [9,10-³H]-myristic acid, under the same labeling conditions as described before.

RESULTS

The initial approach in this study was to analyse the molecular soluble and membrane forms of the VSGs of *T. b. brucei* AnTat 1.1 and 1.8. Those antigenic forms were studied through the use of several extraction procedures. The trypanosomes were labeled with [9,10-³H] myristic acid for 30 min at 30°C. The parasites were collected by centrifugation in four pellets. One pellet has been directly solubilized in the electrophoresis sample buffer (ESB) while the others have been treated by one of the three extraction procedures described in Materials and Methods. For analysis by SDS-PAGE, the supernatants were supplemented with glycerol (final concentration 10%) and the residual pellets were solubilized in the ESB. With the protocols using PBGS pH 5.5 and PBS pH 7.2, that release a sVSG, the supernatants revealed no trace of labeled VSG, as expected. However, by the TFA procedure which is described to extract the mfVSG (Clarke, 1985), labeled VSG was detected in the pellet and in the supernatant.

Analysis of the labeled VSG in the trypanosome pellets

The results obtained for AnTat 1.1 in Coomassie Blue stained SDS-PAGE, under unreducing conditions, are shown in Fig. 1(a). The direct solubilization of trypanosomes in the ESB gave essentially two major bands (lane 2). The pellet of trypanosomes after TFA extraction (TFA-pellet) was characterized by the same two bands (lane 3). On the other hand, the treatment of the trypanosomes by the PBGS (30 min) (PBGS-pellet) or PBS (PBS-pellet) (lanes 4 and 5) led to a slightly different pattern, the higher M_r band (100,000) was very faint and replaced by an intensely stained band of higher M_r (110,000), that comigrated with sVSG control (lane 1). The same

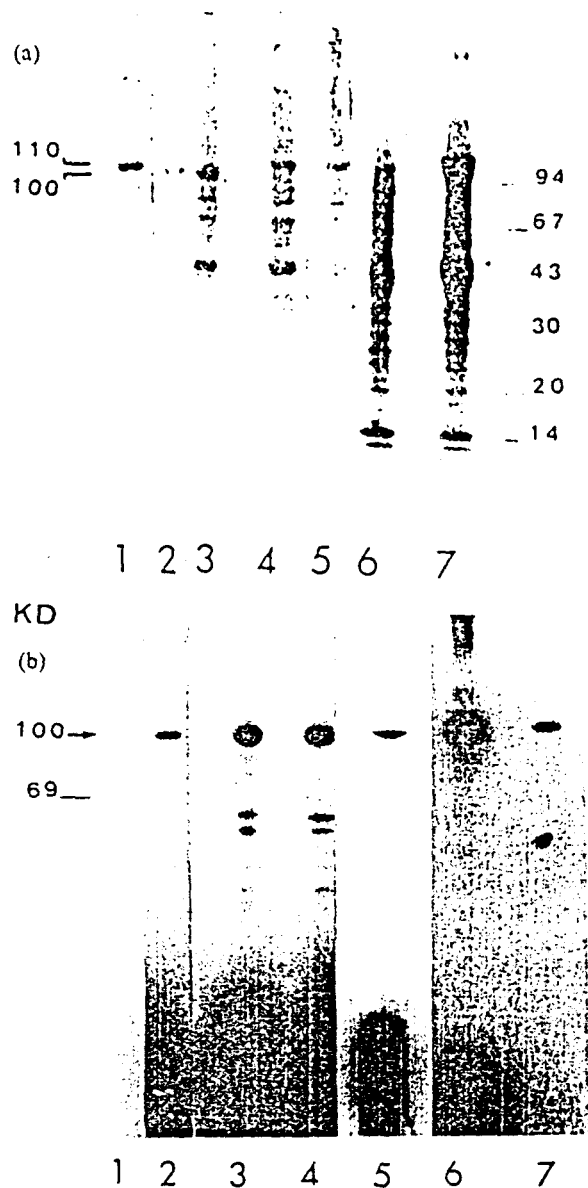


Fig. 1. (a) SDS-PAGE (5–30%) of AnTat 1.1 and 1.8 samples in the ESB under non-reducing conditions, stained with Coomassie blue. Lanes 1–5 are the variant AnTat 1.1: lane 1, sVSG control; lane 2, whole trypanosomes; lane 3, TFA-pellet; lane 4, PBGS-pellet, 30 min; lane 5, PBS-pellet; lane 6, TFA-pellet (variant AnTat 1.8); lane 7, PBGS-pellet, 30 min (variant AnTat 1.8). (b) Fluorograph showing incorporation of [³H]-myristic acid into VSGs of AnTat 1.1 and 1.8 variants. This fluorograph corresponds to the SDS-PAGE in (a). Lanes 2–5 are the variant AnTat 1.1: lane 1, [¹⁴C]-methylated bovine serum albumin standard; lane 2, whole trypanosomes; lane 3, TFA-pellet; lane 4, PBGS-pellet, 30 min; lane 5, PBS-pellet; lane 6, TFA-pellet (variant AnTat 1.8); lane 7, PBGS-pellet, 30 min (variant AnTat 1.8).

conclusions could be obtained with AnTat 1.8. The TFA-pellet, and PBGS-pellet (30 min) from AnTat 1.8 are illustrated (lanes 6 and 7, respectively).

Fluorography of the gel showed that the major band at M_r 100,000 was labeled for all AnTat 1.1 and 1.8 samples (Fig. 1b). By SDS-PAGE in the presence of 2-mercaptoethanol, the labeled band was found approximately at M_r 60,000. The results indicated the incorporation of [9,10-³H]-myristic acid into a

disulfide-linked dimeric VSG form of *T. b. brucei* AnTat 1.1 and 1.3.

Characterization, by Western blots, of the AnTat 1.1 VSG forms in the trypanosome pellets

Immunological detection of VSG on nitrocellulose transfers from SDS-PAGE (with or without reducing conditions) was performed using homologous anti-VSG sera or anti-CRD serum (variant MITat 1.2).

In non-reducing conditions, binding of the homologous antiserum was visualized with AnTat 1.1 variant by a major band at M_r 100,000 in trypanosomes directly suspended in ESB or in the TFA-pellet (Fig. 2A, lanes 9 and 7, respectively), in two bands (100,000 and 110,000 daltons) in the PBGS-pellet, 30 min or overnight (Fig. 2A, lanes 3 and 5), and in three bands in the PBS-pellet (Fig. 2A, lane 1). The additional lower band in this preparation probably represents a degradation product since the procedure was running under 37°C. When the immunoblotting was submitted to fluorography, the band at M_r 100,000 was revealed for all the pellets, showing that a myristylated dimeric form was specifically recognized by homologous antiserum (Fig. 2B).

Anti-CRD serum was able to bind the 110,000 band but not the 100,000 band (Fig. 3A). For the PBS-pellet, a lower band is also observed (Fig. 3A, lane 2) that probably corresponds to the additional band observed by immunoblotting with anti-VSG serum (Fig. 2A, lane 1). Also, with anti-CRD serum no band was detected in TFA-pellet or TFA-supernatant (Fig. 3A, lanes 8 and 9).

After fluorography of this immunoblot a band at M_r 100,000 was apparent at the same level for all pellets (Fig. 3B).

Characterization, by Western blots, of the AnTat 1.1 VSG forms found in the supernatants

In order to analyse the nature of the released VSG, all supernatants of the different extractions were submitted to SDS-PAGE followed by immunoblotting. This experiment was carried out with variant AnTat 1.1. In Fig. 2A lanes: 2 (PBS-supernatant), 4 (PBGS-supernatant, 30 min) and 6 (PBGS-supernatant, overnight), the immunoblot with homologous serum revealed two bands at M_r 110,000 and 100,000; the 110,000 band appeared in lower amount for the 30 min PBGS-supernatant compared to the other supernatants, whereas in lane 8, that corresponds to the TFA-supernatant, only the 100,000 band was apparent. When anti-CRD serum was used only the TFA-supernatant was negative (Fig. 3A, lane 9), and in the other supernatants a band at M_r 110,000 was detected (Fig. 3A, lanes 3, 5 and 7).

Analysis of the molecular forms obtained in the presence of tunicamycin

Trypanosomes (AnTat 1.1) were preincubated for 30 min in the presence or absence of tunicamycin (TU) and were labeled with [3 H]-myristic acid. After 30 min in label, the cells were isolated from the medium, treated with different extraction procedures and the pellets were analysed by fluorography. In the presence of TU the myristic acid-labeled VSG, without reducing conditions, showed an apparent M_r

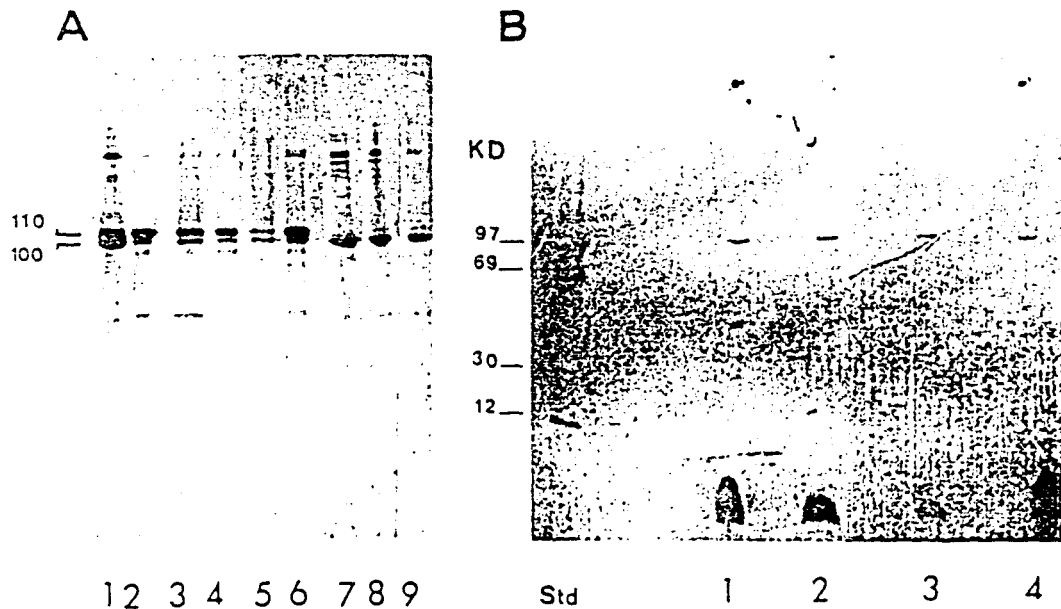


Fig. 2. (A) Western blot analyses of the trypanosome-pellets in the ESB (lanes 1, 3, 5, 7, 9) or of the supernatants (lanes 2, 4, 6, 8), from *T. brucei* AnTat 1.1 were run on 5–30% SDS-PAGE under non-reducing conditions. The blot was incubated with anti-homologous serum. Lanes 1 and 2, PBS; lanes 3 and 4, PBGS, 30 min; lanes 5 and 6, PBGS, overnight; lanes 7 and 8, TFA; lane 9, whole trypanosomes. (B) Fluorograph of the Western blot (A) showing incorporation of [3 H]-myristic acid into *T. brucei* pellets of variant AnTat 1.1. Std, [14 C]-methylated protein molecular weight standards consisting of phosphorylase *b* (M_r 97,000); bovine serum albumin (M_r 69,000); carbonic anhydrase (M_r 30,000), and cytochrome *c* (M_r 12,000). Lane 1, PBS-pellet; lane 2, PBGS-pellet, 30 min; lane 3, PBGS-pellet, overnight; lane 4, TFA-pellet.

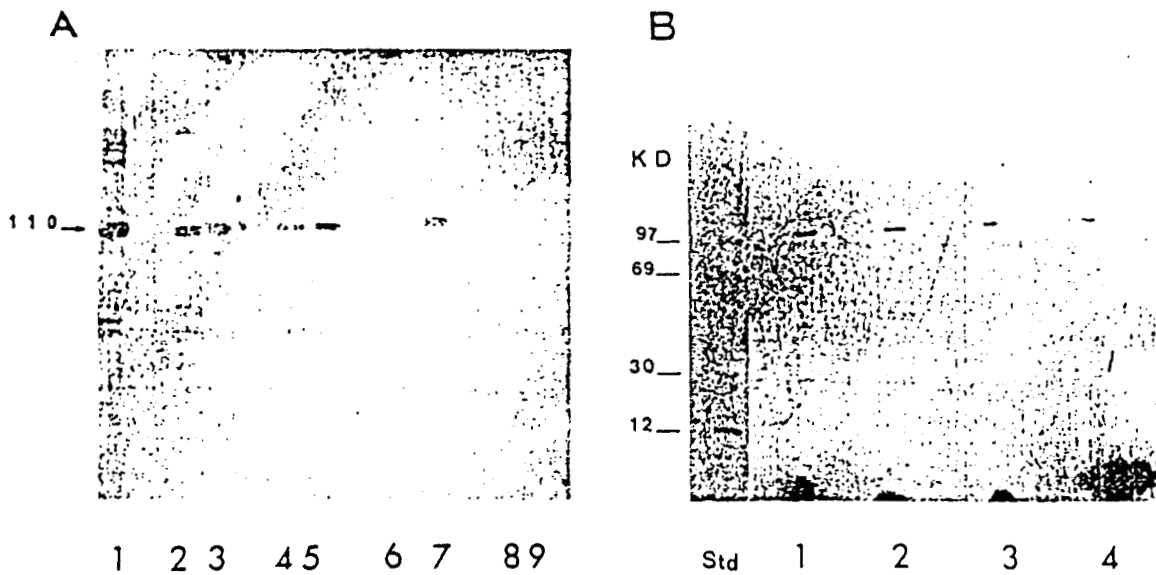


Fig. 3. (A) Western blot analyses of the trypanosome-pellets in the ESB (lanes 2, 4, 6, 8) or of the supernatants (lanes 3, 5, 7, 9) from *T. brucei* AnTat 1.1, were run on 5–30% SDS-PAGE under non-reducing conditions. The blot was incubated with anti-CRD serum. Lane 1, sVSG control; lanes 2 and 3, PBS; lanes 4 and 5, PBGS 30 min; lanes 6 and 7, PBGS overnight; lanes 8 and 9, TFA. (B) Fluorograph of the Western blot (A) showing incorporation of [³H]-myristic acid into *T. brucei* pellets of variant AnTat 1.1. Std, as described in Fig. 2B; lane 1, PBS-pellet; lane 2, PBGS-pellet, 30 min; lane 3, PBGS-pellet, overnight; lane 4, TFA-pellet.

slightly lower than 100,000 (Fig. 4, lanes 3 and 5) that is consistent: (i) with the absence of N-linked glycans (Holder and Cross, 1981); (ii) with the existence of mfVSG-dimer. Figure 4, lanes 6–9, illustrates the SDS-PAGE under reducing conditions that showed in the presence of TU (Fig. 4, lanes 7 and 9) a lower M_r band than 60,000.

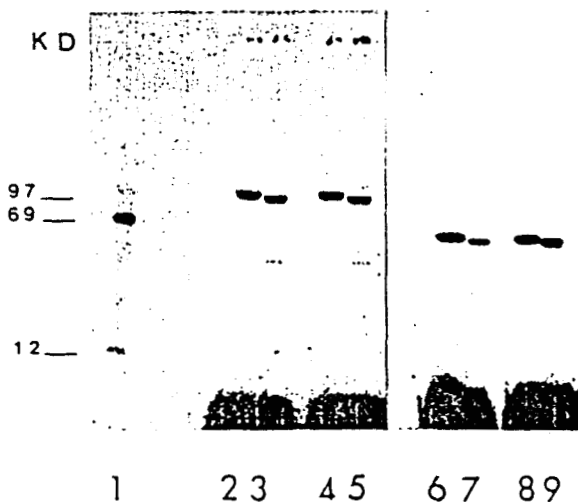


Fig. 4. Fluorograph showing incorporation of [³H]-myristic acid into VSGs (variant AnTat 1.1) on SDS-PAGE gels (5–30%) under non-reducing conditions (lanes 2–5) or reducing conditions (lanes 6–9). A trypanosome suspension was preincubated for 30 min at 30°C in the presence (lanes 3, 5, 7, 9) or absence (2, 4, 6, 8) of tunicamycin (40 ng/ml). Lane 1 [¹⁴C]-methylated protein molecular weight standards, as described in Fig. 2B; lanes 2, 3, 6 and 7, whole trypanosomes; lanes 4, 5, 8 and 9, PBGS-pellet, 30 min.

DISCUSSION

Our experiments have shown the existence of a dimeric mfVSG form in two variants of *T. b. brucei*, AnTat 1.1 and 1.8, on SDS-PAGE under non-reducing conditions. The identity of mfVSG could be established using several criteria: (i) the labeling with [³H]-myristic acid (Fig. 1b), (ii) using Western blot, the transfer bands were positive with homologous antibodies but not with CRD antibody (Figs 2–4), (iii) this molecule displayed a slightly increased mobility on SDS-PAGE as compared with sVSG control (Fig. 1a). The results are in agreement with previous observations that indicated a dimerization through a disulfide linkage in the purified soluble VSGs of *T. b. brucei* AnTat 1.1, 1.8 and 1.10 (Huet-Duvillier *et al.*, 1988). Following 30 min incorporation of [³H]-myristic acid, a labeled VSG form could only be detected at the level of M_r 100,000 on SDS-PAGE under non-reducing conditions. Addition of 2-mercaptoethanol to the sample prior to SDS-PAGE gave a radiolabeled band at M_r 60,000.

Using different extraction procedures the supernatants and the pellets of two variants of *T. b. brucei* AnTat 1.1 and 1.8 have been analysed for the molecular soluble and membrane forms. Both the released VSG and the VSG remaining in the trypanosome pellets were examined. For AnTat 1.1 immunoblotting with homologous antiserum showed that the specific antigen essentially appeared as a dimer VSG in either the soluble or membrane forms. The antigenic forms that were visualized in the trypanosome pellets or in the supernatants always appeared essentially as a dimer VSG independently of the extraction procedure. Following treatment of the labeled parasites with PBS at 37°C for 5 min we have observed an additional band on immunoblot with anti-CRD or

homologous serum, in comparison to the other procedures. This band, likely, results from an enzymatic process.

For the variant AnTat 1.8, the myristic acid labeled VSG was found also only as a dimer form. However, the antigen isolated by PBGS procedure and purified by Concanavalin A-sepharose appeared as a mixture of dimer and monomer VSG (Huet-Duvillier *et al.*, 1988).

Strickler and Patton (1982a), also reported the existence of a dimer-form on SDS-PAGE under unreducing conditions for the strain 427 and for Ytat 1.1 variant. By the use of gel filtration chromatography in the absence of detergent and by the use of bi-functional cross-linking reagents, Auffret and Turner (1981) have described the existence of the VSGs, in solution, as a dimer linked through hydrophobic interactions. More recently Gurnett *et al.* (1986) have found many similar properties between mfVSG and sVSG in cross-linking experiments by dimethylsubmerimide in the presence of several ionic and non-ionic detergents.

Also, using cross-linking reagents, Strickler and Patton (1982b) reported that the VSG synthesized in the presence of tunicamycin was unable to form a dimer. So, we analysed the effect of the presence of tunicamycin in the formation of disulfide-linked dimer. Our results, with AnTat 1.1 variant, have shown: (i) that the VSG apparent M_r was slightly decreased when synthesized in the presence of TU (Fig. 4) therefore, assigning the inhibition of N-glycosylation, and (ii) that the absence of N-linked oligosaccharides did not prevent the VSG from dimerization by a disulfide-bridge (Fig. 4, lanes 3 and 5). The apparent M_r of the VSGs in the absence of 2-mercaptoethanol is approximately twice the molecular weight observed on SDS-PAGE under reducing conditions (Fig. 4, lanes 6-9).

The finding of a disulfide-linked mfVSG in *T. brucei* variants shows that the intermolecular bond is a property of the parasite surface coat. The same characteristic was reported for acetylcholinesterase forms, which are, similar to VSGs, glycolipid-anchored membrane proteins (Fukerman *et al.*, 1985; Roberts *et al.*, 1985; Haas *et al.*, 1986; Gnager *et al.*, 1987).

Acknowledgements—The authors would like to thank Dr M. Ferguson of the Department of Biochemistry, University of Oxford, England for critical reading of this manuscript. We thank Pascal Mathon for the helpful technical assistance. This investigation was supported by grants from the Commission of the European Communities (TSD-146 F (MR)), the U. E. R. de Médecine, Université de Lille II and the Fondation pour la Recherche Médicale Française.

REFERENCES

- Auffret C. A. and Turner M. J. (1981) Variant specific antigens of *Trypanosoma brucei* exist in solution as glycoprotein dimers. *Biochem. J.* 193, 647-650.
- Baltz T., Baltz D. and Pautrizel R. (1976) Affinité de la Concanavaline A pour *Trypanosoma equiperdum*. Applications à l'isolement de la fraction glycoprotéique spécifique du type antigénique. *Ann. immunol. (Inst. Pasteur)* 127C, 761-774.
- Cardoso de Almeida M. L. and Turner M. J. (1983) The membrane form of variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. *Nature* 302, 349-352.
- Clarke M. W., Olafson R. W. and Pearson T. W. (1985) Rapid preparative scale purification of myristylated variant surface glycoproteins from african trypanosomes. *Molec. Biochem. Parasitol.* 17, 19-34.
- Cross G. A. M. (1975) Identification, purification and properties of clone specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* 71, 393-417.
- Cross G. A. M. (1978) Antigenic variation in trypanosomes. *Proc. R. Soc. London B* 202, 55-72.
- Ferguson M. A. J., Low M. G. and Cross G. A. M. (1985) Glycosyl-sn-1,2 dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 260, 14547-14555.
- Ferguson M. A. J., Dwek R. A., Homans S. W. and Rademacher T. W. (1987) Structural studies on the glycopospholipid membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. In *Host-Parasite Cellular and Molecular Interactions in Protozoal Infections* (Edited by Chang K.-P. and Snary D.), pp. 19-28. NATO ASI series Vol. 11.
- Fukerman A. H., Fiorini R. M., Roth E., Low M. G. and Silman I. (1985) Physicochemical behaviour and structural characteristics of membrane-bound acetylcholinesterase from *Torpedo electric organ*. *Biochem. J.* 226, 369-377.
- Gnager A. L., Forte M. and Rosenberry T. L. (1987) Isolation and characterization of acetylcholinesterase from *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 262, 13290-13298.
- Gomes V., Huet-Duvillier G., Aubert J. P., Dirat I., Tetaert D., Moncany M. L. J., Richet C., Vervoort T., Pays E. and Degand P. (1986) Physical and immunological analysis of the two domains isolated from a surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei*. *Arch. Biochem. Biophys.* 249, 427-436.
- Gurnett A. M., Raper J. and Turner M. J. (1986) Solution properties of the variant surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei*. *Molec. Biochem. Parasitol.* 18, 141-153.
- Haas R., Bandt P. T., Knight J. and Rosenberry T. L. (1986) Identification of amine components in a glycolipid membrane-binding domain at the C-terminus of human erythrocyte acetylcholinesterase. *Biochemistry* 25, 3098-3105.
- Holder A. A. (1983) Carbohydrate is linked through ethanolamine to the C-terminal amino acid of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *Biochem. J.* 209, 261-262.
- Holder A. A. and Cross G. A. M. (1981) Glycopeptides from variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* C-terminal location of antigenically cross reacting carbohydrate moieties. *Molec. Biochem. Parasitol.* 2, 135-150.
- Huet-Duvillier G., Gomes V., Tetaert D., Mathon P., Boersma A. and Degand P. (1988) *Trypanosoma brucei*: variability in the association of some variant surface glycoproteins. *Exp. Parasitol.* 67, 31-38.
- Laemli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227, 680-684.
- Lanham S. M. (1968) Separation of trypanosomes from the blood of infected rats and mice by anion-exchangers. *Nature* 218, 1273-1274.
- Roberts W. L. and Rosenberry T. L. (1985) Identification of covalently attached fatty acids in the hydrophobic membrane-binding domain of human erythrocyte acetylcholinesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133, 621-627.
- Schmitz B., Klein R. A., Ducan I. A., Egge H., Gunawan J., Peter-Katalinic J., Dabrowski U. and Dabrowski J. (1987) MS and NMR analysis of the cross-reacting determinant glycan from *Trypanosoma brucei brucei*

- MITat 1.6 variant specific glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 146, 1055-1063.
- Strickler J. E. and Patton C. L. (1982a) *Trypanosoma brucei*: Nearest neighbor analysis on the major variable surface coat glycoprotein crosslinking patterns with intact cells. *Exp. Parasitol.* 53, 117-132.
- Strickler J. E. and Patton C. L. (1982b) *Trypanosoma brucei*: effect of inhibition of N-linked glycosylation on the nearest neighbor analysis of the major variable surface coat glycoprotein. *Molec. Biochem. Parasitol.* 5, 117-131.
- Turner M. J., Cardoso de Almeida M. L., Gurnett A. M., Raper J. and Ward J. (1985) Biosynthesis, attachment and release of variant surface glycoproteins of the African trypanosome. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 117, 23-25.
- Vickerman K. (1978) Antigenic variation in trypanosomes. *Nature* 273, 613-617.

Presence of a Lipophosphoglycan in Two Variants of Trypanosoma brucei brucei¹

Marylène HUBLART, Daniel TETAERT*, Lucia MENDONCA-PREVIATO and Pierre DEGAND

Unité INSERM N° 16 Place de Verdun 59045 LILLE Cédex

Received May 16, 1988

For the family of Trypanosomatidae (Trypanosoma and Leishmania) the organization of the glycoproteins on the cell surface is a well documented structural feature, because their plasma membranes are potential target for chemotherapy. By using metabolic labeling ([³²P] phosphate, [³H]-myristic acid, [³H]-galactose) and by appropriate fractionated extraction, we have found a trypanosomal molecule which has electrophoretic and chromatographic properties consistent with the lipophosphoglycan of Leishmania donovani defined by Turco et al (1987) *Biochemistry* 26, 6233-6238 (1). In addition, the trypanosomal lipophosphoglycan, appears to have chromatographic behaviour similar to the glycolipid C of Trypanosoma brucei brucei described by Krakow et al (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 12147-12153 (2). Our results suggest that the role of the trypanosomal lipophosphoglycan may take place in the orientation of the glycoproteins in the surface coat and/or corresponds to the glycolipid precursor for the anchor of variant surface glycoprotein. © 1988 Academic Press, Inc.

Many studies have been directed toward understanding how parasites differ biochemically from their hosts and other free living organisms. It has become increasingly evident that the structural organization of the surface glycoproteins and antigens of parasites is of great importance in many interactions between the invading organisms and their hosts (3). Belong to the family Trypanosomatidae kinetoplastidae, Trypanosoma brucei, the causative agent for human sleeping sickness and nagana in cattle, and Leishmania donovani, responsible for the kala-azar, a common feature is now emerging: their major surface membrane glycoproteins [variant surface glycoprotein (VSG) of

* To whom correspondence should be addressed.

Abbreviations : VSG, variant surface glycoprotein ; AnTat, Antwerpen Trypanozoon-antigenic-type ; t- and α -LPG, trypanosomal and leishmania lipophosphoglycan ; HPLC high performance liquid chromatography ; TLC, thin layer chromatography.

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

Trypanosoma brucei and 63 000 dalton glycoprotein (p63) of Leishmania] have similar molecular arrangement. Extensive similarities have been also found between the membrane anchoring mechanism of the trypanosomal VSG and those of the p63 of Leishmania : both are covalently linked to phosphatidyl inositol in their membranes (4,5).

Furthermore, all surface studies of these parasites have revealed the existence of molecules rich in carbohydrates (6,7) which may play a major role in the survival of the parasites in their hostile environments. The most striking feature described for the promastigote stage of L.donovani is an unusual glycoconjugate (Mr 10,000-20,000), an heterogeneous lipid-containing specie with repeating units of phosphorylgalactosyl- β -mannose [a lipophosphoglycan (LPG)] (1). Little is known about the biological role of the leishmania LPG : it is present as an integral molecule in the membrane (8) and it inhibits the activity of protein kinase C in vitro (9). Nevertheless although lacking the LPG, the R₂D₂ L. donovani clone is able to infect the macrophages (10).

Our attempt has been to determine whether T. brucei brucei, as well as the other kinetoplastidae also synthesize the particular structure than the LPG expressed by L.donovani. In this view, we have strictly followed the same conditions of the LPG isolation described by Orlandi and Turco (11). The evidence presented in this paper is that using these conditions, we are able to isolate a trypanosomal molecule (t-LPG) which is found to have chromatographic and electrophoretic behaviour similar to the leishmania LPG (l-LPG).

MATERIALS AND METHODS

Cells and metabolic labeling

Bloodstream forms of two variants of T. brucei brucei (AnTat 1.1A and AnTat 1.8) were raised in Swiss mice and then in Sprague-Dawley rats from stabulates stored at - 80°C. The parasites were harvested after three days by cardiac puncture and prepared as previously described (12). The washed trypanosomes (7.5 x 10⁷ cells/ml) were transferred to slightly modified RPMI 1640 medium devoid of glutathione, supplemented with proline [0.1 % (w/v)], threonine [0.015 % (w/v)], and 2 mM glutamine.

For metabolic labeling, [9,10³-H] myristic acid [New England Nuclear ; 22.4 mCi/mmole ; 50 μ Ci/ml) was first complexed to defatted bovine serum albumin (Boehringer ; 1 mg/ml) in a volume of 0.75 ml and added to the medium described above during 30 min at 30°C. A mixture of D-[1-³H]galactose (11.5 Ci/mmole) and D-[6-³H]-galactose (29.2 Ci/mmole), both at 100 μ Ci, was used for labeling the parasites during 2 h at 30°C in the same culture medium except that the content of glucose was decreased at 0.2 g/l. [³²P] orthophosphate labeling (Amersham ; 0.2 mCi/ml) was made in the same culture medium where the NaH₂PO₄ was replaced by NaCl to obtain the exact final osmolarity.

Purification of the lipophosphoglycan

Subsequent extractions were performed at 0°C using the washed intact cells (2 x 10⁷ trypanosomes) in the conditions described by Orlandi and Turco (11) as follows : (i) 3-fold with chloroform/methanol/water (3:2:1) (organic phase I); (ii) 4-fold with aqueous 4 mM MgCl₂ ; (iii) 3-fold with chloroform/-

methanol/water (10:10:3) (organic phase II). The delipidated residue was finally extracted 4-fold with the solvent E containing water/absoluted ethanol/ether/pyridine/concentrated ammonia (15:15:5:1:0.017). The supernatant was dried under nitrogen stream and finally lyophilized (solvent E-extract).

The lyophilized solvent E-extract was dissolved in 0.5 ml of 0.04 M NH_4OH , 0.001 M EDTA solution, applied to a sephadex G_{150} column (1 x 60 cm) equilibrated and eluted by the same solution. The elution was performed at a flow rate of 9.6 ml/h, fractions of 0.5 ml were collected measured for radioactivity [in 3 ml scintillant Aqualyte (J.T. Baker Chemicals) using LS 3801 liquid scintillation system (Beckman)] and for carbohydrate by phenol-sulfuric acid reaction (13). The corresponding peaks were pooled and lyophilized.

The cells of *T.b. brucei* AnTat 1.1 were also extracted according to Krakow et al (1) as follows: 1.5×10^9 cells were resuspended in 5 ml of chloroform/methanol/water (10:10:3) and, after vigorous shaking, the sample was kept at room temperature for 1 h before centrifuging 5 000 x g, 15 min. The organic phase was dried under nitrogen stream and, to remove residual contaminants, the residue was dissolved in 0.5 ml of water-saturated n-butanol and then extracted three fold with 0.2 ml of water. The butanol phase was dried and stored at -20°C .

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. (SDS-PAGE)

SDS-PAGE was conducted under reducing conditions according to Laemmli (14). The separating gel was a 5 to 30% acrylamide gradient and the stacking gel was 3.6% acrylamide. Electrophoresis was carried out for 4.5 - 5 h at 20 mA. Following electrophoresis, carbohydrate was detected by periodate acid-Schiff staining (PAS), protein by Coomassie Blue and radioactivity by fluorography.

Thin layer chromatography. (TLC)

Thin layer chromatography was performed on silica Si-60 plates (20 x 20 cm) (Merck) and on silica-60 HPTLC plates (10 x 10 cm) (Merck). The plates were developed either with solvent A : [(1-propanol/pyridine/water (1:1:1)] or solvent B : [(chloroform/methanol/KCl 0.25% in water (w/v) (55:45:10)]. Adjacent lanes were spotted with standard lipids : myristic acid (MA) ; dimyristyl glycerol (DMG) ; phosphatidic acid dimyristyl glycerol (DMPA) ; lysophosphatidyl choline (LPC). Detection was obtained by spraying the plates with rhodamine [0.01% in water (w/v)], by orcinol sulfuric acid reaction (15) or silver nitrate staining (16). The positions of radioactive components were also identified by spraying the plates with Amplify (Amersham) and by fluorography on Kodak X-Omat S film.

High performance liquid chromatography. (HPLC)

HPLC method was developed using Varian 5000 system. A Lichrosorb Si 60 (5 μm) (25 cm x 4 mm) column (Merck) equipped with a precolumn (10 μm) (4 cm x 4 mm) was used. The samples were injected into the column, eluted at a flow rate of 2 ml/min with solvent (A) : acetonitrile ; water ; H_3PO_4 1N (750 : 250 : 2 ml) and with solvent (B) : acetonitrile ; water ; H_3PO_4 1N (990 : 10 : 2ml). The gradient system was as follows : 90%-(B), 3 min ; 40%-(B) over 9 min ; 20%-(B) over 4 min ; 5%-(B) over 2.5 min. Eluates were detected with an UV absorbance detector LKB 2238 Uvicord S II and measurements were made at 206 nm in the sensitivity of 0.1 absorption unit full scale. Measurements of radioactivity were also performed in 3 ml of scintillant OCS (Amersham).

RESULTS

The efficiency of the different purification steps of trypanosomal lipophosphoglycan (t-LPG) was assessed by SDS-PAGE (Fig. 1). The total [^3H]-myristic acid labeled trypanosomes (AnTat 1.1A) were first analyzed by fluorography. The pattern indicated that our culture medium conditions allowed

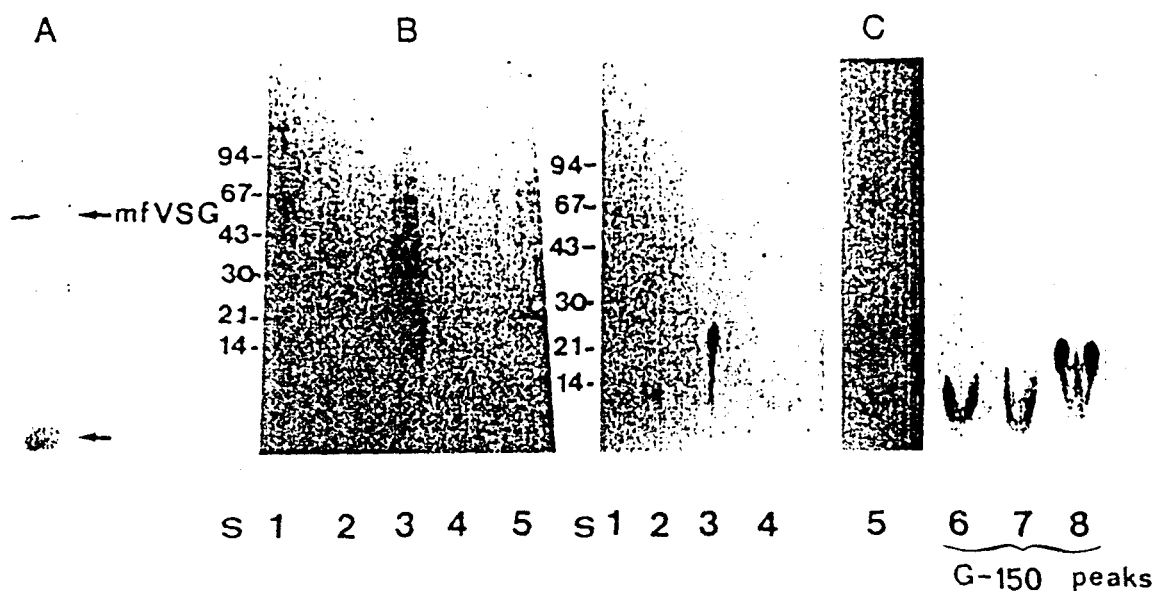


Fig. 1 : Analyses by SDS-PAGE of the different purification steps of trypanosomal lipophosphoglycan (t-LPG)
 A - Fluorography of the total [^3H]-myristic acid labeled trypanosomes (AnTat 1.1 l). mfVSG corresponds to the migration of membrane-bound form VSG.
 B - Coomassie Blue staining : lane 1 : VSG purified by Concanavalin A chromatography as in (12) ; lane 2 : organic phase I ; lane 3 : MgCl_2 extract ; lane 4 : organic phase II ; lane 5 : solvent E extract.
 C - PAS staining : lane 1 : VSG purified as in (12) ; lane 2 : organic phase I ; lane 3 : MgCl_2 extract ; lane 4 : organic phase II ; lane 5 : solvent E-extract ; lane 6,7 and 8 respectively peak A,B and C of G_{150} chromatography.

the cells to incorporate myristic acid into the components with apparent Mr 58 K (mfVSG) (Fig. 1A).

The chloroform/methanol/water (3:2:1) extraction of the whole [^3H] myristic acid labeled cells gave an organic phase (organic phase I) devoid of proteins as judging by Coomassie Blue SDS-PAGE (Fig 1B, lane 2) whereas by PAS staining a slight band was detected at the bottom of the gel (Fig. 1C, lane 2).

The trypanosome pellet was further purified by a 4 mM MgCl_2 extraction. The extracted compounds were analyzed by SDS-PAGE : (i) the Coomassie Blue staining showed for this sample multiple bands (Fig. 1B, lane 3) ; (ii) PAS staining evidenced also the liberation of a glycoconjugate that migrated as a diffuse band with apparent Mr 10.000-20.000 (Fig 1C, lane 3).

Finally, the trypanosomal residue was treated with polar solvent E, originally used for the selective extraction of complex glycolipids. By SDS-PAGE, the solvent E-extract contained : (i) a diffuse band (Mr 10,000-20,000) which reacted poorly with the Coomassie Blue (Fig 1B, lane 5) whereas PAS staining gave an intense reaction (Fig. 1C, lane 5) ; (ii)

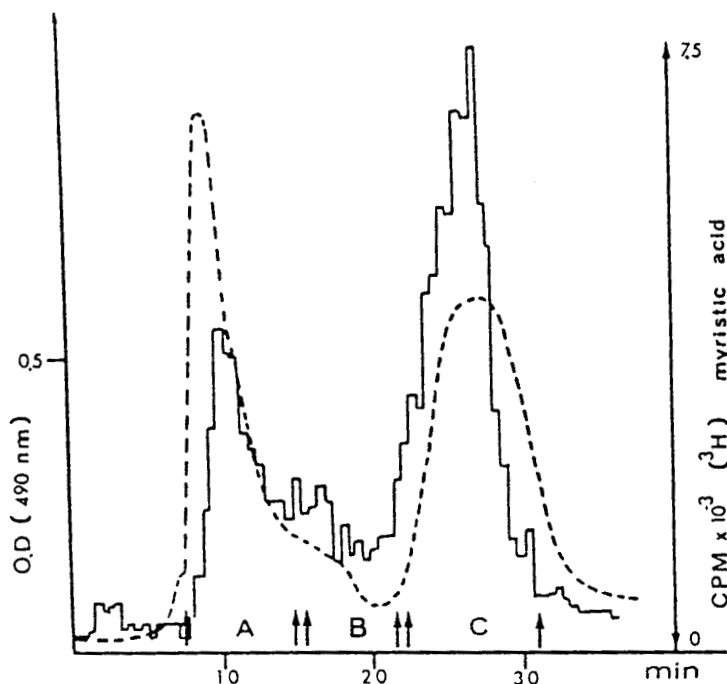


Fig. 2 : Elution profile of solvent E-extract on G_{150} column ; the dotted lines represent the profile obtained after phenol sulfuric acid reaction and absorbance at 490 nm. The solid lines represent the $[^3\text{H}]$ -myristic acid radioactivity in each fraction (0.5ml).

contaminating glycoconjugates were only detected by overloading the acrylamide gel (Fig. 1C, lane 5).

To achieve the purification and remove the higher mol.wt. glycoconjugates, a gel filtration chromatography, on sephadex G_{150} column, was performed and the elution profile revealed two resolved peaks (peak A and C) and a shoulder (peak B) detected by phenol-sulfuric acid reaction (Fig. 2).

The analysis by SDS-PAGE indicated that peak C was still heterogeneous but the band of Mr 10,000 - 20,000 appeared in higher amount (Fig 1C, lane 8). By using the solvent E-extract from $[^3\text{H}]$ -myristic acid labeled cells, the radioactivity was especially found in peak C (Fig. 2).

To define the chromatographic properties of the different extracted compounds, analyses by thin layer chromatography (TLC) were performed after several separate labeling experiments : ($[^3\text{H}]$ -myristic acid ; $[^{32}\text{P}]$ phosphate ; $[^3\text{H}]$ -galatose). Using the conditions described by Orlandi and Turco (11) the peak C, obtained by solvent E extraction and G_{150} gel filtration chromatography, contained essentially a pure glycolipid (positivity by orcinol-sulfuric acid reaction and $[^3\text{H}]$ -myristic acid labeled. This glycolipid migrated by TLC (solvent A) at $R_f = 0.62$ (Fig. 3A, lane 4). The same $[^3\text{H}]$ -myristic acid compound was isolated from the *T. brucei brucei* variant AnTat 1.8 (Fig 3B, lane 4). In addition, the other labeling experiments led us

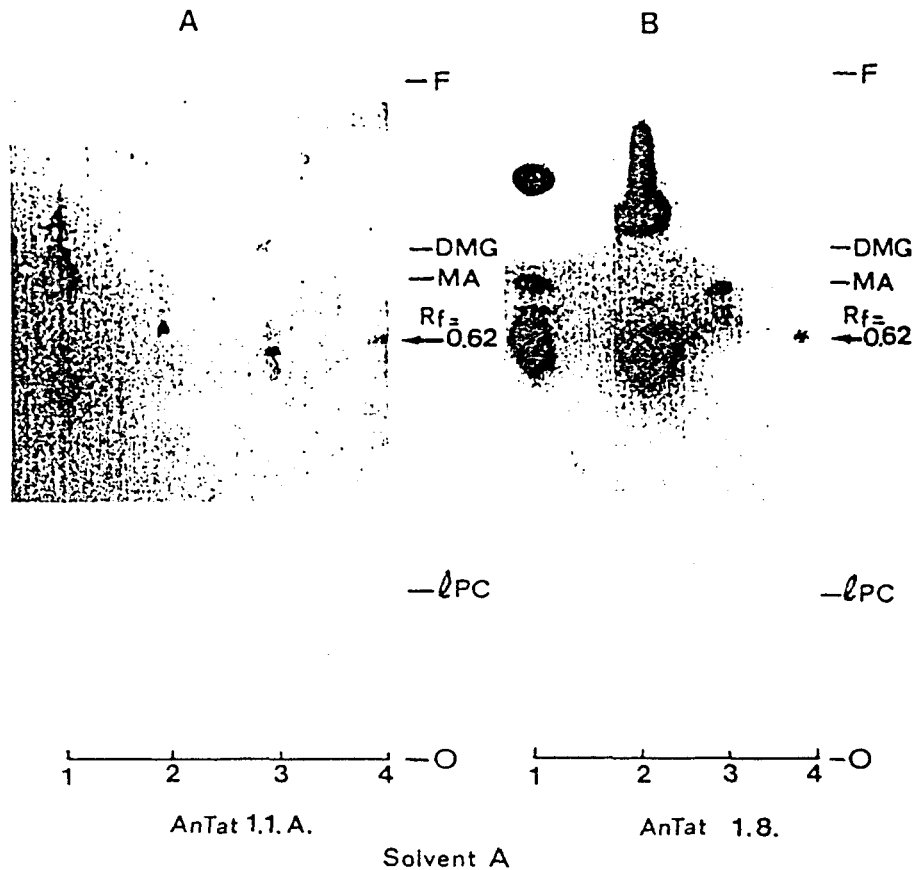


Fig. 3 : Thin layer chromatography analyses of extract from
 A - AnTat 1.1 A [³H]-myristic acid labeled trypanosomes, lane 1 : organic phase I ; lane 2 : MgCl₂ extract ; lane 3 : organic phase II ; lane 4 : solvent E₃ extract.
 B - AnTat 1.8 [³H]-myristic acid labeled trypanosomes, lane 1 : organic phase I ; lane 2 : MgCl₂ extract ; lane 3 : organic phase II ; lane 4 : solvent E-extract
 The TLC plates were developed in solvent A. (MA) = myristic acid ; (DMG) = dimyristylglycerol ; O = origin ; F = front.

to show that the compound at R_f = 0.62 was phosphorylated (Fig. 4) but, whatever under the conditions used, no [³H]-galactose was incorporated.

Using the [³²P] phosphate labeled *T. brucei brucei* (AnTat 1.1) and under more apolar TLC conditions (solvent B), it has been noted that the different steps of delipidation (organic phases I and II) (Fig 5, lane 1 and 3 respectively) and the MgCl₂ extraction (Fig. 5, lane 2) released different amounts of phospholipid, whereas solvent E-extract only contained a spot at R_f = 0.14 (Fig; 5, lane 4).

In order to correlate our results to those obtained by Krakow *et al.* (2), we also used their extraction conditions. The analysis by TLC (solvent B) of [³²P] phosphate extract from AnTat 1.1 revealed five labeled spots at respective R_f 0.14 ; 0.52 ; 0.61 ; 0.65 and 0.81 referred, by Krakow *et al.* (2) as lipids C, I, J, K and myristic acid (MA) respectively (Fig. 5, lane 5).

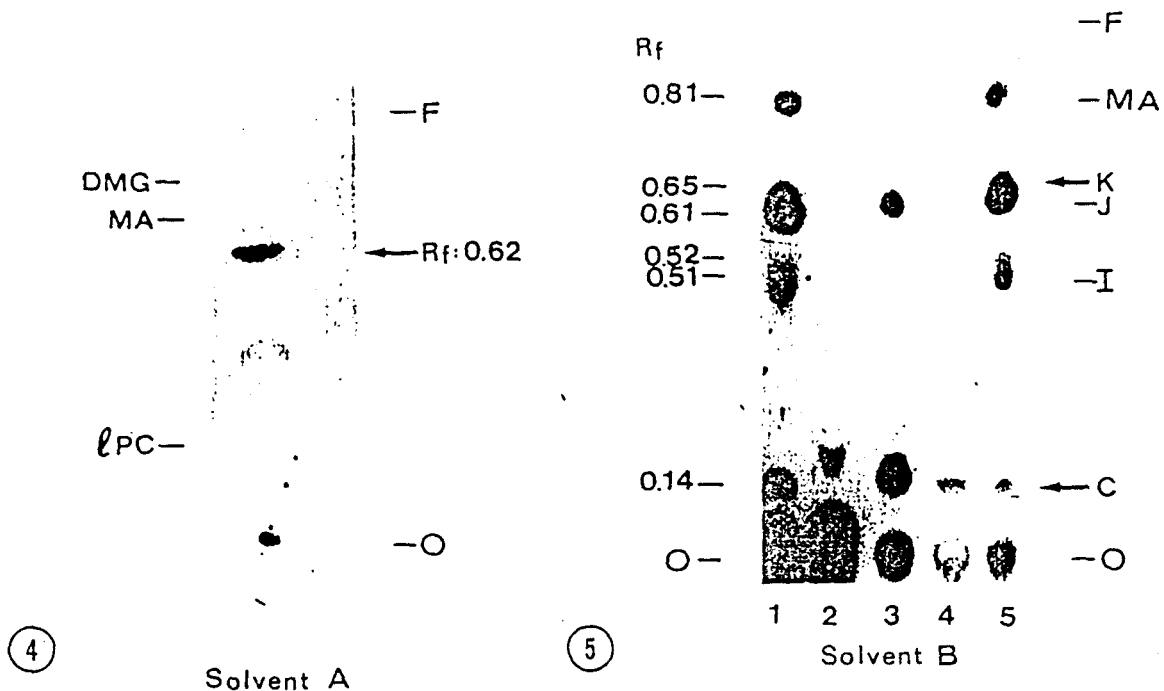


Fig. 4 : Thin layer chromatography of solvent E-extract from AnTat 1.1 [^{32}P] phosphate labeled trypanosomes. The plates was developed in solvent A. (MA) = myristic acid ; (DMG) = dimyristyl glycerol ; (lPC) = lysophosphatidyl choline ; O = origin ; F = front

Fig. 5 : Thin layer chromatography analyses of extracts from [^{32}P] phosphate labeled trypanosomes.
Lane 1 : organic phase I ; lane 2 : MgCl_2 extract ; lane 3 : organic phase II ; lane 4 : solvent-E extract ; lane 5 : phospholipids extracted according to the Krakow *et al.* (2) procedure.
The plate was developed in solvent B ; (MA) = myristic acid ; (DMG) = dimyristylglycerol ; positions of the different lipids as referred by Krakow *et al.* (2) according to their respective Rf.

Also we found that spots corresponding to the Rf 0.14 and 0.65 (related to lipids C and K) were glycosylated [positivity by silver-nitrate and orcinol sulfuric acid stainings (data not shown)]. These results suggested that the lipophosphoglycan (Rf = 0.14), selectively extracted according to the procedure of Orlandi and Turco (11) had the same TLC behaviour (solvent B) than the glycolipid C described by Krakow *et al.* (2) (Fig. 5, lane 4 and 5).

The HPLC fractionation of solvent E-extract of [^3H]-myristic acid labeled trypanosomes was used for further purification of the t-LPG (Fig. 6). Only the peak 4 (at time $t = 15.9$ min) contained the t-LPG as detected by TLC analysis (solvent A, Rf = 0.62) of the different HPLC fractions (data not shown).

DISCUSSION

The relationship between the configuration of the VSG in solution and the VSG in the trypanosome surface coat to the way in which trypanosomes evade the immune system, has become the focus of important researches and has still to

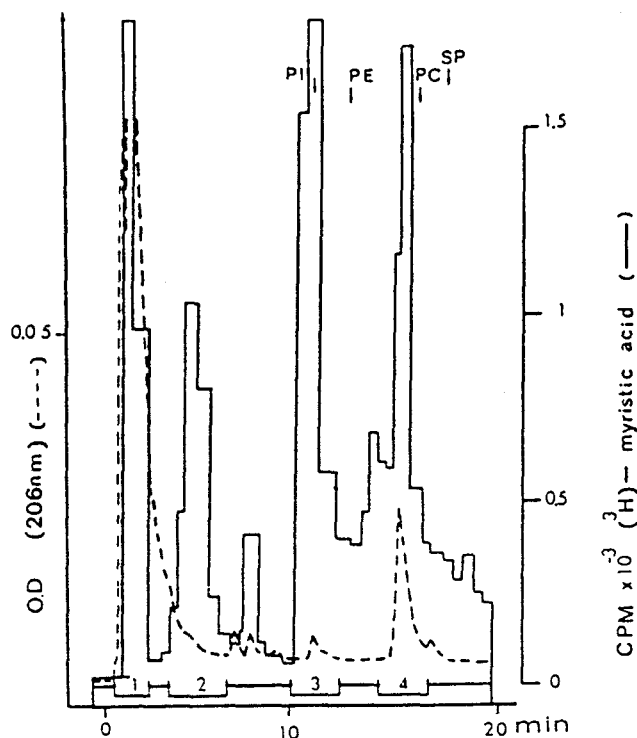


Fig. 6 : Profile of [^3H]-myristic acid solvent E-extract from AnTat 1.1 A on Si-60 HPLC column. Dotted lines represent the UV absorbance profile at 206nm. Solid lines represent the [^3H]-myristic acid radioactivity measured in each fractions (1ml).

(PI, PE, PC, SP correspond to the elution time for standard lipids phosphatidyl inositol, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl choline and sphingomyelin respectively).

be elucidated (17). Several reports have been suggested that many factors, such as *N*-linked oligosaccharides and/or lipid-containing species are directly involved the trypanosome surface coat assembly and, therefore a structural heterogeneity is found in the different VSG preparations (12).

In this paper, we report the presence of trypanosomal lipophosphoglycan (t-LPG) having electrophoretic and chromatographic properties similar to the lipophosphoglycan described for *Leishmania donovani* α -LPG. The α -LPG is becoming the well documented structure (1) and the possibility arises that the α -LPG is involved in important biological functions playing a major role in host-parasite interaction : it is proposed that the α -LPG prevents the enzymatic digestions of the parasites by lysosomes of phagocytic cells and it is also able to stimulate the immune system from patients (9). However, it has been recently demonstrated that the α -LPG is not directly involved in the macrophage infection process in vitro (mutant R_2D_2 of *L. donovani* lacking its LPG) (10). Thus, it is thought that the function of the α -LPG would be rather to occur in the organization of the plasma membrane.

Using the same extraction and purification procedures than those described by Orlandi and Turco (11) for Leishmania (solvent E extraction), our attempt is to identify a such important molecule for another trypanosomatid (T. brucei brucei). Although a trypanosomal LPG is found to migrate at the $R_f = 0.62$ by TLC in 1-propanol/pyridine/water system (solvent A), and, to have a characteristic behaviour by SDS-PAGE (MR 10,000 to 20,000 as a diffuse band), the t-LPG differs from the α -LPG : (i) no precipitation could be obtained in 50% methanol preventing the final purification step of the t-LPG ; (ii) the t-LPG is a myristate lipid-containing specie instead of a palmitate ones for the α -LPG (11).

Furthermore, the TLC analysis under more apolar conditions (solvent B) indicates that solvent E-extract (t-LPG) presents also similirarity to trypanosomal glycolipid C described by Krakow et al. (2). This glycolipid C compound has been described to have some properties which suggest whether it is the immediate VSG anchor precursor or whether it is an intermediate in the pathway to the final precursor. However, no further investigations have been performed to characterize the structure of the glycolipid C component. Recently, a candidate glycolipid precursor has been defined by TLC using another kind of metabolically labeled trypanosome extraction (18). It has been assumed that " P_3 glycolipid" is similar or identical to the [3H] myristic acid-lipid C described by Krakow et al. (2) and in agreement with our results, it contains myristic acid, phosphate but no galactose (18). In any case, it remains of great interest to determine the exact nature and function of such component.

On the other hand, some preliminary reports show that immunogenic glycolipids are also present in epimastigotes of Trypanosoma cruzi and that antibodies against specific glycolipids in the Trypanosomatidae parasites appears to be essential and a dynamic pool which will be involved in the modulation, regulation and membrane-association of proteins, as well as for the "amphitropic proteins" described by Burn (20) as new class of membrane proteins.

In further investigations, we intend to undertake the complete purification by HPLC and extensive structural analyses of solvent E extract t-LPG in order to assess the existence of a common lipid-containing structure for all trypanosomatids. Moreover, it must be emphasized on the exact role of glycolipids for the protein organization in the trypanosome surface coat.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank Dominique Demeyer for the helpful technical assistance.

REFERENCES

- 1 - Turco, S.J., Hull, S.R., Orlandi, P.A.Jr., Sheperd, S.D., Homans, S.W., Dwek, R.A. and Rademacher, T.W. (1987) *Biochemistry*, 26, 6233-6238.
- 2 - Krakow, J.L., Herald, D., Bangs, J.D., Hart, G.W. and Englund, P.T. (1986) *J. Biol. Chem.*, 261, 12147-12153.
- 3 - Dwyer, D.M., (1981) in *The Biochemistry of Parasites* (Slutzky, G.M., ed) pp 9-28, Pergamon Press, Oxford.
- 4 - Ferguson, M.A.J., Haldar, K. and Cross, G.A.M. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 4963-4968.
- 5 - Bouvier, J., Etges, R.J. and Bordier, C. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 15504-15509.
- 6 - Chang, K.P. (1981) *Mol. Biochem. Parasitol.*, 4, 67-76.
- 7 - Brett, C.T. and Voorheis, H.P. (1980) *Eur. J. Biochem.*, 109, 139-150.
- 8 - King, D.L., Chang, Y.D. and Turco S.J. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.*, 24, 47-53.
- 9 - Mc Neely, T.B. and Turco, S.J. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 148, 653-657.
- 10- King, D.L. and Turco, S.J. (1988) *Mol. Biochem. Parasitol.*, 28, 285-294.
- 11- Orlandi, P.A.J. and Turco, S.J. (1987) *J. Biol. Chem.*, 262, 10384-10391.
- 12- Tetaert, D., Gomes, V., Huet-Duvillier, G., Demeyer, D., Hublart, M., Boersma, A. and Degand, P. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 144, 1222-1228.
- 13- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- 14- Laemmlı, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
- 15- Humbel, R. and Collart, M. (1975) *Clin. Chim. Acta.*, 60, 143-145.
- 16- Trevelyan, W.E., Procter, D.P. and Harrisson, J.S. (1950) *Nature*, 166, 444-445.
- 17- Carrol, M. and McCrorie, P. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.* 88B, 7-12.
- 18- Menon, A.K., Mayor, S., Ferguson, M.A.J., Duszenko, M. and Croos, G.A.M. *J. Biol. Chem.* (1988) 263, 1970-1977.
- 19- Kaneda, Y., Tachibana, H. and Goutsu, T. (1987) *J. Parasitol.* 73, 658-663.
- 20- Burn, P. (1988) *Trends Biochem. Sci.* 13, 79-83.



Parmi les éléments cliniques et biologiques caractérisant la maladie du sommeil, l'apparition d'un hypogonadisme représente un élément de grande fréquence. Notre possibilité de réaliser des explorations, par des dosages radioimmunologiques des hormones sexuelles sur un nombre significatif de malades infectés par Trypanosoma brucei gambiense, a permis de mesurer l'importance du dysfonctionnement endocrinien. Par des explorations dynamiques de l'axe gonadotrope, une origine supra ou extra hypophysaire à l'hypogonadisme peut être évoquée.

L'adaptation sur le modèle animal, nous a permis d'explorer dans son ensemble l'axe hypothalamo hypophyso gonadotrope du rat infesté par Trypanosoma brucei brucei. Parmi les résultats originaux seront soulignés :

- l'effet in vivo, de l'antigène variable de surface (VSG) qui entraîne une hyposécrétion de testostérone accompagnée d'une diminution de synthèse de l'hormone lutéinisante hypophysaire (LH).

- l'effet in vitro d'extraits parasitaires qui préparés en présence ou en absence d'antiprotéases provoquent une dissociation de la LH en ses deux sous unités libres ou une dégradation plus complète de la gonadostimuline.

A la lumière de ces résultats, différentes hypothèses physiopathologiques sont présentées. Sans conteste, le rôle des constituants membranaires de surface du trypanosome dans la relation hôte-parasite est mis en évidence.