

50376  
1989  
233

50376  
1989  
233

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

---

Année 1989

N° d'ordre : 467

**THÈSE**  
**DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ**

(Nouveau Régime)

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

**DOCTEUR DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ**

par

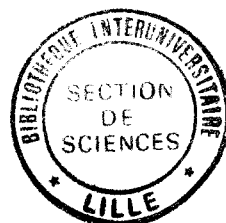
**François BOUTIGNON**

**APPROCHE BIOCHIMIQUE**  
**DES DÉFICITS IMMUNITAIRES ET ENDOCRINIENS**  
**OBSERVÉS AU COURS DE L'INFESTATION EXPÉRIMENTALE**  
**DU RAT PAR TRYPANOSOMA BRUCEI BRUCEI**

Présentée le 19 Décembre 1989 devant la Commission d'examen

**JURY**

Président : Professeur J. MONTREUIL  
Rapporteurs : Professeur J.P. DESSAINT  
Professeur B. FOURNET  
Examineurs : Professeur F. GAUTHIER  
Professeur P. 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.

à Béatrice

Je remercie Monsieur le Professeur Roussel de m'avoir accueilli à l'Unité des Protéines.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Degand qui m'a accepté dans son laboratoire et surtout qui m'a donné goût à la recherche.

Je remercie :

Monsieur le Professeur Capron de m'avoir permis de travailler au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire ;

Monsieur le Professeur Dessaint et Madame Christine Mazingue qui m'ont conseillé sur le plan immunologique ;

Monsieur le Professeur Gauthier qui est intervenu dans la partie enzymologique ;

Messieurs les Professeurs Montreuil, Degand, Dessaint, Dwek, Fournet, Gauthier et Verbert d'avoir accepté de lire ce travail et de constituer mon jury.

Mes chaleureux remerciements à Madame Guillemette Huet qui a su me transmettre sa rigueur et sa tenacité scientifique, à Madame Colette Richet et Madame Dominique Demeyer sans qui la thèse ne serait pas, à Madame Marylène Hublart qui m'a aidé dans la partie endocrinologique, et enfin à tous les membres du groupe qui m'ont apporté conseils et soutien tout au long de ces quatre années.

Enfin, je remercie les membres du secrétariat : Mesdames Chantal Loison, Marie-France Narula pour leur précieuse et efficace intervention dactylographique.

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

### 1) Publications

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

Molecular heterogeneity of the isolated surface glycoprotein variant AnTat 1.1 of T. b. brucei.

Biologogy of the Cell, 64, 131-135.

HUBLART, M., MENDONCA-PREVIATON, L., BOUTIGNON, F., HUET-DUVILLIER, G., DEGAND, P. (1988).

Evidence or myristilated disulfide-linked dimer of variant surface glycoprotein of Trypanosoma brucei brucei.

Comp. Biochem. Physiol., 92 B, 705-710.

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

Gonadotropic axis and Trypanosoma brucei gambiense infection.

Ann. Soc. Belge Med. Trop., 69, 127-135.

BOUTIGNON, F., HUET-DUVILLIER, G., MENDONCA-PREVIATO, L., GOMES, V., HUBLART, M., DEGAND, P.

Variant surface glycoprotein of Trypanosoma brucei brucei AnTat 1.1 : influence of the isolation conditions upon the disulfide linked dimer/monomer ratio.

Comp. Biochem. Physiol., sous presse.

### 2) Communications

TETAERT, D., GOMES, V., DUVILLIER, G., BOUTIGNON, F., DEMEYER, D., DEGAND, P. (1985)

Etude par RP-HPLC du polymorphisme moléculaire de l'antigène variable de T. b. brucei AnTat 1.1.

Colloque INSERM, Mont Saint Odile, OTTROT, mai 1985.

HUBLART, M., BOUTIGNON F., GOMES, V., RICHET, C., VERVOORT, T., DUVILLIER, G. (1986).

Insertion membranaire de l'antigène variable de surface de Trypanosoma brucei brucei.

Colloque du GPLF - Groupement des Protistologues de Langue Française, Barcelone 8-11 mai 1986, Espagne.

TETAERT, D., GOMES, V., DUVILLIER, G., BOUTIGNON, F., DEMEYER, D., DEGAND, P. (1986)

Etude par RP-HPLC du polymorphisme moléculaire de l'antigène variable de Trypanosoma brucei brucei AnTat 1.1.

Colloque du GPLF - Groupement des Protistologues de Langue Française, Barcelone 8-11 mai 1986, Espagne.

BOUTIGNON, F., GOMES, V., HUET G., HUBLART, M., RICHET, C., FOURNET, B., BOERSMA, A. (1987).

Glycosylation of a variant surface antigen from Trypanosoma equiperdum.

Glycoconjugates. Proceedings of the IXth International Symposium, Lille, France, 6-11 july.

BOUTIGNON, F., GOMES, V., HUBLART, M., TETAERT, D., HUET, G., BOERSMA, A., DEGAND, P. (1987)

Données structurales. Etats de polymérisation de l'antigène de surface du variant AnTat 1.1 de Trypanosoma brucei brucei.

IVe Forum des Jeunes Chercheurs, Lyon, Villeurbanne, Septembre 1987.

GOMES, V., HUET, G., TETAERT, D., BOUTIGNON, F., DEMEYER, D., VERVOORT, T., BOERSMA, A. (1987).

Polymers of the surface glycoproteins of variants AnTat 1.10 and 1.8 of T. brucei brucei and variant BoTat 1 of equiperdum.

Glycoconjugates. Proceedings of the IXth International Symposium, Lille, France 6-11 july.

GOMES, V., HUET, G., BOUTIGNON, F., AUBERT, J.P., VAN MEIRVENNE, N., DEGAND, P. (1988).

Interaction between human high density lipoproteins and T.b. brucei AnTat 1.1 variant surface glycoprotein.

12th International Congress for Tropical Medicine. Satellite Symposium 30th International Colloquium Institute of Tropical Medicine, Antwerpen, Belgium, 15-16 septembre.

BOUTIGNON F., CHAGNON, J.L., RICHET, C., MAZINGUE, C., DEGAND, P.  
(1989).

Deficit immunitaire et trypanosomiase africaine : Relation entre manteau de surface du parasite et réponse lymphocytaire. Résultats préliminaires.

XXe Congrès National de Médecine Interne, Lille, 8-9-10 Juin

## ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

|             |                                                             |
|-------------|-------------------------------------------------------------|
| ACTH        | Hormone adrénocorticotrope                                  |
| AG          | Antigène                                                    |
| ANTAT       | Anvers Trypanozoon antigénic type                           |
| AVS         | Antigène variable de surface                                |
| BCDF        | B cells differentiating factor                              |
| BCGF        | B cells growth factor                                       |
| BME         | B -mercaptoéthanol                                          |
| BSF         | B stimulating factor                                        |
| CD          | Clustor of differentiation                                  |
| CMH         | Complexe majeur d'histocompatibilité                        |
| CON-A       | Concanavaline A                                             |
| CPA         | Cellules présentatrices de l'antigène                       |
| DG          | Diacylglycerol                                              |
| DTT         | Dithiothreitol                                              |
| E-64 :      | L-trans -Epoxy succinyl-leucylamido (4-guanidino)<br>butane |
| ELC         | Expression linked copy                                      |
| ESAG        | Expression site associated gene                             |
| FSH         | Hormone folliculo-stimulante                                |
| Gal         | Galactose                                                   |
| Glc         | Glucose                                                     |
| GlcNac      | N acétyl glucosamine                                        |
| GSH         | Glutathion réduit                                           |
| GSSG        | Glutathion oxydé                                            |
| hCG         | Chariogonotropine humaine                                   |
| HDL         | High density lipoprotein                                    |
| HPLC        | Chromatographie liquide haute performance                   |
| IFN         | Interferon                                                  |
| IgG         | Immunoglobulines G                                          |
| IgM         | Immunoglobulines M                                          |
| IL-1, IL-2, | Interleukines 1,2                                           |
| IPz         | Inositol triphosphate                                       |
| LB          | Lymphocyte B                                                |
| LCR         | Liquide céphalorachidien                                    |
| LFA I       | Lymphocyte function-associated antigen-I                    |
| LH          | Hormone luteinisante                                        |



|                  |                                                          |
|------------------|----------------------------------------------------------|
| LH-RH            | Luteotropin hormone-realeasing hormone                   |
| LPS              | Lipopolysaccharide                                       |
| LT               | Lymphocyte T                                             |
| LTc              | Lymphocyte T cytotoxique                                 |
| LTh              | Lymphocyte T helper                                      |
| MØ               | Macrophages                                              |
| MAF              | Macrophage activating factor                             |
| Man              | Mannose                                                  |
| NADPH            | Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form |
| NEM              | N-ethylmaleimide                                         |
| NMec             | N-méthyl-coumarine                                       |
| pCMPSA           | Acide p-chloromercuriphénylsulfonique                    |
| PHA              | Phytohémagglutinine                                      |
| PGE              | Prostaglandine                                           |
| Pi               | Phosphore inorganique                                    |
| PIP <sub>3</sub> | Phosphatidyl inositol triphosphate                       |
| PKC              | Protéine kinase C                                        |
| PL               | Phospholipide                                            |
| PLC              | Phospholipase C                                          |
| PMSF             | Fluorure de phenylmethysulfonyle                         |
| PrI              | Prolactine                                               |
| PSG              | Phosphate saline glucose                                 |
| R-IL-2           | Récepteur de l'interleukine 2                            |
| RMN              | Résonnance magnétique nucléaire                          |
| SNC              | Système nerveux central                                  |
| TLCK             | N-alpha-p-tosyl-L-lysylchloromethyl ketone               |
| TP               | Trypanothione peroxydase                                 |
| TR               | Trypanothione reductase                                  |
| TR               | Lymphocyte T receptor                                    |
| TSH              | Hormone thyreotrope                                      |
| Z                | Benzyloxycarbonyl                                        |

°00°

## TABLE DES MATIERES

°00°

## **GENERALITES : PREMIERE PARTIE**

### **INTRODUCTION**

#### **CHAPITRE I : BIOLOGIE DES TRYPANOSOMES AFRICAINS**

- A : PHYLOGENIE : p 5**
- B : CYCLE EVOLUTIF : p 5**
- C : LA VARIATION ANTIGENIQUE : p 8**

#### **CHAPITRE II : IMMUNOSUPPRESSION**

- A : INTRODUCTION**
  - 1. Spécificité inter-espèces : la résistance non immune : p 12
  - 2. Spécificité au sein des espèces : la résistance immune : p 13
- B : LE SYSTEME IMMUNITAIRE**
  - 1. Organisation de la réponse immunitaire : p 13
  - 2. Présentation des antigènes aux lymphocytes T : p 14
  - 3. Lymphokines et monokines : p 16
- C : REPONSE IMMUNITAIRE ET TRYPANOSOMIASE**
  - 1. La réponse immunitaire lors de l'infection : p 19
  - 2. L'immunosuppression : p 22

#### **CHAPITRE III : LE DYSFONCTIONNEMENT ENDOCRINIEN**

- A : LES HORMONES HYPOTHALAMO-ANTEHYPOPHYSAIRES**
  - 1. Axe hypothalamo-antéhypophysaire : p 30
  - 2. Hormone hypothalamique (LH-RH) : p 30
- B : TROUBLES ENDOCRINIENS RENCONTRES AU COURS DE LA TRYPANOSOMIASE AFRICAINE**
  - 1. Manifestations endocriniennes chez l'homme : p 35
  - 2. Manifestations endocriniennes chez l'animal : p 37

#### **CHAPITRE IV : BIOCHIMIE ET ROLES DES CONSTITUANTS DE SURFACE DU TRYPANOSOME**

- A : L'ANTIGENE VARIABLE DE SURFACE**
  - 1. Préparation et purification : p 46
  - 2. Structure : p 47

**B : LES ENZYMES MEMBRANAIRES**

1. Enzymes membranaires relatifs à l'AVS : p 53
2. Autres enzymes décrits : p 53
3. Les enzymes protéolytiques et les enzymes du métabolisme oxydatif : p 56

**RESULTATS : DEUXIEME PARTIE**

**CHAPITRE I : PREPARATION ET ETUDE BIOCHIMIQUE DU MATERIEL DE SURFACE PARASITAIRE**

**A : OBTENTION DES PARASITES**

**B : TRAITEMENT DES CULOTS PARASITAIRES**

1. Préparation et purification de l'antigène de surface sous "forme soluble" : p 61
2. Préparation de l'antigène de surface "sous forme membranaire" p 80

**C : ACTIVITES ENZYMATIQUES**

1. Activité AVS réductrice : p 83
2. Température, pH optimum, mécanisme d'intervention enzymatique p94
3. Identification d'effecteurs : p 97
4. Substrats potentiels : p 101

**D : ACTIVITES PROTEOLYTIQUES**

1. Surnageant de libération pH 5,5 et pH 7,0 : p 110
2. Fractions purifiées sur Concanavalline-A Sépharose (Fractions Con-A) : p 118

**CHAPITRE II : LE MANTEAU DE SURFACE DANS LE DIALOGUE IMMUNITAIRE**

**A : ETUDE IN VIVO**

**B : ETUDE IN VITRO**

1. Analyse directe : p 128
2. Analyse indirecte : p 133
3. Rôle des cellules accessoires : p 141
4. Inhibiteurs de protéases : p 143

## CHAPITRE III : ROLE DU MATERIEL DE SURFACE PARASITAIRE DANS LES DESEQUILIBRES ENDOCRINIENS

### A : ETUDE IN VIVO

1. Etude des dysfonctions endocriniennes provoquées par l'injection in vivo de matériel trypanosomal obtenu sans antiprotéases : p 146
2. Etude de la fonction gonadique après injection de fractions antigéniques purifiées : p 152

### B : ETUDE IN VITRO

1. Protocole expérimental : p 155
2. Etude électrophorétique de l'hormone lutéinisante de rat marquée à  $^{125}\text{I}$  : p 156
3. Etude électrophorétique de l'hormone marquée incubée en présence du culot parasitaire avec ou sans antiprotéases (culot pH 5,5): p 158
4. Etude électrophorétique de l'hormone marquée incubée en présence de l'extrait antigénique (surnageant pH 5,5) préparé avec ou sans antiprotéases : p 160

## CONCLUSION GENERALE

## INDEX TECHNIQUE

## BIBLIOGRAPHIE

°00°

PREMIERE PARTIE :

G E N E R A L I T E S

°00°

°00°

## I N T R O D U C T I O N

°00°

La trypanosomiase africaine sévit à l'état endémique en Afrique sub-équatoriale sous deux formes évolutives : la trypanosomiase ouest-africaine due à Trypanosoma brucei gambiense, d'évolution chronique et la trypanosomiase est-africaine due à Trypanosoma brucei rhodesiense, d'évolution plus aiguë. En fait, les différences entre les deux formes ne sont pas toujours aussi caricaturales. Au delà des "modèles", en effet une situation est souvent décrite, proche d'un système symbiotique, correspondant à une forme "tolérée" jusqu'au moment d'une expression chronique, sub-aiguë ou aiguë après plusieurs années d'incubation silencieuse. La "sensibilité" du sujet, son environnement, jouent très certainement dans ce domaine un rôle déterminant.

Nous décrirons les phases évolutives classiques de la maladie parasitaire qui évolue en deux périodes (Labusquière et coll. 1971 ; Gentilini et Duflot, 1973) : la phase lymphatico-sanguine et la phase de polarisation cérébrale.

## 1. Phase lymphatico-sanguine

La phase lymphatico-sanguine correspond à la période de dissémination des parasites dans l'organisme, dissémination qui s'accompagne de l'apparition d'éléments sémeiologiques et aussi d'un tableau biologique utilisable à des fins de diagnostic.

### a. Symptomatologie clinique

Il est classique de décrire :

- une fièvre, quasi constante, mais modérée (38 - 38,5°C) associée à une altération d'ailleurs variable de l'état général ;
- des adénopathies localisées, surtout au niveau des territoires cervicaux et sous-claviculaires ;
- une hépatosplénomégalie modérée ;
- enfin des signes inconstants cutanés à titre de trypanides (10%).

### b. Eléments biologiques

L'hématogramme révèle une anémie avec parfois auto-agglutination des hématies, une hyperleucocytose avec monocytose et plasmocytose. Certains plasmocytes se transforment en cellule de Mott, identifiables par le nombre et la taille des vacuoles qui les caractérisent.



Le protidogramme révèle une augmentation des globulines, particulièrement des IgM, qui atteignent rapidement quatre fois le taux normal chez 95% des sujets trypanosomés.

Ajoutons la vitesse de sédimentation qui en règle est très augmentée (100 à 150 mm à la première heure).

Si le début de la phase lymphatico-sanguine est comparable pour les formes aiguës ou chroniques de la trypanosomiase, la période dite de généralisation se caractérise dans le cas de T.b.rhodesiense par un tableau infectieux beaucoup plus sévère où fièvre, trypanides, troubles myocardiques et hépatiques occupent le premier plan. L'évolution sera sub-aigüe, inexorable, le décès du sujet intervenant en trois à six mois, sans permettre l'apparition de la seconde phase, dite phase de polarisation cérébrale qui caractérise l'évolution des formes chroniques à T.b. gambiense.

## 2. Phase de polarisation cérébrale ou phase méningo-encéphalitique

Elle se caractérise par une encéphalite mésenchymateuse périvasculaire et démyélinisante. Seule parmi les éléments de la première phase, la fièvre persiste, et s'ajoutent progressivement des signes neurologiques.

### a. Symptomatologie clinique

On décrit selon les sujets :

- des troubles sensitifs précoces avec hyperesthésies profondes ainsi que des paresthésies : crampes musculaires, névralgies, douleurs radiculaires ;
- des troubles psychiques ;
- des troubles du sommeil d'apparition plus tardive. A leur début, le rythme nyctéméral est souvent inversé. Plus tard, le trypanosomé entrera dans un état d'hébétude permanent, d'où le nom de Maladie du sommeil donné à la trypanosomiase humaine africaine :
  - des troubles moteurs (tremblements, crises convulsives) ;
  - des troubles endocriniens traduisant l'atteinte de l'axe diencéphalo-hypophysaire : troubles de la régulation thermique et de la soif ; perte de la libido, aménorrhée ; stérilité ; insuffisance thyroïdienne.

b. Eléments biologiques

- Le sang peut à ce stade être dépourvu de trypanosomes circulants. La plasmocytose signalée en première période est atténuée, le taux d'IgM reste toutefois élevé.

- Le liquide céphalorachidien (LCR) est anormal, on y trouve des lymphocytes en nombre et parfois des cellules de Mott. On note la présence d'IgM, caractéristique de la maladie lorsque son taux atteint 10% de la protéinorachie. La présence de trypanosomes dans le LCR a été signalée mais la mise en évidence des parasites est délicate.

En absence de traitement, le malade atteint par T.b. gambiense s'achemine vers une cachexie sommeilleuse progressive et bientôt terminale ; le sujet devient inexpressif, indifférent, décharné, grabataire, et sombre dans un coma au cours duquel il décèdera emporté le plus souvent par une infection intercurrente.

La figure 1 schématise le tableau clinique et biologique de la trypanosomiase. Notre présentation en introduction de ce mémoire ne fait que brosser à grands traits des éléments séméiologiques de la maladie qui sont l'expression du dialogue, du conflit entre le sujet infesté et le parasite.

Deux cadres ont retenu notre attention :

- celui du dysfonctionnement endocrinien
- celui du déficit immunitaire

Ils concernent tous les sujets et nous avons recherché si leur apparition, leur expression, et leur intensité ne pouvaient être rapprochées de la microbiologie de surface du parasite, véritable élément du dialogue entre le trypanosome et le sujet infesté.

## SYMPTOMATOLOGIE DE LA TRYPANOSOMIASE

### HUMAINE AFRICAINE

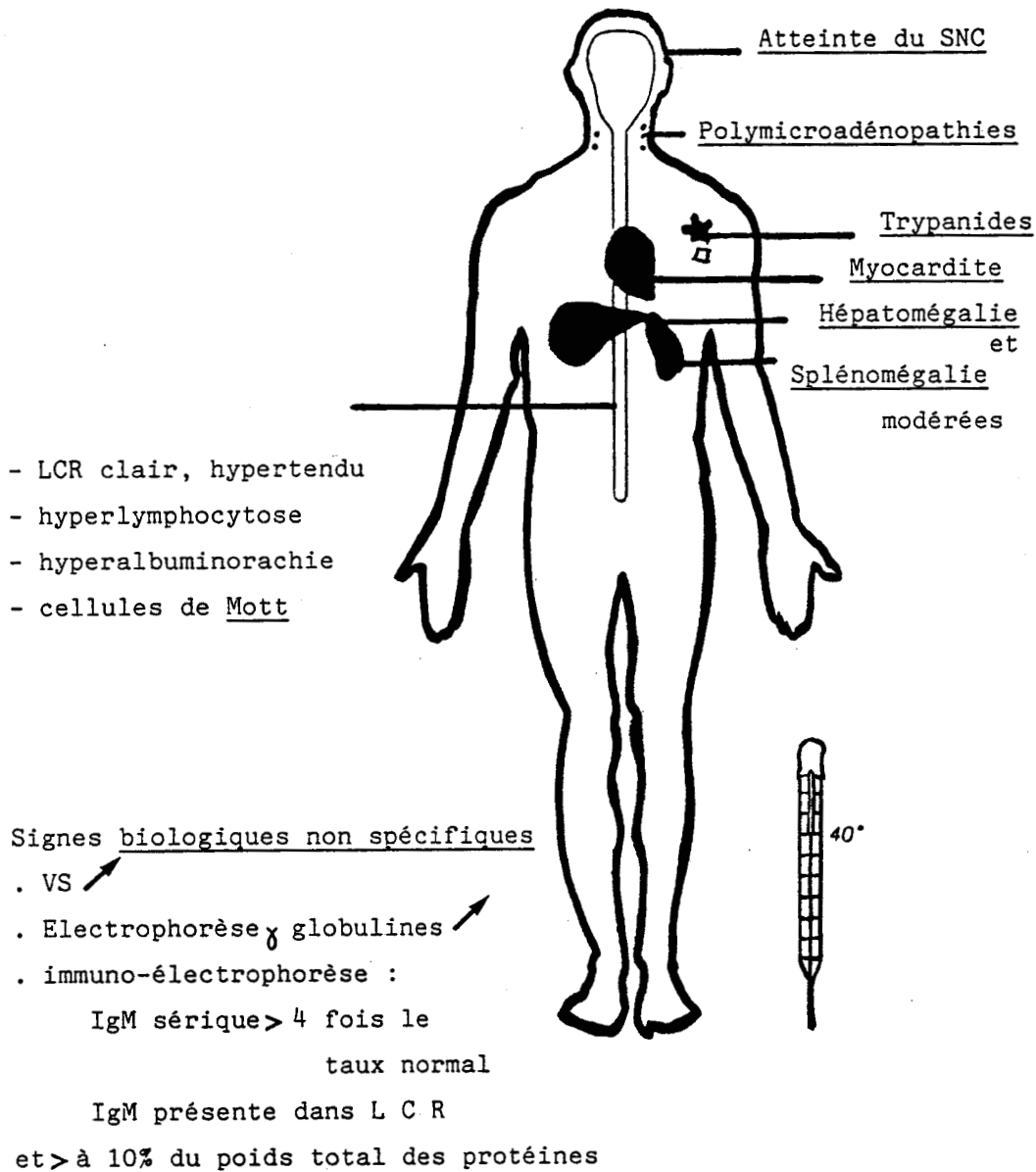


Figure 1

°00°

## CHAPITRE I

### BIOLOGIE DES TRYPANOSOMES AFRICAINS

°00°

#### A. PHYLOGENIE (Hoare, 1972)

Dans la vaste branche des protozoaires flagellés, les trypanosomes africains appartiennent au genre Trypanosoma, dont la caractéristique principale est de présenter au moins une fois au cours du cycle parasitaire des formes trypomastigotes, la forme trypomastigote se définissant par l'existence d'une membrane ondulante formée d'une expansion cytoplasmique limitée par le flagelle (Fig. 2) (Lumsden, 1974).

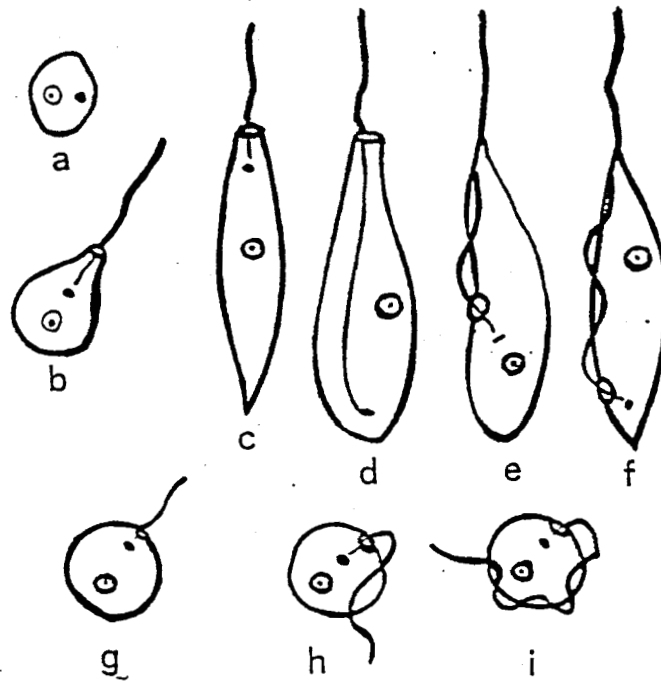
Les trypanosomes africains (section *salivaria*) se distinguent de leur homologues américains (section *stercoraria*) par l'hôte intermédiaire et le mode de transmission faisant intervenir un diptère du genre Glossina (mouche Tsé-Tsé). La classification originelle de Hoare divisait les *T.* africains du sous-genre Trypanozoon en fonction de nombreux critères (morphologiques, géographiques, hôtes), chaque espèce se rapportant à une maladie : *T. brucei brucei* (nagana chez l'antilope), *T. brucei evansi* (surra chez le chameau), *T. brucei equiperdum* (dourine chez le cheval), *T. brucei gambiense* et *T. brucei rhodesiense* (maladie du sommeil chez l'homme). Les deux dernières sous espèces se distinguent par leur aire géographique, leur spécificité d'hôte et nous l'avons vu la symptomologie qu'elles déterminent chez l'homme. La classification d'Hoare a été en partie simplifiée et l'on parle à l'heure actuelle par exemple de *T. evansi* et *T. equiperdum*.

La sous espèce *T.b.brucei* étant très proche des espèces pathogènes chez l'homme, et présentant une grande facilité d'adaptation sur rongeurs, constitue l'outil idéal d'approche biologique de la maladie.

#### B. CYCLE EVOLUTIF (Vickerman 1985) (Fig. 3)

Le cycle débute par l'inoculation lors du repas sanguin de la mouche Tsé-Tsé de formes métacycliques des trypanosomes présents dans les glandes salivaires. Ce cycle évolutif pour les parasites africains se déroule entièrement dans le sang et la lymphe ce qui n'exclut pas l'invasion d'autres tissus (ganglions, rate, testicule, liquide céphalorachidien). Les parasites sont extracellulaires et se multiplient par division binaire. L'évolution sanguicole se caractérise morphologiquement par une évolution progressive de formes longues et fines à forte capacité de division (*slender*) vers des formes trapues ne se divisant pas mais étant seules infestantes pour la mouche (*stumpy*). Les parasites sont ingérés par celle-ci et y subissent de nombreuses transformations

DIFFERENTES MORPHOLOGIES DEVELOPPEES PAR LES TRYPANOSOMATIDES (LUMDSEN 1974)



(a) amastigote, (b) choanomastigote, (c) promastigote, (d) ophistomastigote, (e) épimastigote, (f) trypomastigote, (g) (h) (i) sphaeromastigotes.

Figure 2

# CYCLE EVOLUTIF DES TRYPANOSOMES AFRICAINS

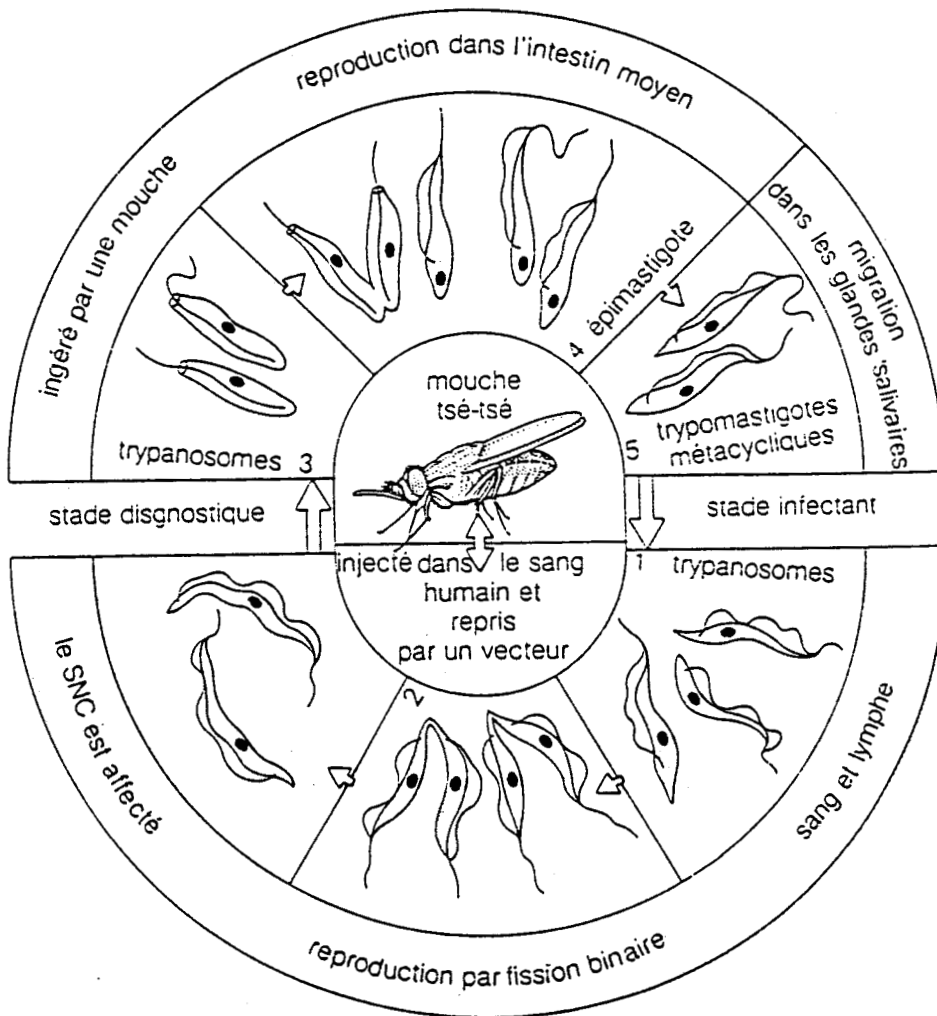


Figure 3

en traversant différentes régions, de l'intestin moyen aux glandes salivaires où ils adoptent la forme métacyclique infestante pour le mammifère. Après l'ingestion des parasites, la mouche ne devient infestante que 15 jours à 3 semaines plus tard. Seule la forme métacyclique possède en surface le "manteau", support de la variation antigénique, manteau qui est présent sur toutes les formes sanguicoles.

## C. LA VARIATION ANTIGENIQUE

### Introduction

La variation antigénique constitue dans le mode parasitaire, la meilleure stratégie d'échappement au système immunitaire de l'hôte. Le principe d'une variation biologique au cours de la trypanosomiase a été compris dès le début du siècle, mais c'est beaucoup plus tard que l'on a localisé en surface parasitaire l'élément variable, constitué d'un manteau de 15 nm d'épaisseur recouvrant la totalité du trypanosome (Vickerman, 1969). Ce manteau de surface résulte de l'assemblage d'une glycoprotéine appelée par la suite Antigène Variable de Surface (AVS) qui sera initialement purifiée et caractérisée par Cross (1975).

#### a. Principe

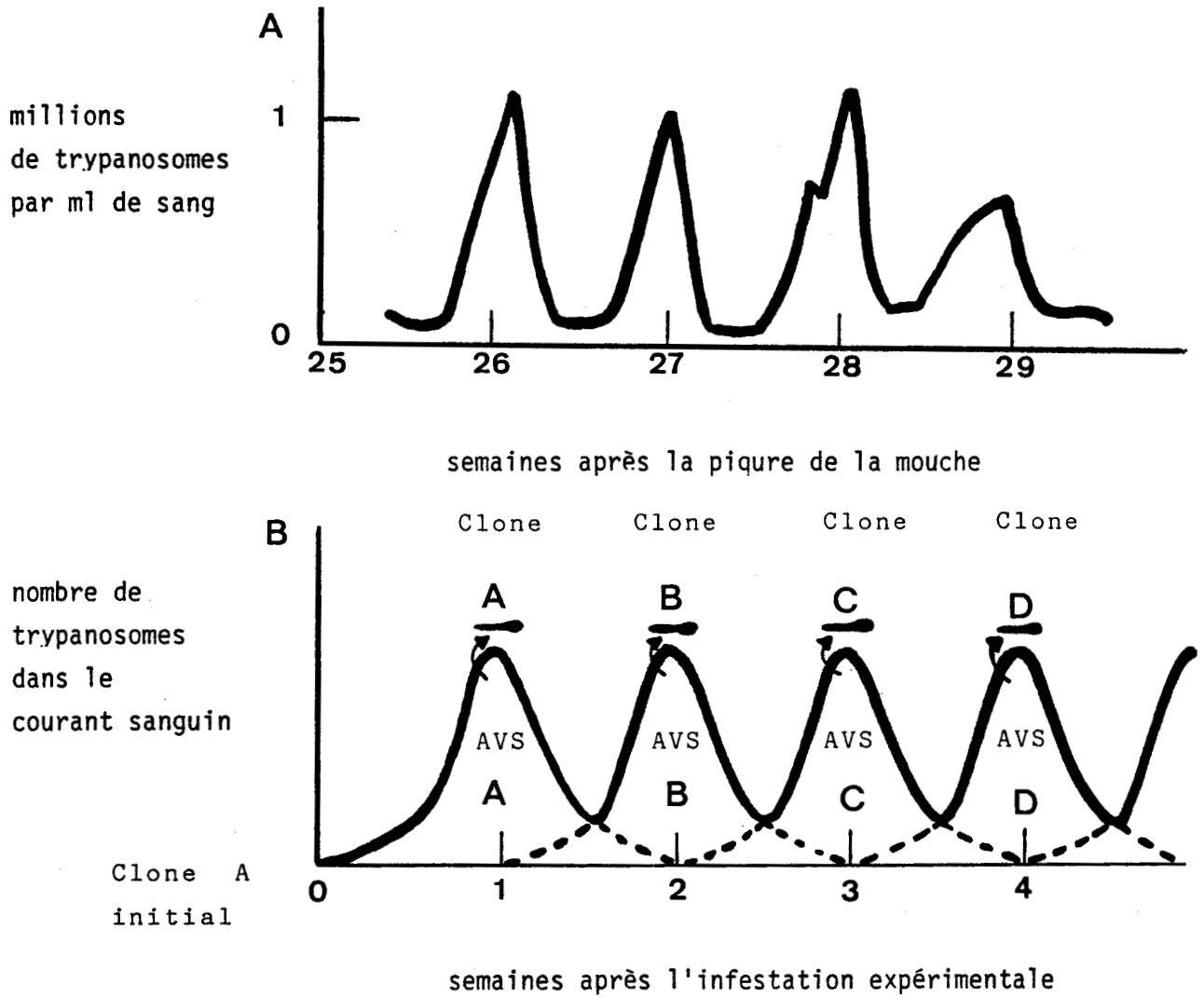
L'injection d'une population parasitaire exprimant le même AVS<sub>1</sub> (clone I) à un animal immunocompétent provoque un premier pic de parasitémie où tous les trypanosomes expriment l'AVS<sub>1</sub>. Le système immunitaire de l'animal tue la plupart des parasites, mais il suffit qu'un seul exprime un autre AVS (AVS<sub>2</sub>) de définition antigénique différente, pour que la parasitémie augmente à nouveau formant alors la seconde vague infestante (Fig. 4).

#### b. Mécanisme

Les gènes de l'AVS représentent 10% du potentiel génomique du parasite (Van der Ploeg et coll. 1982) et sont aussi susceptibles de s'exprimer sous la forme d'hybrides de gènes différents (Pays et coll. 1983a) ce qui augmente encore considérablement le répertoire antigénique possible en surface parasitaire. Pour qu'ils soient transcrits les gènes doivent se situer à proximité d'un télomère, et leur expression nécessite alors certains réarrangements : la



VARIATION ANTIGENIQUE LORS D'INFECTIONS A T.b.rhodesiense  
(d'après DONELSON 1988)



- A : vagues successives de parasitémie durant une infection suivie chez l'homme.
- B : exemple du contrôle de l'infection par un animal immunocompétant

Figure 4

plupart des gènes sont localisés à l'intérieur des chromosomes et sont tout d'abord dupliqués en un gène ELC (expression linked copy) qui est ensuite transposé dans un site télomérique d'expression. Les autres gènes télomériques peuvent aussi subir la duplication/transposition, ou un échange de segments avec une autre région télomérique (Fig. 5). Notons que la présence d'autres gènes, les ESAG (expression site associated genes) codant pour des protéines de rôle indéterminé, semble nécessaire à l'expression des gènes ELC (Pays, 1988).

Deux mécanismes sont à l'origine de la variation antigénique : le premier a pour but l'élimination fonctionnelle du gène "ancien" par conversion, recombinaison ou mutation ponctuelle ; le second est l'activation in situ du gène "nouveau". Indépendamment de la manière avec laquelle la transcription a été activée, il y a une expression préférentielle d'antigènes donnés. En effet, l'activation des ELC n'est pas due au hasard, et il a été montré que la succession des types antigéniques était plus ou moins constante pour une souche donnée (Capbern et coll. 1977). Les facteurs conduisant à l'expression sont multiples :

- la nature de l'antigène présent en surface : le changement ne doit pas perturber la cohésion du manteau, ce qui nécessite des structures proches entre les deux antigènes ;
- le degré de multiplication des trypanosomes : il dépend du type antigénique d'où une sélection possible ;
- la nature des anticorps circulants ;
- essentiellement l'environnement du gène, sa localisation, son orientation : les antigènes tardifs sont codés par les gènes internes ; la précocité relative d'expression des gènes internes dépend du degré d'homologie avec le site d'expression (Pays, 1988).

Au total, la variation antigénique n'est probablement pas le résultat d'un seul "déclic" mais le jeu de nombreux facteurs interactifs qui favorisent une expression séquencée des gènes (Boothroyd, 1985).

La possibilité d'adaptation d'un parasite sera fonction de la relation avec l'hôte infesté, cette relation aura

- pour l'infesté un objectif : limiter le développement du parasite
- pour le parasite : utiliser les réponses de l'hôte à son profit.

Le premier domaine concerné est le système immunitaire de l'hôte qui sera désactivé et rendu pratiquement inopérant, le second grand système de régulation profondément affecté étant le système endocrinien.

MECANISME DE LA VARIATION ANTIGENIQUE (d'après DONELSON 1988)

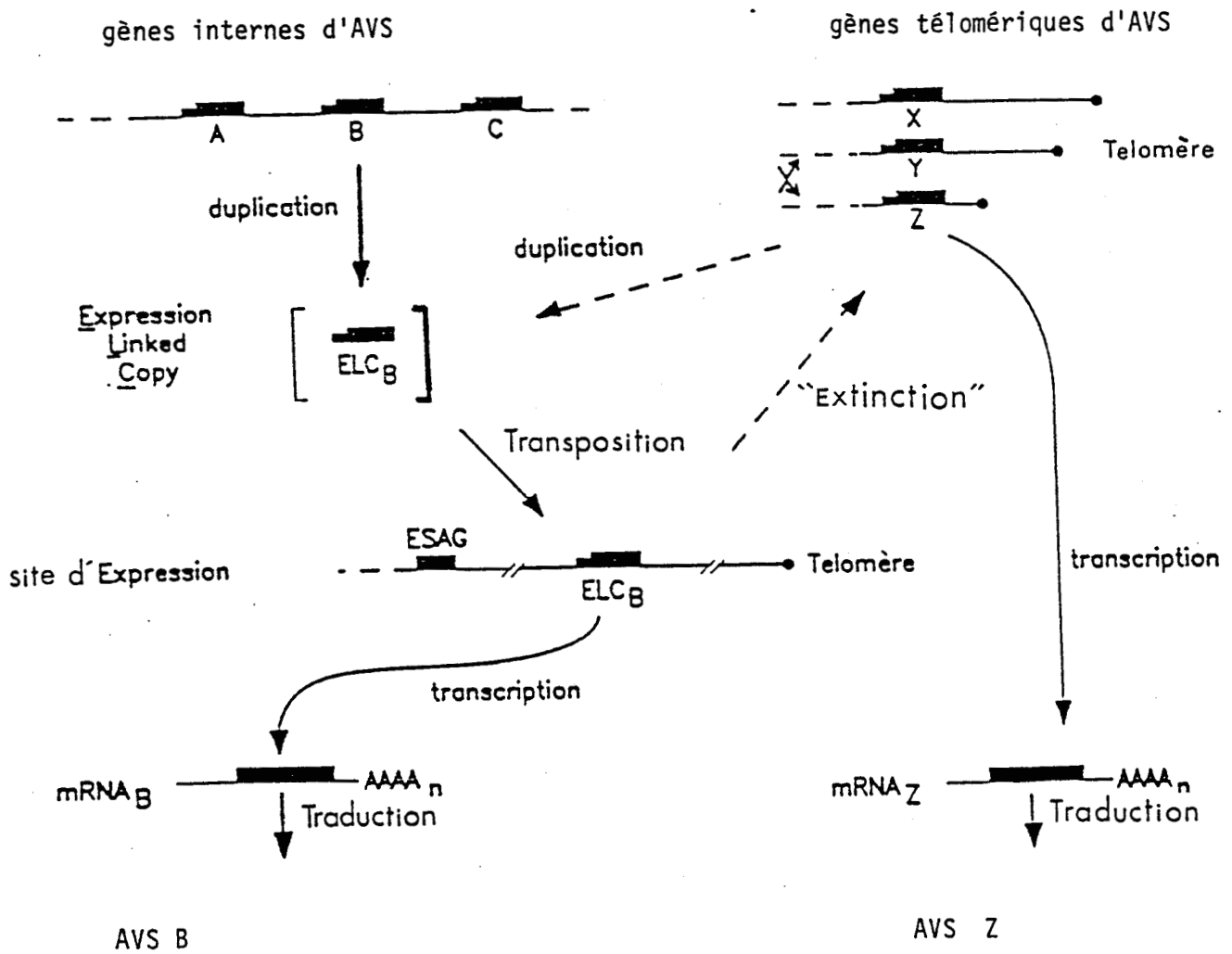


Figure 5

°00°

## CHAPITRE II

### IMMUNOSUPPRESSION

°00°

## A. INTRODUCTION

La "trypanotolérance" est un concept qui fait intervenir dans le relationnel hôte-parasite différents aspects. L'efficacité d'adaptation d'un parasite donné chez un hôte donné dépendra en effet de critères de spécificité entre les espèces ou au sein même des espèces. La réponse immune et par voie de conséquence l'immunosuppression s'inscrivent dans ce concept de spécificité. Avant de décrire l'état actuel des connaissances sur le phénomène et ses mécanismes, nous le resituerons dans le contexte de la trypanotolérance.

### 1. Spécificité inter-espèces : la résistance non immune

La spécificité entre les espèces intervient au niveau du parasite, de l'hôte intermédiaire et de l'hôte définitif (Hoare, 1972) (Baker 1974). Par exemple Trypanosoma brucei gambiense, est transmis préférentiellement par Glossina palpalis, et se développe essentiellement chez l'homme.

C'est surtout par des mécanismes non immuns qu'est contrôlée cette spécificité. Chez l'insecte où récemment Maudlin et Walburn (1988) ont montré que les mouches résistantes aux espèces T. congolense et T.b. brucei se débarrassent du parasite par agglutination lectinique dans l'intestin, alors que ce processus est aboli chez la mouche sensible en raison de l'existence de glucosamine libre reconnue par la lectine parasitaire ; chez l'hôte définitif, la trypanolyse de l'espèce T.b. brucei par le sang humain a fait l'objet de nombreuses études. Rifkin en 1978 attribue la résistance à un facteur trypanocide associé aux lipoprotéines de haute densité (HDL). Le résultat est étayé par le fait que le sang de patients atteints de la maladie de Tangier, caractérisée par un déficit en HDL, ne contient pas l'activité trypanocide. Le même auteur (1983, 1984) précise l'action du facteur trypanocide en montrant que la fluidité membranaire du manteau de surface est un élément déterminant dans l'interaction des HDL avec la membrane plasmique, cette interaction provoquant des perturbations dans la perméabilité cellulaire qui aboutissent à la lyse osmotique des parasites. Cependant, Rifkin n'a pu démontrer directement l'existence de processus d'interaction. Ces processus ont été décrits par Gillett et Owen (1987) qui postulent que les HDL se fixent sur les parasites de manière saturable par l'intermédiaire de l'apolipoprotéine A, ou insaturable par l'intermédiaire de l'apolipoprotéine E. Des études biochimiques récentes du facteur trypanocide ont donné des résultats contradictoires : Hadjduck et coll. (1989) montrent que le facteur appartient à une sous population HDL de masse

moléculaire 490kd, contenant les apolipoprotéines AI AII CI CII et CIV, ainsi que d'autres protéines essentielles dont l'activité est inhibée par les agents réducteurs. De plus, ils suggèrent que la lyse par ces protéines se produit par un mécanisme d'endocytose. Barth (1989) utilise d'autres techniques de purification et localise l'activité trypanolytique dans un complexe protéique de haut poids moléculaire (> 1000kd) ne contenant pas de HDL.

## 2. Spécificités au sein des espèces : la résistance immune

Des souches de parasites différent par leur virulence pour un même hôte, c'est le cas par exemple de différentes souches de T. b.brucei pour la souris. Mais même chez la souris, un clone parasitaire s'exprime différemment en fonction de la lignée animale choisie (Black et coll. 1983a ; Black et coll. 1983b ; Roetlans et Pinder, 1987, Degée et coll. 1988 ; Seed et Sechelski, 1989). Dans le cas de sensibilité élevée, l'hôte ne peut juguler l'infection et meurt rapidement. A l'inverse, l'hôte peut résister à l'aide de son système immunitaire, et le parasite utilise ses mécanismes "d'échappement" que sont la variation antigénique et l'immunosuppression.

Avant d'envisager l'exposé des connaissances actuelles des mécanismes "anti immunitaires" des parasites, nous résumerons dans le chapitre suivant les éléments indispensables à leur compréhension.

## B. LE SYSTEME IMMUNITAIRE

### 1. organisation de la réponse immunitaire

Un élément étranger pénétrant dans un organisme provoque cet organisme et sollicite son système immunitaire, système dont l'efficacité sera l'acquisition d'une immunité facilitant l'élimination, le rejet de l'agent d'agression.

Différentes étapes cellulaires et humorales sont nécessaires. Selon un schéma classique, le macrophage sera le premier à intervenir pour capter et transformer l'élément antigénique dont il présente en surface des fragments immunogènes, aux lymphocytes  $T_4$  helper (LTh). Le LTh, par le biais d'interactions cellule/cellule et/ou par l'intermédiaire de médiateurs (interleukines), pourra alors "aider" les lymphocytes (LB) qui reconnaîtront l'antigène par leurs anticorps de surface. Les LB pourront alors se transformer en plasmocytes producteurs d'anticorps spécifiques et aussi en cellules mémoires. Le LTh pourra également stimuler les lymphocytes  $T_8$  cytotoxiques

(LTc) qui sont également capables de reconnaître l'antigène par exemple à la surface de cellules. La destruction de la cellule, du microorganisme, du parasite pourra alors se faire par divers mécanismes faisant intervenir les macrophages, les lymphocytes cytotoxiques, les anticorps, les opsonites et le complément, directement ou associés (Wakelin 1984).

L'organisation de ce système repose sur les processus interactifs que sont la présentation de l'antigène aux lymphocytes T et les activations par les lymphokines et les monokines. (Fig. 6)

## 2. Présentation des antigènes aux lymphocytes T

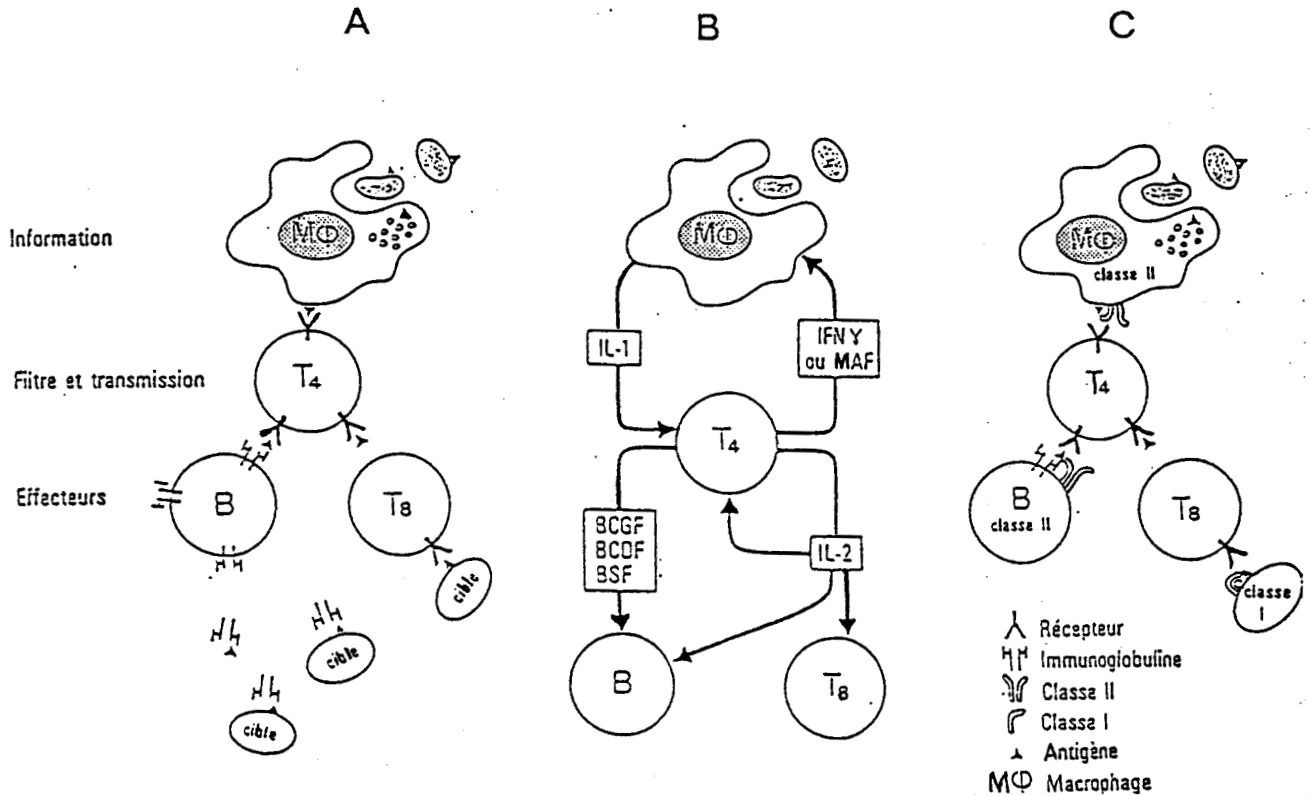
### a. Principe

La reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T est une étape essentielle dans le déclenchement du système immunitaire. Elle nécessite l'intervention de cellules présentatives d'antigène (CPA) qui sont dans le cas des LTh, essentiellement les macrophages, les LB et les cellules dendritiques, alors que toutes les cellules nucléées peuvent remplir cette fonction pour les LTc. Cette différence tient au fait que la plupart des LTh reconnaissent les antigènes associés au complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMHII) alors que la plupart des LTc reconnaissent les antigènes associés au CMHI. En général, les antigènes exogènes sont associés au CMHII et les antigènes associés au CMHI sont des protéines synthétisées par des cellules cibles. Une fois dans la cellule présentatrice, l'antigène est généralement protéolysé par des lysosomes.

La reconnaissance repose sur trois principes :

- les LT reconnaissent les antigènes peptidiques, et pas les antigènes glycaniques ;
- c'est l'association antigène/CMH qui contrôle génétiquement la réponse, les gènes de la réponse immune déterminant la spécificité ;
- l'immunodominance induit un choix préférentiel de la réponse pour un antigène donné ou à quelques-uns des nombreux sites antigéniques potentiels d'une molécule.

ORGANISATION DE LA REPONSE IMMUNITAIRE (DEGOS 1989)



- A. Réponse immunitaire spécifique de l'antigène faisant intervenir une reconnaissance cellulaire entre les macrophages, les lymphocytes T<sub>4</sub>, lymphocytes T<sub>8</sub> et lymphocytes B.

- B. Amplification non spécifique de la réponse immunitaire faisant intervenir les interleukines : interleukine 1 (IL-1), interleukine 2 (IL-2) interleukine 4 ou facteur de croissance des lymphocytes B (BCGF), facteur de différenciation des lymphocytes B (BCDF), facteur de stimulation des lymphocytes B (BSF), facteur d'activation des macrophages (MAF) ou inteferon gamma (IFN $\gamma$ ).

- C. Présentation de l'antigène par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité. Classe I, présentation de la cellule cible au lymphocyte T<sub>8</sub>. Classe II, présentation du macrophage au lymphocyte T<sub>4</sub>.

Figure 6



b. Mécanismes de reconnaissance (Bensussan 1988)

Le récepteur situé en surface des LT humains comprend deux glycoprotéines essentielles  $\alpha$  et  $\beta$  associées à un complexe moléculaire ( $CD_3$ ). Les deux glycoprotéines sont reliées par un pont disulfure et ont des structures proches de celles des immunoglobulines. La spécificité est liée à l'existence de chaînes variables. A ce système de reconnaissance, s'ajoutent des molécules d'adhésion non spécifique ; LFA1,  $CD_4$  et  $CD_8$ . Ces deux dernières définissant les deux sous populations de lymphocytes T (Fig. 7).

Suite à cette reconnaissance, la transduction des LT est déclenchée, elle fait intervenir à l'origine une phospholipase C et en fin de chaîne une protéine-kinase C qui active toute une série de mécanismes par phosphorylation. (Fig. 8).

3. Lymphokines et monokines

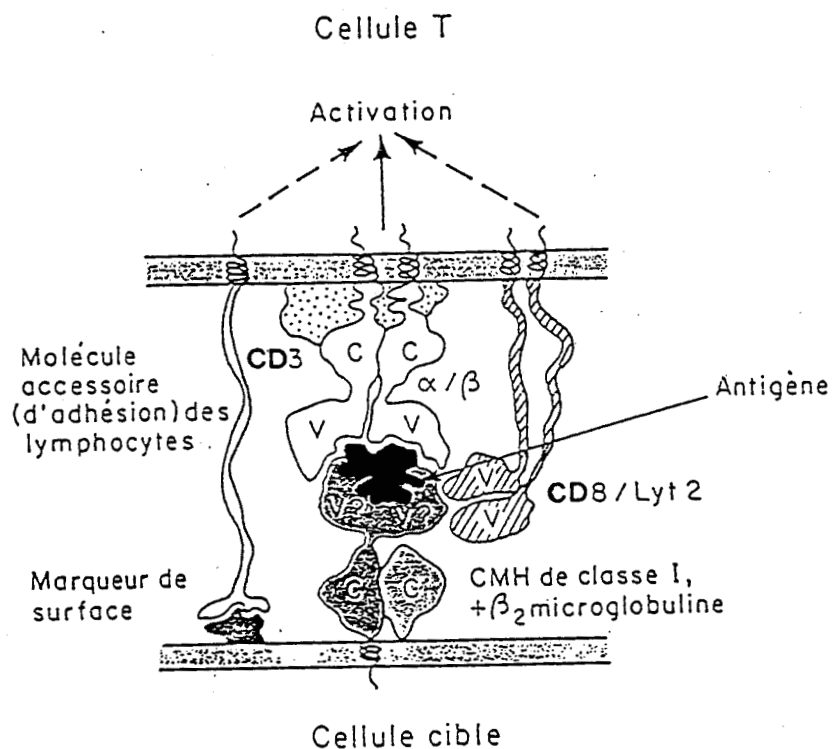
a. Fonctionnement (Fig. 6B)

Ces médiateurs chimiques comprennent des interleukines et certains types d'interférons. Les macrophages sécrètent l'interleukine 1 (IL-1) qui agit sur les lymphocytes T helper en stimulant entre autres, la production d'interleukine 2 (IL-2) et l'expression des récepteurs de l'IL-2. L'interleukine-2 agit sur les cellules T pour faire proliférer les cellules préalablement activées par le signal antigène/ CMH. L'IL-2 active aussi les lymphocytes B. Les cellules T produisent également des lymphokines actives sur les cellules B (B cell stimulating factor (BSF), IL-4 ou B cell growth factor (BCGF), B cell differentiating factor (BCDF)), ou sur les macrophages (Interferon  $\gamma$ ) (IFN  $\gamma$ ) ou Macrophage activating factor (MAF). Les deux principaux médiateurs IL-1 et IL-2 ont été très étudiés et décrits au plan structural.

b. IL-1 (revue de Strober et James, 1988)

L'IL-1 est un peptide de masse moléculaire 15 kd qui existe sous forme de deux molécules (IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ), entités moléculaires qui pour l'IL-1 $\alpha$  est ancrée dans la membrane alors que l'IL-1 $\beta$  est une forme sécrétée. L'IL-1, en dehors des macrophages, est sécrétée par de nombreux types cellulaires (kératinocytes, astrocytes, cellules gliales), elle agit par des récepteurs de haute et faible affinité qui font intervenir une activité protéine-kinase C. Les multiples effets de l'IL-1 peuvent être directs ou indirects par libération de médiateurs secondaires comme, par exemple, la prostaglandine 2 ( $PGE_2$ ). En dehors de son rôle déjà évoqué dans le système immunitaire, l'IL-1 est un

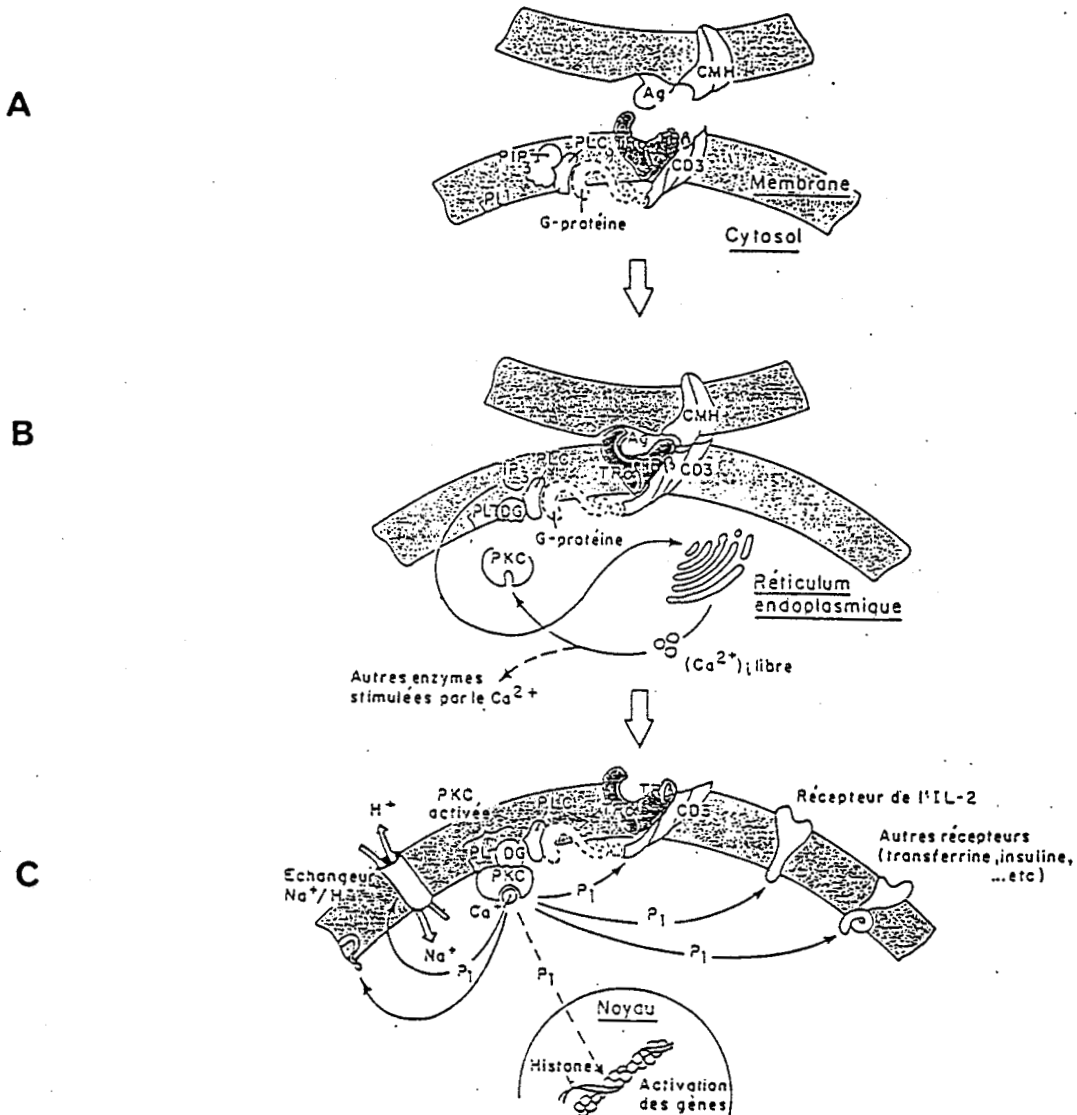
RECONNAISSANCE DE L'ANTIGENE PAR LES LYMPHOCYTES T SUR LES CELLULES  
EXPRIMANT LE COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE DE TYPE I (CMHI)  
(BENSUSSAN 1988)



- CD8/Lyt 2 : glycoprotéines reconnaissant le CMHI
- $\alpha/\beta$  : récepteur spécifique reconnaissant les structures polymorphes du CMHI
- CD3 : complexe moléculaire de surface
- C : régions constantes
- V : régions variables.

Figure 7

TRANSDUCTION DE LA RECONNAISSANCE DES  
LYMPHOCYTES T (BENSUSSAN 1988)



- A : reconnaissance par le récepteur T ( TR $\alpha$ , TR $\beta$ , CD3) de l'antigène et du complexe majeur d'histocompatibilité (Ag, CMH).

- B : transduction du signal : activation de la phospholipase C (PLC) ; clivage du phosphatidylinositol triphosphate (PIP<sub>3</sub>) en inositol-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et diacylglycerol (DG).

- C : activation de la protéine kinase C (PKC) par l'ensemble protéine G, PLC, DG, phospholipides (PL) en présence de calcium (Ca<sup>2+</sup>). Pi : phosphate inorganique, et ses cibles présomptives.

Figure 8

médiateur important de l'inflammation et on lui trouve aussi une responsabilité dans les coordinations : réponse immunitaire et hormono-régulation hypophysaire.

c. IL-2 (Smith, 1988)

C'est une glycoprotéine de masse moléculaire 15,5 kd dont la structure tertiaire se caractérise par l'existence d'un pont disulfure entre les résidus aminoacides en position 58 et 105 (Fig. 9), pont intrachaine essentiel au plan de l'activité biologique de la molécule. Le récepteur de l'IL-2 est constitué d'une molécule de 75 kd d'affinité intermédiaire et d'une molécule de 55 kd de faible affinité. Cependant la première molécule est essentielle car elle seule, peut stimuler la prolifération lymphocytaire (Fig. 9).

Les lymphocytes quiescents ne produisent pas d'IL-2 et surtout sont insensibles à l'IL-2 exogène. Un signal émanant de la stimulation antigénique provoque la stimulation des gènes codant pour l'IL-2 et le récepteur de l'IL-2. Si l'antigène est éliminé, la transcription des deux gènes s'arrête.

Cette description succincte du système immunitaire montre son extrême complexité et la quantité des phénomènes interactifs qui assurent son efficacité. Les mécanismes précis d'intervention du trypanosome au niveau du système immunitaire sont encore peu connus. Toutefois l'immunosuppression est de règle et représente une des causes du développement parasitaire chez le sujet infesté.

C. REPONSE IMMUNITAIRE ET TRYPANOSOMIASE

1. La réponse immunitaire lors de l'infection

La diversité du stock antigénique des trypanosomes - plusieurs centaines de variants distincts par leurs antigènes de surface - ne permet pas à l'hôte infesté d'acquérir une immunité capable d'assurer l'élimination du parasite et d'empêcher le développement des vagues parasitaires successives qui caractérisent la trypanosomiase chronique ou sub-aigüe à T.b. gambiense chez l'homme ou T.b. brucei chez l'animal.

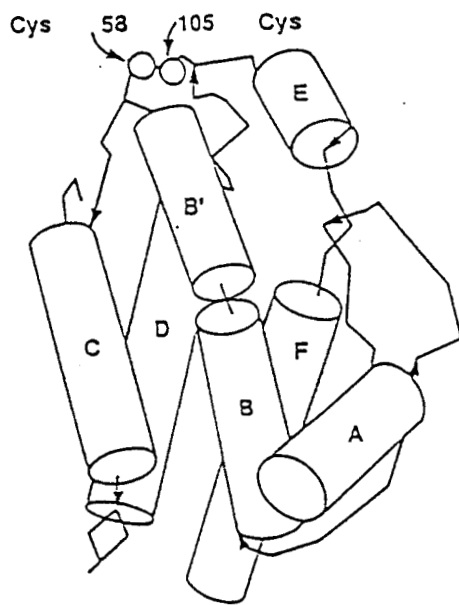
a. Production d'immunoglobulines

L'infestation provoque une production accrue d'immunoglobulines dont la plupart ne sont pas spécifiques des antigènes de surface du trypanosome et sont donc inefficaces pour limiter l'infection (Goodwin, 1974). Une faible part des IgM consiste en des anticorps agglutinants, neutralisants et lytiques des antigènes de surface (De Raadt, 1974). L'AVS est lui-même immunogène et peut apporter une protection spécifique vis-à-vis du clone (Cross, 1975). On trouve

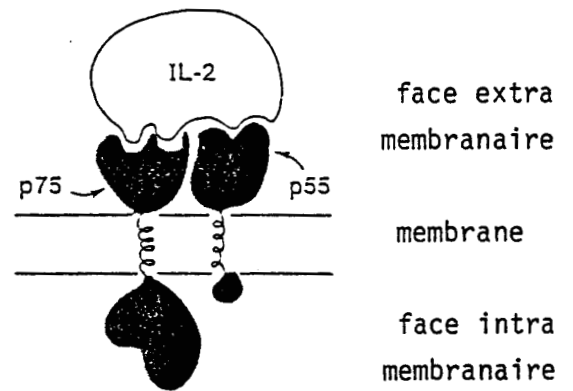
## STRUCTURE TERTIAIRE DE L'INTERLEUKINE-2

### ET ORGANISATION DU RECEPTEUR DE L'IL-2

(SMITH 1988)



IL-2



R-IL-2

IL-2 : les régions  $\alpha$ -hélicoidales sont représentées par des cylindres identifiés par ordre alphabétique à partir de l'extrémité N-terminale.

R-IL-2 : récepteur de l'IL-2 constitué de deux protéines de masse moléculaire 75 kd (P75) et 55 kd (P55).

Figure 9

aussi des IgG formant des complexes immuns avec des antigènes "communs" (De Raadt, 1974) ainsi que des auto-anticorps (Goodwin, 1974) responsables en partie de la pathologie de l'infection (Jenkins et Facer, 1985).

La production d'anticorps est probablement liée à la différenciation des parasites. En effet, partant de l'observation que les souches monomorphes (constituées de formes slender à forte capacité de division) provoquent une infection aiguë sans production d'anticorps, Sendashonga et Black (1982) montrent que l'élimination de la première vague d'une population pléomorphe (slender + stumpy à faible capacité de division) est due à la présence d'anticorps dirigés contre l'AVS en situation membranaire, accompagnés d'anticorps non spécifiques. Les réponses seraient induites par des fragments de formes stumpy dégénérantes. Le fait que la distribution pléomorphe/monomorphe soit aussi dépendante du type d'hôte, conduit Morisson et coll. (1985) à expliquer les résistances génétiques relatives par la capacité de l'hôte à stimuler la différenciation des formes slender en formes stumpy.

#### b. Rôle des immunoglobulines

Le rôle essentiel des immunoglobulines reste l'élimination des parasites. En comparant l'effet de plusieurs souches de Trypanosoma brucei de virulence différente, Sacks et coll. (1980) ont clairement démontré que ce sont les IgM qui contrôlent l'infection. La trypanolyse immune orchestrée par les Ig se fait par :

- 1) le complément (Nielsen, 1985 ; Roetlans et Pinder, 1987)
- 2) la stimulation de la phagocytose par les macrophages (Nielsen, 1985 ; Morisson et coll. 1985, Ruragirwa et coll. 1986 ; Mulla et Rickman, 1988)
- 3) effet direct (Mulla et Rickman, 1988).

Cependant, étudiant la proportion relative des formes slender et stumpy au cours de l'infection, Seed et Sechelski (1987) postulent que les anticorps, en diminuant le nombre de parasites, permettent à l'hôte de rétablir les conditions favorables au retour des formes slender, transposables en formes stumpy, en quantité alors suffisante pour permettre la transmission du parasite. De plus, en éliminant les parasites, les anticorps augmentent le temps de survie de l'hôte, et donc la transmissibilité potentielle de la population parasitaire. Ainsi, les anticorps développés par l'hôte seraient utiles à la pérennisation des trypanosomes.

## 2. L'immunosuppression

### Introduction

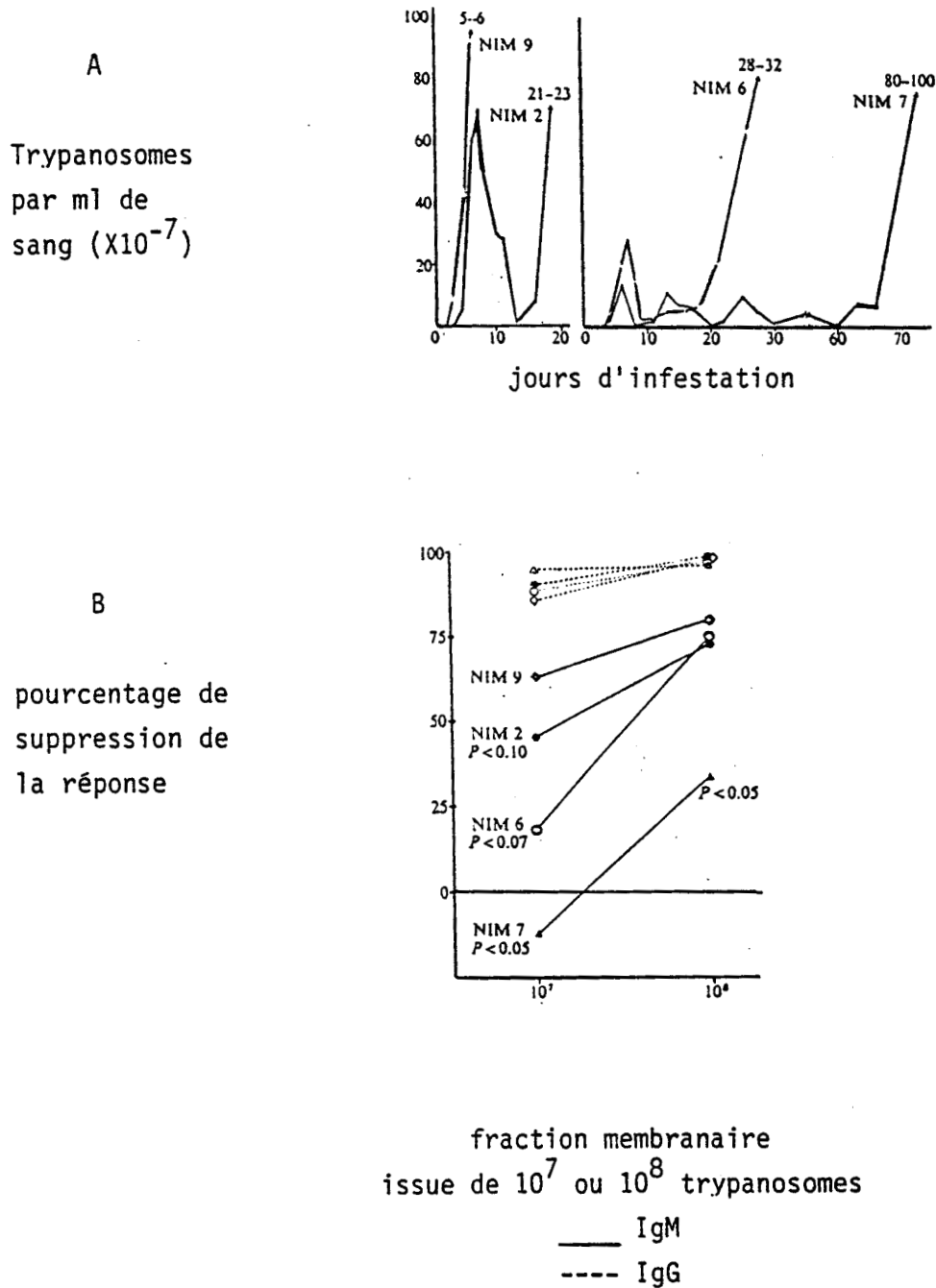
L'immunosuppression est un des moyens essentiels dont dispose le trypanosome pour assurer sa survie chez l'hôte infesté. Le phénomène a été observé dès 1972 (Goodwin et coll.), mais c'est Sacks et coll. en 1980, qui mettent clairement en évidence le concept. Les auteurs étudient l'immunosuppression par un suivi de la production d'immunoglobuline, chez des souris infestées par 4 souches de T.b. brucei de virulence croissante. Leurs résultats indiquent que, si la production d'IgG à une stimulation antigénique hétérologue est systématiquement déprimée, la dépression de la production d'IgM à la même stimulation est d'autant plus importante que la souche est virulente (Fig. 10).

### a. Principe

Les sujets infestés par les trypanosomes africains perdent très rapidement leur capacité à répondre à une sollicitation antigénique qu'elle soit hétérologue ou homologue. En effet, Goodwin et coll. en 1972, injectent des hématies de mouton à des souris et des lapins infestés par T. brucei et observent que, comparés aux contrôles, les animaux parasités produisent des taux beaucoup plus faibles d'immunoglobulines. Par une technique semblable, Hudson et coll. (1978) montrent que l'effondrement concernant IgG et IgM, se produit dès le troisième jour d'infestation, et fait suite à une légère augmentation de la production d'Ig (Fig. 11). Chez l'homme, les premiers résultats directs montrant l'immunosuppression datent aussi des années 70 où Greenwood et coll. (1973) observent une baisse de réponse immunitaire de patients atteints de trypanosomiase à T. gambiense, sollicités par sensibilisation dermique et immunisation à l'aide d'antigènes bactériens.

La réponse des animaux à une sollicitation antigénique homologue a été étudiée par Gasbarre et coll. (1981) qui pratiquent une injection sous-cutanée de T.b. brucei à des souris et analyse l'effet des mêmes trypanosomes en culture par la prolifération de lymphocytes ganglionnaires des animaux immunisés. Ils démontrent que ces lymphocytes récupérés trois semaines après l'immunisation ne sont plus capables de proliférer en présence de parasites.

RELATION ENTRE IMMUNOSUPPRESSION ET VIRULENCE  
(SACKS ET COLL 1980)



- A : développement de la parasitémie par une souche aigue (NIM9) deux souches subaigues (NIM2 et NIM6) et une souche chronique (NIM7) de T.brucei

- B : pourcentage de suppression de la production d'immunoglobulines.

Figure 10



EFFET DE L'INFESTATION PAR T.b.brucei SUR LA REPONSE  
IgG IgM DE SOURIS IMMUNISEES PAR DES HEMATIES DE MOUTON  
(HUDSON ET COLL 1978)

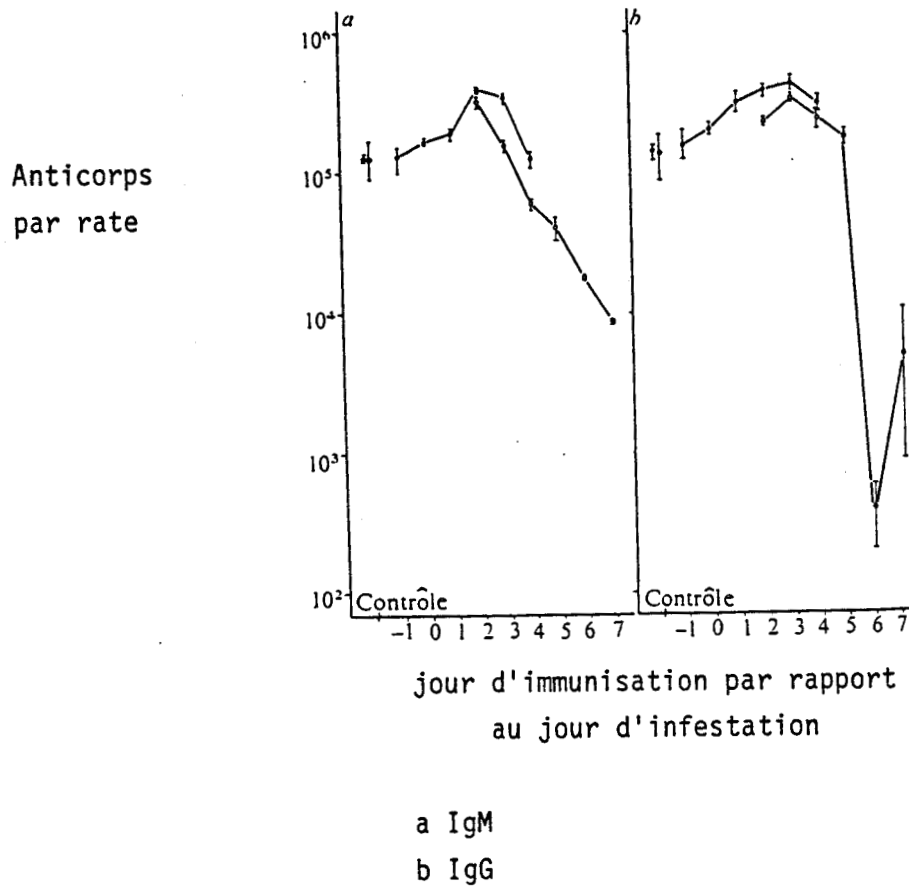


Figure 11

### b. Mécanisme

De nombreux mécanismes impliqués dans l'immunosuppression ont été proposés.

#### \* Stimulation des lymphocytes B

Hudson et coll. (1976) constatent que les lymphocytes B de souris infestées produisent une grande quantité d'IgM quel que soit le type d'antigène utilisé pour le test. Cette absence de spécificité conduit les auteurs à suggérer que l'infection par les trypanosomes induit une activation polyclonale des lymphocytes B, qui provoque l'épuisement du système et donc l'immunosuppression. Corsini et coll. (1977) arrivent aux mêmes conclusions mais ajoutent la probable intervention de cellules suppressives.

#### \* Existence de cellules suppressives

Corsini et coll. (1977) réalisent des cultures de cellules spléniques de souris infestées par T.b. brucei. Par des techniques de déplétion sélective des macrophages et des lymphocytes T, et en ajoutant des macrophages d'animaux infestés à des cultures de cellules d'animaux sains, ils démontrent l'existence de lymphocytes T et de macrophages suppressifs.

Wellhausen et Mansfield (1979, 1980) travaillent sur des souris infestées par T. rhodesiense et montrent, également par techniques de mise en présence de cellules d'origine différente, la responsabilité des macrophages suppresseurs au niveau de la rate, siège initial de l'immunosuppression, mais n'intervenant pas au niveau des ganglions.

#### \* Dysfonctionnement des lymphocytes T

Par des études d'immunisation de souris infestées, immunisation réalisées avec des antigènes faisant intervenir ou non les lymphocytes T (respectivement les hématies de mouton et le polysaccharide SII de pneumocoque), Freeman et coll. (1973) montrent que la suppression touche la réponse anticorps thymodépendante alors que la réponse anticorps thymoindépendante et la réponse cellulaire thymodépendante sont peu affectées. Les auteurs suggèrent alors que le système cellulaire n'est pas altéré individuellement, mais que ce sont des processus interactifs intercellulaires qui sont touchés.

Ce type d'étude sera repris plus en détail par Mansfield et Bagasra (1978) qui suivent l'évolution des deux types de réponses au cours d'une infestation chronique par T.b. rhodesiense. Ils constatent que la réponse aux antigènes thymoindépendants est en réalité exarcerbée pour s'effondrer en fin

d'infestation. Ils suggèrent alors que la suppression touche essentiellement les cellules T helper et les cellules T supresseur.

Le fonctionnement des lymphocytes T a été par ailleurs étudié sur le plan des lymphokines et des monokines. Askonas et Bancroft (1984) stimulent des macrophages périphériques de souris infestées par une souche très virulente de T.b. brucei, et analysent la production d'IL-1. Ils constatent une augmentation importante de la production de monokines par les macrophages d'animaux infestés. Des résultats inverses sont proposés par Mitchell et coll. (1986) qui utilisent la même approche technologique et dosent l'IL-1 produite par les macrophages péritonéaux, spléniques et alvéolaires de souris infestées par Trypanosoma congolense. Ils dosent sur les mêmes animaux l'IL-2 produite par les splénocytes stimulés par la Concanavaline-A et constatent également une baisse importante de la production de la lymphokine. La diminution de production d'IL-2 par les lymphocytes T de ganglions de souris infestés par T.b. brucei AnTat 1.1E a fait l'objet de nombreuses publications par Sileghem et coll. en 1986, 1987 et 1989. Ces auteurs montrent tout d'abord que la baisse de production est provoquée par des cellules suppressives co-purifiées avec une population enrichie en macrophages, mais qu'il est possible de restaurer la production par addition d'IL-2 exogène. De plus, l'expression du récepteur d'IL-2 est aussi déprimée. La notion de cellules suppressives de type macrophage, a aussi été évoquée. En utilisant l'indométhacine, agent bloquant la synthèse des prostaglandines, il est en effet démontré que la diminution de production d'IL-2 est provoquée en partie par un mécanisme prostaglandine dépendant, processus qui n'intervient pas au niveau de l'expression du récepteur.

### c. Recherche de constituants parasitaires actifs

Les effets multiples de l'infection sur l'hôte soulèvent la question concernant la nature des constituants parasitaires actifs ainsi que leur mode d'action : agissent-ils directement ou par l'intermédiaire de cellules spécifiques ?

Certains auteurs n'ont pas observé d'effet du matériel parasitaire sur des cellules immunitaires normales, que ce soient les extraits antigéniques bruts (Mansfield, 1978) ou les constituants de surface, en particulier l'AVS (Corsini et coll. 1977 ; Askonas et Bancroft, 1984). D'autres auteurs ont montré que certains constituants parasitaires pouvaient provoquer l'immunosuppression (Clayton et coll. 1979) et surtout pouvaient avoir un effet stimulateur. Cet effet pouvant d'ailleurs constituer, d'après Hudson et coll. (1976) et Corsini et coll.

(1977), une des facettes du mécanisme immunosuppresseur.

Clayton et coll. (1979) montrent que l'injection de fractions membranaires de parasites mime l'immunosuppression provoquée par les mêmes parasites vivants ou morts, mais intacts.

L'effet immunostimulateur a été démontré la première fois par Esuruoso en 1976, qui utilise des extraits bruts de T. brucei en culture de cellules spléniques normales et constate que l'extrait stimule de manière significative la prolifération lymphocytaire. Une étude in vivo est menée par Gasbarre et coll. (1980), qui réalisent sur souris un "conditionnement" par injection sous-cutanée de trypanosomes et, après mise en culture des lymphocytes ganglionnaires en présence de parasites vivants, observent l'augmentation de prolifération. Ce type d'étude est repris par Charoenvit et coll. (1981) et Campbell et coll. (1982) qui utilisent des extraits parasitaires de T.b. rhodesiense (respectivement par lyse osmotique et par lyophilisation). Les lymphocytes spléniques des souris immunisées présentent aussi une forte capacité proliférative en présence des extraits initiaux. Cependant, les auteurs n'observent pas de comportement analogue avec les cellules d'animaux infestés. Enfin, Diffley, en 1983, injecte l'AVS purifié de T.b. rhodesiense et T.b. brucei (purification par chromatographie d'échange d'ion et lectinique) à des souris, et décrit une splénomégalie provoquée par la prolifération des cellules nulles, lymphocytes B et T et de macrophages. Ils montrent aussi que l'immunisation ne modifie pas la réponse des lymphocytes à la Con-A et au LPS.

## CONCLUSION

L'immunosuppression observée au cours des trypanosomiasés africaines expérimentales est le fait de plusieurs mécanismes qui font intervenir toutes les populations cellulaires du système immunitaire ainsi que leurs médiateurs. Les macrophages jouent probablement un rôle essentiel dans ces mécanismes, intervenant notamment au plan de la production d'IL-2 et de l'expression de son récepteur. Un des éléments importants est aussi la stimulation "anarchique" des lymphocytes B. Le rôle des constituants parasitaires à ce niveau et plus généralement sur l'immunodysfonctionnement n'est pas clairement déterminé. Il semble néanmoins qu'il puisse co-exister chez le parasite des constituants initialement lymphostimulateurs dont l'AVS, et des constituants inhibiteurs.

L'immunosuppression liée à la trypanosomiasé n'est pas une exclusivité des trypanosomes africains, et la responsabilité des lymphokines a été démontrée

chez d'autres espèces : Leishmania major (Cillari et coll. 1986), Leishmania donovani (Reiner et coll. 1983) et surtout Trypanosoma cruzi (Harel-Bellan et coll. 1983 ; Tartelton et Kuhn, 1984 ; Rottenberg et coll. 1989).

Un autre élément tout-à-fait essentiel aujourd'hui est le lien au plan biologique entre les deux systèmes, immunitaire et endocrinien chez un sujet. Le fait est reconnu et appuyé par de nombreuses études expérimentales publiées cette dernière décennie (revue de Weigent et Blalock, 1989). Ces études font apparaître qu'il existe entre les deux systèmes une communication bidirectionnelle (Fig. 12) :

- les cellules du système immunitaire sont capables de synthétiser, spontanément ou plus souvent suite à un stimulus bactérien, viral, lectinique ou hypothalamique, des hormones peptidiques biologiquement actives (corticotropines, endotropines, thyrotropines, gonadotropines, hormone de croissance, prolactine, hormone lutéinisante) ;

- la synthèse et la régulation de ces hormones sont comparables à celles observées dans les cellules endocriniennes avec des retrocontrôles positifs et négatifs ;

- les cellules du système immunitaire possèdent aussi des récepteurs pour la plupart de ces peptides, récepteurs bien caractérisés sur le plan moléculaire, et analogues à ceux décrits dans le tissu endocrinien ;

- les hormones endocriniennes peuvent moduler la fonction immune au niveau des macrophages, lymphocytes T et B et cellules nulles (mitogénicité, synthèse d'anticorps, production d'interféron, phagocytose, cytotoxicité) ;

- enfin, les lymphokines (interféron, interleukines 1 et 2, thymosines) peuvent agir sur le tissu endocrinien, notamment au plan de la synthèse d'ACTH et des endorphines, ainsi que la libération d'hormone lutéinisante.

Ainsi les hormones peptidiques produites par les cellules du système immunitaire jouent-elles au moins sur deux fronts, en régulant le système immunitaire lui-même et en assurant une communication avec le système endocrinien. La communication apportant à ce système de nouveaux stimuli possible (antigéniques) jusqu'alors spécifiques des cellules immunitaires.

L'AXE HYPOTHALAMO-IMMUNO-HYPOPHYSIAIRE  
(D'APRES WEIGENT ET BLALOCK 1989)

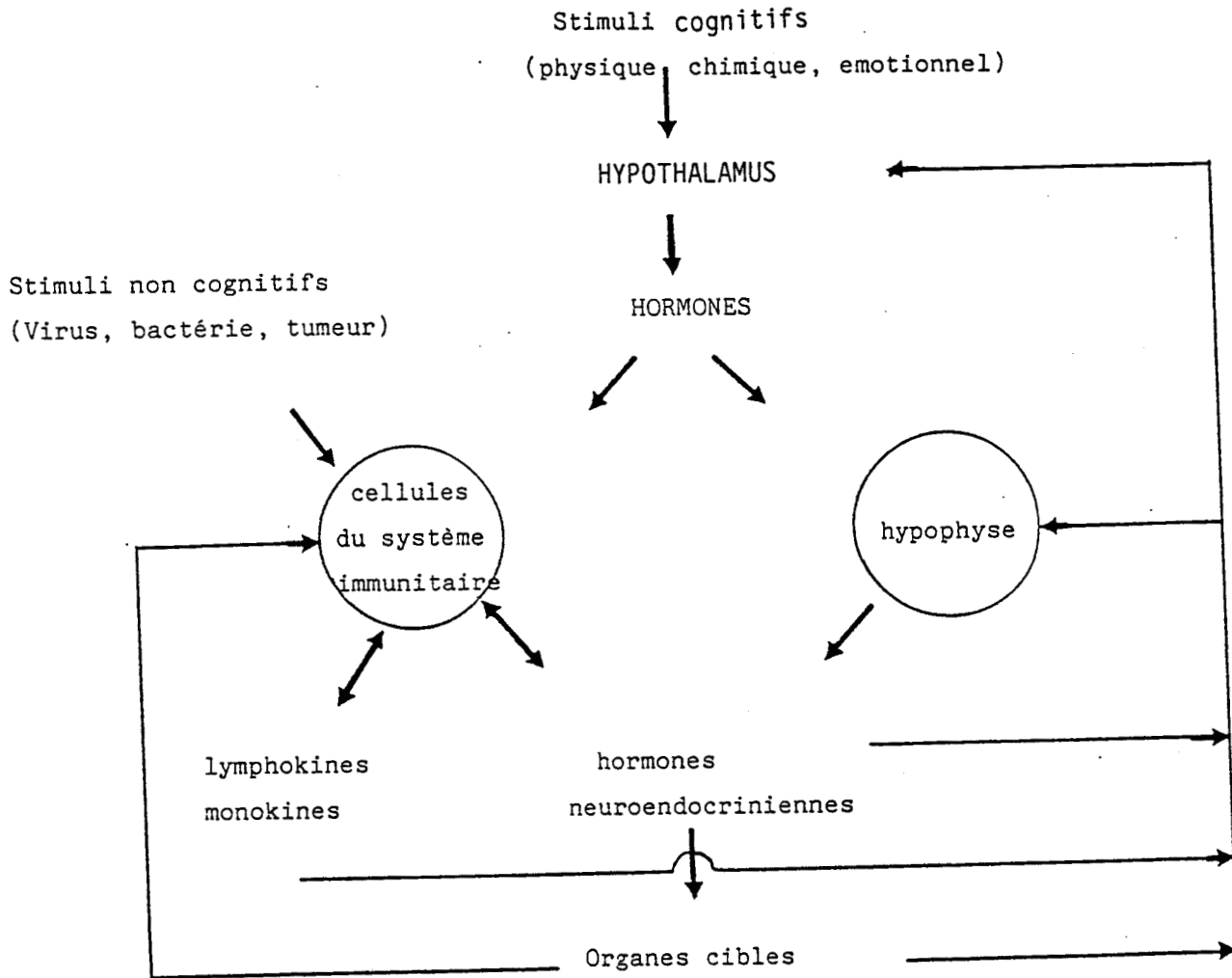


Figure 12

°00°

### CHAPITRE III

## LE DYSFONCTIONNEMENT ENDOCRINIEN

°00°

Au cours de l'évolution de la maladie du sommeil, les anomalies d'ordre endocrinien, bien que "classiques" ont été peu ou pas exploitées en terme d'élément diagnostique ou de suivi thérapeutique bien que représentant toutefois une forme d'expression du conflit hôte-parasite, une preuve d'adaptation du parasite qui modifie progressivement son environnement à son avantage. Si les désordres rapportés s'adressent en priorité à l'axe gonadotrope et au fonctionnement thyroïdien, l'influence sur les autres grands chapitres de l'endocrinologie n'est pas à rejeter.

Notre travail s'intéresse essentiellement à l'étude des mécanismes physio-pathologiques des hypogonadismes et à la mise en évidence du rôle des constituants de surface du trypanosome dans leur apparition.

Après un rappel biologique et physiologique de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique normal, nous présenterons les éléments principaux du tableau pathologique en systématisant les anomalies au niveau des différents étages impliqués : gonade/hypophyse/hypothalamus.

## A. LES HORMONES HYPOTHALAMO-ANTEHYPOPHYSAIRES

### 1. Axe hypothalamo-antéhypophysaire

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 (Fig. 13). Des voies rétrogrades, des systèmes de rétrocontrôle permettent de moduler la réponse et d'harmoniser la fonction des deux étages gonadotropes. Les neurosécrétions issues de l'hypothalamus stimulent l'hypophyse où sont synthétisées et sécrétées les stimulines.

### 2. Hormones gonadotropes

#### a. Hormone hypothalamique (LH-RH)

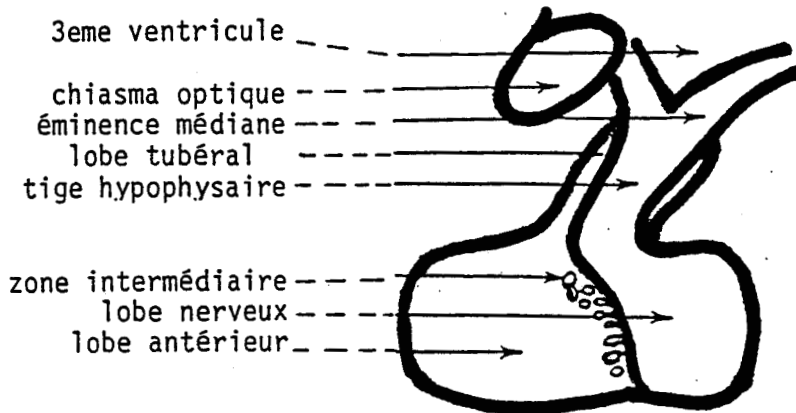
La lutéolibérine ou gonadolibérine ou LH-RH est un décapeptide qui, sécrété par l'hypothalamus sur un mode pulsatile, provoque la décharge de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et de l'hormone lutéinisante (LH), à partir de l'hypophyse (Carmel et coll. 1976).

Un des aspects fondamentaux de la régulation de la sécrétion endocrine de l'antéhypophyse fait intervenir l'existence de boucles de rétrocontrôle hormonal



# SCHEMA ANATOMIQUE ET VASCULARISATION DE L'HYPOPHYSE

## DIVISION ANATOMIQUE DE L'HYPOPHYSE



## VASCULARISATION DE L'HYPOPHYSE

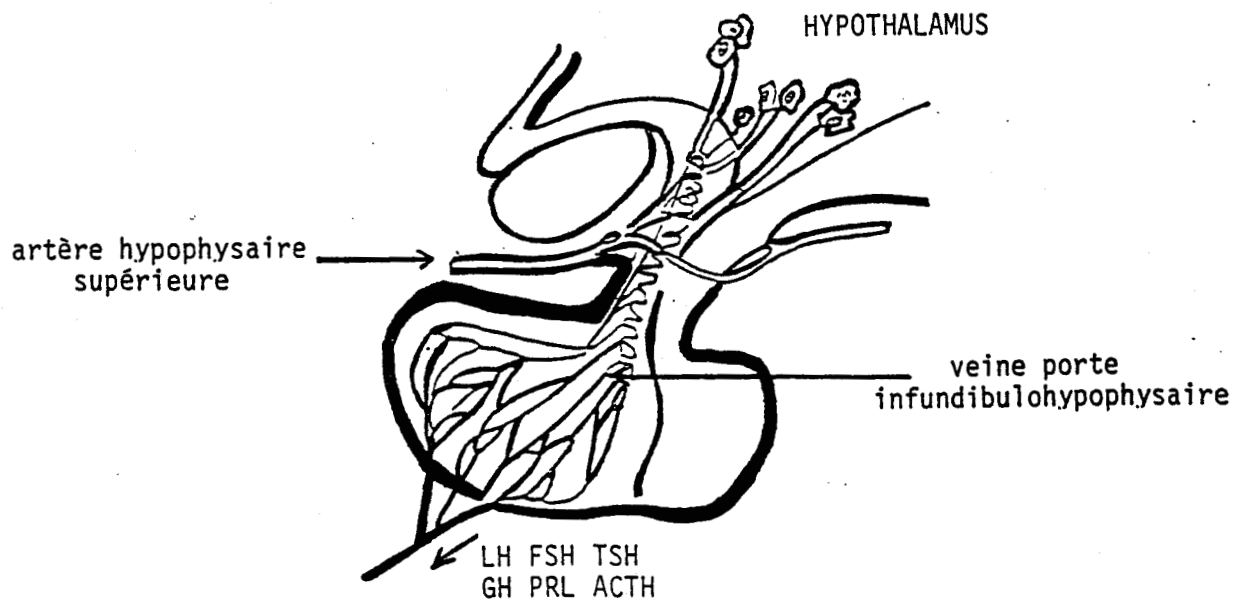


Figure 13

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. Par contre, chez la femme, ce rôle est tenu par la progestérone qui exerce 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. La boucle du rétrocontrôle négatif de l'oestradiol a été mise en évidence par Ferin et Van de Wiele (1982) 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.

Parallèlement aux hormones stéroïdes (oestrogènes, progestérone), plusieurs médiateurs du système nerveux central peuvent affecter aussi la sécrétion de la LH-RH dans le système porte et dès lors intervenir dans le contrôle des hormones gonadotropes (LH, FSH). Ces médiateurs appartiennent à des classes chimiques différentes : médiateurs aminergiques comme les catécholamines (dopamine et noradrénaline), ou la sérotonine ou des peptides neuronaux comme la met-enképhaline ou la  $\beta$ -endorphine. Leurs actions s'exercent 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. 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) et de Maites et coll. (1961) avaient déjà montré qu'il existait un rapport inverse entre les taux de prolactine et ceux de LH.

#### b. Hormone gonadotrope

Les hormones gonadotropes 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 de l'équilibre endocrinien.

#### \* Structure des gonadotrophines

Les gonadotrophines, ainsi que l'hormone thyroïdostimulante (TSH) ou l'hormone gonadotrope chorale (hCG) sont des glycoprotéines constituées de deux sous-unités peptidiques différentes ( $\alpha$  et  $\beta$ ), chacune portant une ou plusieurs chaînes glycaniques. La structure peptidique de la sous-unité  $\alpha$  est commune 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  $\beta$ , 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 moléculaires des gonadotrophines ont été estimés pour la LH à 28 kd (Li et Starman, 1964) et à 34 kd pour la FSH (Liu et Ward, 1976).

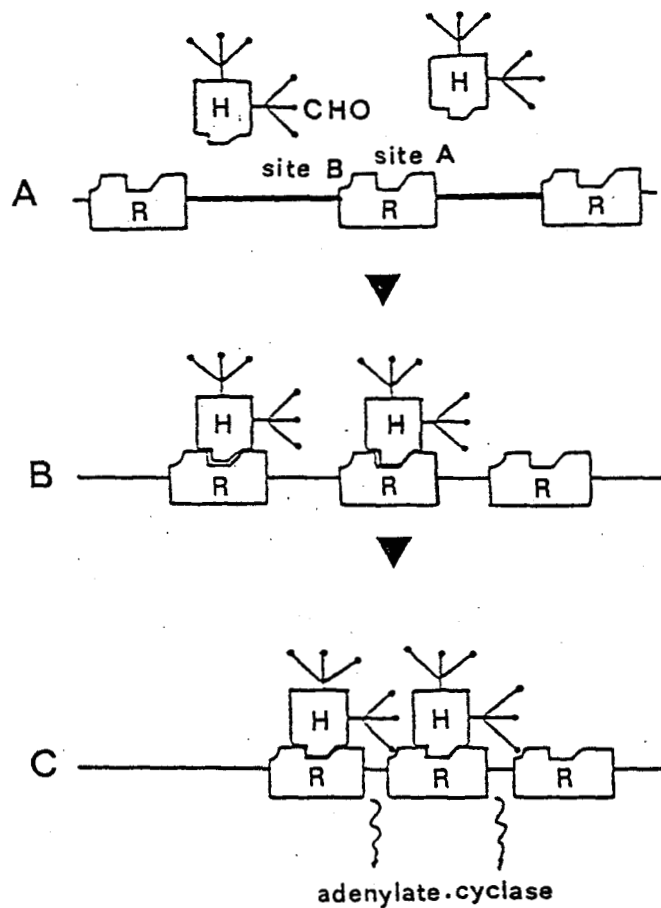
#### \* Relation structure fonction des gonadotrophines

Ji et coll. (1985) ont montré que les deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  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  $\alpha$  et  $\beta$ .

D'après Combarous (1988), les stimulines hypophysaires possèdent une structure polyfonctionnelle constituée 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 chacune étant due à l'existence de sites inhibiteurs spécifiques empêchant la liaison d'une stimuline donnée aux récepteurs tournés vers d'autres hormones (Fig. 14).

Ainsi, au niveau testiculaire ou ovarien, la stéroïdogénèse sera liée au fonctionnement des étages hypothalamo-hypophysaires, à la sécrétion dans le torrent circulatoire des structures gonadotropes, à leur intégrité et à leur

MODELE HYPOTHETIQUE DU ROLE DES CHAINES  
GLYCANNIQUES DES GONADOTROPINES DANS LA  
TRANSDUCTION MEMBRANAIRE DU SIGNAL HORMONAL.  
(d'après COMBARNOUS 1988)



- La stimulation de l'organe cible par l'hormone s'effectue en 3 stades :
- A : approche de l'hormone (H) à son récepteur (R).
  - B : liaison de l'hormone sur le site récepteur (A)
  - C : microaggrégation des récepteurs provoqués par certains résidus saccharidiques internes se liant au site (B).  
Stimulation de l'activité adényl-cyclase.

Figure 14

réception au niveau des gonades. A chaque niveau la synthèse et l'expression en surface des récepteurs est aussi un impératif pour un axe gonadotrope fonctionnel.

Ces éléments sont modifiés au cours de la trypanosomiase. Ils ont été étudiés chez l'homme et chez l'animal.

## **B. TROUBLES ENDOCRINIENS RENCONTRES AU COURS DE LA TRYPANOSOMIASSE AFRICAINE**

Des manifestations endocriniennes d'ordre thyroïdien ou gonadotrope ont été observées au cours de la maladie du sommeil chez l'homme mais aussi chez l'animal sur modèle expérimental.

### **1. Manifestations endocriniennes chez l'homme**

#### **a. Observations cliniques**

Les désordres endocriniens chez la femme se manifestent par des cycles ovariens irréguliers, une stérilité ou une infertilité. L'infection durant la grossesse peut engendrer des avortements, la mort du fœtus ou encore la mort du nouveau né à la naissance (Macfie, 1913 ; Ridet, 1953).

Edington et Gilles (1969) ont suggéré l'intervention de la glande pituitaire pour expliquer un pan-hypopituitarisme clinique observé souvent dans la dernière phase de la maladie.

Chez l'homme trypanosomé, les manifestations sont caractérisées par des orchites et des périorchites (Apted, 1970). L'impuissance, la stérilité sont des éléments cliniques fréquents.

#### **b. Modification de l'équilibre endocrinien**

##### **\* Gonadotrophines**

Emeh et Nduka (1986) se sont intéressés au taux de gonadotrophines dans le sang circulant chez des sujets 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 BP) et arsobal (Mel B), une réversibilité des taux d'hormones était observée (Tableau 1).

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

|                                       | FSH plasmatique<br>(UI/l) | LH plasmatique<br>(UI/l) |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| témoins                               | 3,94 $\pm$ 1,78           | 14,91 $\pm$ 5,82         |
| patients avec trypanosomiase évoluée  | 2,16 $\pm$ 0,75           | 7,53 $\pm$ 3,13          |
| patients traités, en voie de guérison | 3,75 $\pm$ 1,73           | 15,1 $\pm$ 4,98          |

TABEAU 1

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.

\* Bilans gonadiques

Plus récemment, une série de bilans gonadiques menée au laboratoire sur 106 patients atteints de trypanosomiase chronique à T.b. gambiense (Hublart et coll. 1988) a révélé :

- chez les femmes, une diminution du taux d'oestradiol pour près de 50% des malades sans qu'il ne semble exister de relation entre cette hypo-oestrogénie 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.

- chez les hommes, une atteinte relativement sélective de la fonction endocrino-leydigienne 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), l'insuffisance gonadique testiculaire constatée ne semblant 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 n'est pas toujours trouvé associée à un effondrement du taux circulant de stimulines hypophysaires correspondantes.

De plus, par une exploration statique et dynamique de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadotrope de sujets malades et de sujets témoins résidants dans la même zone géographique, les auteurs ont montré que l'hypofonctionnement gonadique 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 de stimulation gonadique (hCG) ou hypophysaire (LH-RH). De plus, l'hypothèse d'un environnement prolactinique antigonadotrope est aussi écarté.

## 2. Manifestations endocriniennes chez l'animal

Différents auteurs ont tenté de développer des modèles animaux permettant de suivre l'évolution biologique et d'explorer au plan histologique les troubles endocriniens liés à la parasitémie.

### a. Chez la femelle

#### a.1-Troubles du cycle ovarien

Mutayoba et coll. (1988) ont montré sur des chèvres infestées par T. congolense que tous les animaux présentaient des cycles ovariens irréguliers avec une échéance d'interruption du cycle lié directement à la sensibilité à l'infestation. Au plan biologique, les taux de progestérone et de  $17\beta$  oestradiol diminuent de façon significative et ce, quelle que soit la résistance de l'animal à l'infection.

#### a.2-Troubles de la gestation

Des avortements ont souvent été observés dans les évolutions cliniques d'animaux trypanosomés (Leeflang, 1975). La présence de kystes ovariens comportant de nombreux trypanosomes chez des brebis expérimentalement infestées par T. vivax, a été rapportée par Isoun et Anosa (1974).

### b. Chez le mâle

#### b.1-Retentissements histopathologiques

Ikede et Losos (1972) ont montré la présence de lésions du cerveau et de l'hypophyse sur des moutons infestés par un stock de T.b. brucei.

De nombreuses études décrivent des lésions génitales d'animaux infestés par la même espèce de trypanosome (Peruzzi, 1928 ; Ikede, 1979 ; Ikede et Akpavie, 1982 ; Anosa et Kaneko, 1984).

En règle générale, la trypanosomiase peut conduire à une atrophie de la glande testiculaire accompagnée d'une aspermie (Anosa et Isoun, 1980 ; Kaaya et Oduor-Okelo, 1980 ; Masake, 1980 ; Anosa, 1983).

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

#### b.2-Modification de l'équilibre endocrinien

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

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

Les résultats ont montré une baisse significative du taux de testostérone tant en intensité 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 hémopoïétiques produits ou induits par les parasites, entraînant ainsi une mauvaise réponse de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

Les troubles de l'équilibre endocrinien perçus chez l'animal, et les résultats des bilans gonadiques effectués chez l'homme indiquant un dysfonctionnement ne mettant en cause probablement ni l'étage gonadique, ni l'étage anté-hypophysaire, des études portant sur les niveaux supra et/ou extra hypophysaires ont été réalisées récemment au laboratoire sur des animaux infestés par T.b. brucei (Hublart, thèse 1989). L'étude a été menée selon deux critères de comparaison : des rats jeunes de 45 jours ont été comparés à des rats âgés de 10 mois ; des rats infestés par une souche aigüe (clone AnTat 1.1A) ont été comparés à des rats infestés par une souche chronique (clone AnTat 1.1E).

Concernant l'infestation aigüe, les dosages ont été réalisés trois jours après l'inoculation. Dans le cas de l'infestation chronique, des différences selon l'âge des rats étant apparues dans l'évolution de la parasitémie, les dosages ont été pratiqués à des moments différents mais caractéristiques de l'évolution. En effet, le premier pic de parasitémie est apparu au cinquième jour chez les rats de 10 mois, au onzième jour chez les rats de 45 jours, la phase de latence s'avère donc très différente. Une phase de rémission caractérisée par l'absence de parasites dans le sang fait suite au premier pic, cette phase présente la



même durée dans les deux séries de rats (4 jours). Enfin, apparaît une seconde vague dite récurrente marquée par une parasitémie élevée. Les bilans hormonaux ont donc été réalisés pendant la phase de latence, au moment du premier pic de parasitémie et pendant la phase de récurrence. Chez les rats de 10 mois, un dosage supplémentaire a été effectué, pendant la phase de rémission. Ont donc été dosés radioimmunologiquement la testostérone, l'oestradiol, la LH hypophysaire et sérique, la FSH hypophysaire et sérique.

Nous avons simplifié la représentation des résultats de M. Hublart en indiquant par des flèches la valeur moyenne des dosages chez les rats parasités relativement à la valeur moyenne des dosages chez les rats témoins.

Les flèches en trait plein indiquant des différences statistiquement significatives (test de Student) et les pointillés indiquant des différences non significatives, qui ont été toutefois partiellement prises en considération en raison d'une grande disparité dans les réponses individuelles (Tableaux 2 et 3).

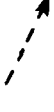
\* Infestation aiguë :

Le tableau 2 présente les résultats obtenus en utilisant des souches provoquant une infestation aiguë. Chez les rats de 10 mois, le bilan se traduit par une diminution du taux d'oestradiol. Une diminution du taux de testostérone est aussi enregistrée sur la base des dosages individuels. Elle n'est pas significative en terme statistique sur l'ensemble des rats étudiés. La diminution de la testostérone n'apparaîtrait alors que sur un pourcentage restreint de la population expérimentale. Le dosage des gonadostimulines sériques (FSH et LH) donne des valeurs difficilement exploitables en raison également de variations individuelles importantes dont les moyennes se résolvent en des valeurs sensiblement normales. Ces gonadostimulines hypophysaires sont par contre plus élevées significativement pour la LH et plus discrètement pour la FSH. Ces premiers résultats montraient donc que, chez un rat de 10 mois, infesté par une souche aiguë, apparaît un hypogonadisme accompagné d'une synthèse hypophysaire de LH accrue, non traduite au plan sérique.

Chez les rats de 45 jours, les taux d'oestradiol ne sont pas modifiés par l'infestation. Il en est de même pour les taux de testostérone malgré une grande dispersion des valeurs tant chez les rats infestés que chez les rats témoins. Cette dispersion était à mettre au compte de l'état pubère relatif de la population animale expérimentale. Le taux de LH sérique est très diminué alors que le taux de FSH sérique ne semble pas altéré. Les dosages de la FSH et de la LH hypophysaire donnent des valeurs statistiquement identiques à celles des témoins.

L'élément prépondérant chez les rats de 45 jours trypanosomés est donc une diminution importante du taux de LH circulante alors que la stéroïdogénèse testiculaire n'est pas affectée.

BILANS ENDOCRINIENS RELATIFS DE RATS  
INFESTES PAR UNE SOUCHE AIGUE DE  
T.b.brucei (AnTat 1.1A) (d'après M.HUBLART THESE 1989)

|                        | testos-<br>térone                                                                 | Oestradiol                                                                        | FSH sérique                                                                       | FSH hypophy-<br>saire                                                              | LH sérique                                                                            | LH hypo-<br>physaire                                                                |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| RATS<br>DE 10<br>MOIS  |  |  |  |  |    |  |
| RATS<br>DE 45<br>JOURS | N                                                                                 | N                                                                                 | N                                                                                 | N                                                                                  |  | N                                                                                   |


→ résultat statistiquement significatif

---> résultat statistiquement non significatif

N    taux normaux

taux supérieurs aux témoins

taux inférieurs aux témoins

Tableau 2

BILANS ENDOCRINIENS RELATIFS DE RATS  
INFESTES PAR UNE SOUCHE CHRONIQUE DE  
T.b.brucei (AnTat 1.1 E) (d'après M. HUBLART THESE 1989)

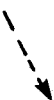
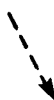
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Testostérone                                                                        | Oestradiol                                                                        | LH hypophysaire                                                                      | LH sérique                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>RATS DE 10 MOIS</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                     |                                                                                   |                                                                                      |                                                                                       |
| phase de latence                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | N                                                                                   |  |   | N                                                                                     |
| premier pic de parasitémie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    | N                                                                                 |    |    |
| phase de rémission                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    | N                                                                                 |    |    |
| phase de récurrence                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | N                                                                                   | N                                                                                 |  |  |
| 21 ème Jour                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  | ND                                                                                | ND                                                                                   |  |
| <b>RATS DE 45 JOURS</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                     |                                                                                   |                                                                                      |                                                                                       |
| Phase de latence                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | N                                                                                   | ND                                                                                |  | N                                                                                     |
| premier pic de parasitémie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |  | ND                                                                                | N                                                                                    |  |
| phase récurrente                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  | ND                                                                                | N                                                                                    |  |
| <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">  <br/>  <br/> N <br/>  <br/>  <br/> ND </div> <div> résultat statistiquement significatif<br/> résultat statistiquement non significatif<br/> taux normaux<br/> taux supérieurs aux témoins<br/> taux inférieurs aux témoins<br/> non dosé </div> </div> |                                                                                     |                                                                                   |                                                                                      |                                                                                       |

Tableau 3

En résumé, le dysfonctionnement endocrinien chez le rat âgé se traduit donc par une diminution de testostérone et d'oestradiol avec au niveau hypophysaire une augmentation des gonodostimulines, alors que chez le rat de 45 jours, la LH sérique diminue sans retentissement périphérique.

Au plan interprétatif nous soulignerons que la non traduction stéroïdienne au regard du taux de stimulines circulantes peut-être rapproché

1) au plan physiologique de l'âge choisi pour les rats utilisés : possibilité à 45 jours de rats non pubères ou partiellement immatures, possibilité à 10 mois d'une andropose débutante

2) au plan biochimique de la non fonctionnalité de la stimuline circulante. Cette notion peut être rapprochée

- de la notion d'isoformes de stimulines actives ou partiellement actives ou même inactives (le rat jeune possédant des formes actives dominante, le rat pré-androposique se caractérisant par l'apparition de formes non fonctionnelles)

- de l'hypothèse d'une dégradation possible des stimulines qui bien que dosées par la méthode radioimmunologiques pourraient être dissociées dans leur sous-unités ou même partiellement dégradées en fonction de l'intervention d'enzymes protéolytiques.

\* Infestation chronique :

Le tableau 3 résume les résultats obtenus sur les rats infestés par la souche chronique.

Chez les rats de 10 mois, le dosage de l'oestradiol n'a pas donné de différence significative quelle que soit la période étudiée. Pour la testostérone, on constate une baisse généralisée hautement significative pendant la phase de rémission du premier pic de parasitémie. La quantité de LH sérique diminue de manière non significative pendant toute la durée de l'infestation, et de toute manière insuffisamment pour provoquer la chute constatée de testostérone. Au 21ème jour, le dosage réalisé sur un nombre plus restreint d'animaux confirme cette tendance. La LH hypophysaire quant à elle, est diminuée très sensiblement dès le premier pic de parasitémie et aussi pendant la phase de rémission. Ces résultats montrent donc que, chez le rat de 10 mois, l'infestation chronique quand elle arrive à un stade évolutif amène une diminution significative de la testostérone s'accompagnant d'une concentration de LH sérique sensiblement normale.

Chez les rats de 45 jours, le dosage de testostérone en phase de latence donne des valeurs normales, alors qu'au premier pic de parasitémie et en phase récurrente une baisse est observée bien que statistiquement non significative.

Le dosage de la LH sérique se traduit par une baisse s'intensifiant au

cours de l'évolution de la parasitémie. Par contre, concernant la LH hypophysaire, il n'est pas apparu de modification significative du taux d'hormone. Les résultats indiquent que l'infestation chronique chez le rat de 45 jours provoque une diminution progressive de la testostérone non significative au plan statistique alors que l'hormone lutéinisante circulante diminue atteignant des pourcentages de variation hautement significatifs.

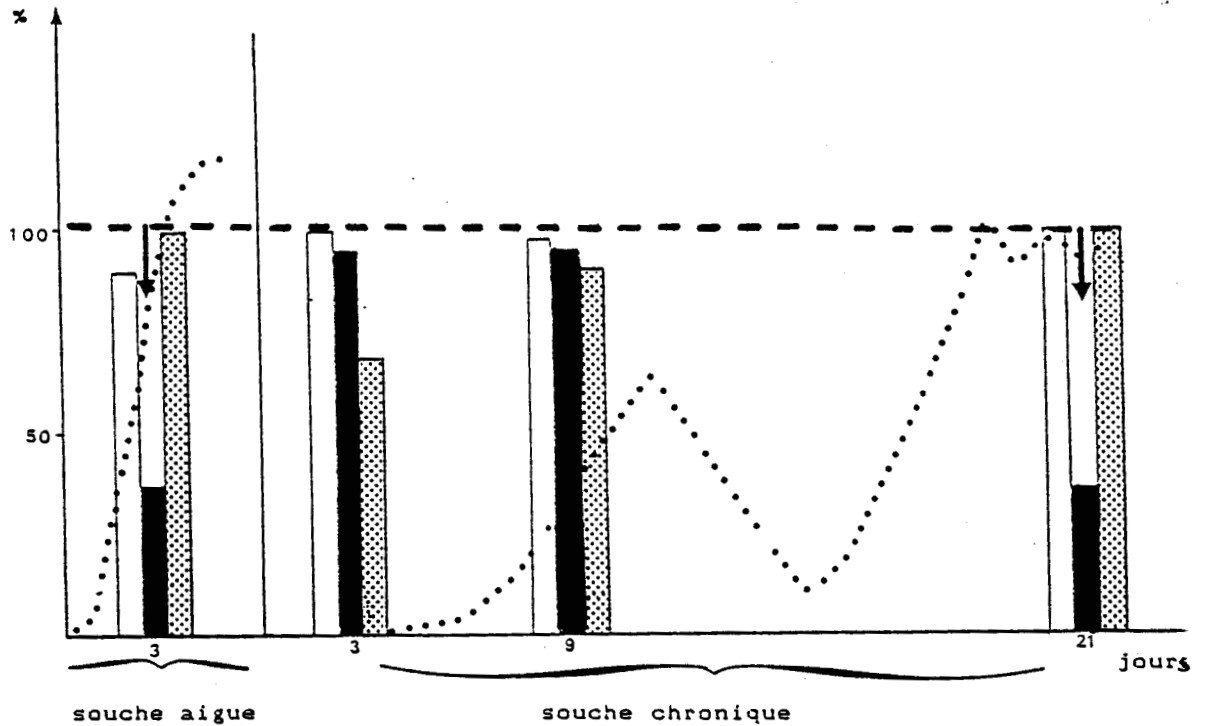
Au total, en situation d'infestation aigüe ou chronique, la différence entre rats de 45 jours et de 10 mois est moins perceptible lorsque la parasitémie est élevée moment où la baisse de LH sérique est la plus marquée s'associant ou non à une perturbation significative de la stéroïdogénèse.

Les figures 15 et 16 illustrent ce constat, indiquant les variations des paramètres hormonaux au regard de l'évolution de la parasitémie aigüe ou chronique.

Ainsi, il apparaît en conclusion de cette synthèse bibliographique que l'hypofonctionnement lié à la trypanosomiase est le résultat d'une dysrégulation originale, l'analyse statique et dynamique des niveaux gonadotropes classiques hypothalamus et hypophyse ne permettant pas de trouver une explication simple physio-pathologique. Il était donc indispensable de replacer les troubles endocriniens dans les conséquences du dialogue biologique entre le parasite et l'hôte.

Notre intérêt s'est porté sur les constituants de surface du trypanosome dont on sait qu'ils peuvent être sécrétés ou libérés dans le torrent circulatoire de l'hôte.

COMPARAISON D'UNE SOUCHE AIGUE ET CHRONIQUE CHEZ  
LE RAT AGE DE 45 JOURS  
(EFFETS SUR LA TESTOSTERONE, LA LH SERIQUE ET LA LH HYPOPHYSAIRE)  
(HUBLART THESE 1989)



résultats exprimés en pourcentage (%) par rapport aux valeurs témoins

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

□ : TESTOSTERONE

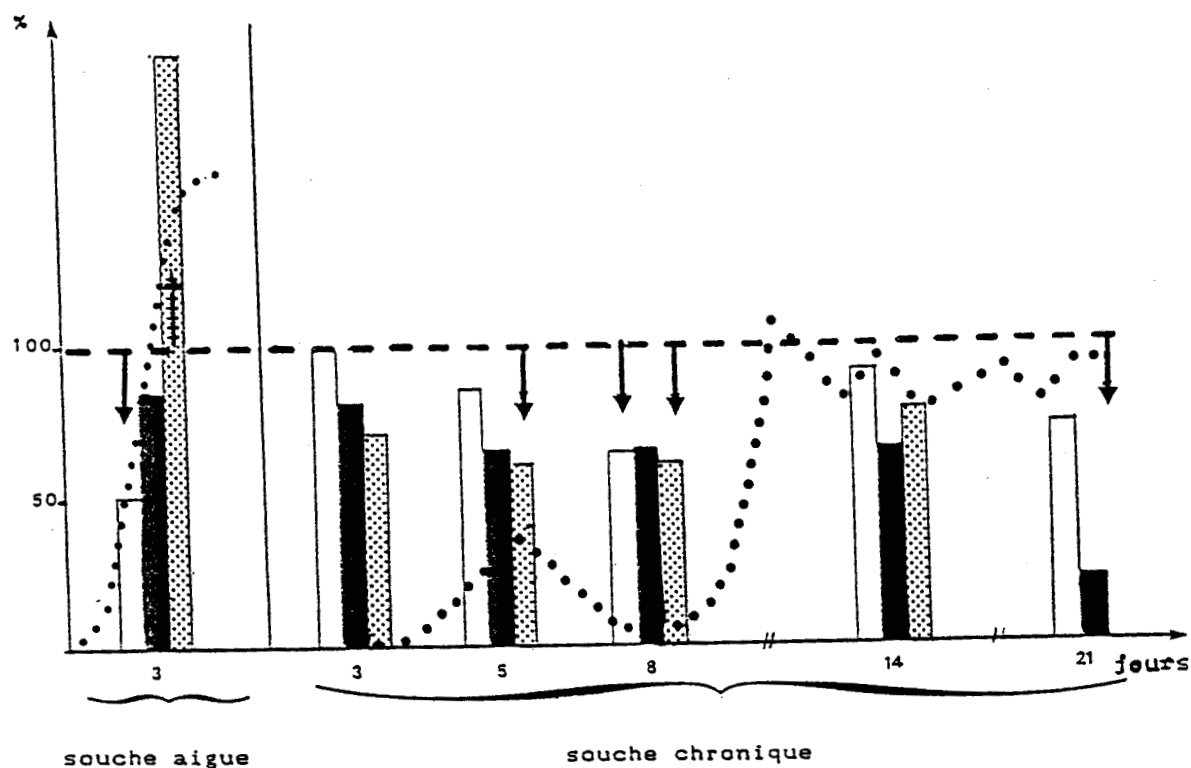
■ : LH SERIQUE

▨ : LH HYPOPHYSAIRE

... évolution de la parasitémie

Figure 15

COMPARAISON D'UNE SOUCHE AIGUE ET CHRONIQUE CHEZ  
LE RAT AGE DE 10 MOIS  
(EFFETS SUR LA TESTOSTERONE, LA LH SERIQUE ET LA LH HYPOPHYSAIRE)  
(HUBLART THESE 1989)



résultats exprimés en pourcentage (%) par rapport aux valeurs témoins

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

□ : TESTOSTERONE

■ : LH SERIQUE

▨ : LH HYPOPHYSAIRE

..... évolution de la parasitémie

Figure 16

°00°

## CHAPITRE IV

### BIOCHIMIE ET ROLES DES CONSTITUANTS DE SURFACE DU TRYPANOSOME

°00°



## A L'ANTIGENE VARIABLE DE SURFACE

### 1. Préparation et purification

La libération et la purification de l'antigène variable de surface (AVS) ont fait l'objet de nombreux travaux. On distinguera les protocoles qui respectent en partie l'intégrité cellulaire de ceux qui détruisent les parasites.

Les protocoles ne conduisant pas à la lyse des parasites sont proposés : (i) par Cross (1975) qui réalise une protéolyse ménagée sur les cellules conduisant à l'obtention d'AVS dégradé ; (ii) par Baltz et coll. (1976) qui incubent les parasites dans un tampon phosphate 0,125 M contenant du glucose à 1% (p/v), une nuit à 4°C sous agitation. Cette seconde technique, dont on ignore encore le mécanisme intime, et qui donne un bon rendement quantitatif et qualitatif sans contamination intracellulaire, constituera le protocole de référence de nos préparations antigéniques.

Les protocoles qui provoquent la cytolysse sont plus nombreux : homogénéisation en présence de billes de verre (Cross, 1975), lyse osmotique (Cross, 1984), congélation-décongélation (Rovis et coll. 1978), filtration d'une préparation décongelée sur microseringue (Onodera et coll. 1981), sonication (Strickler et coll. 1978), lyse par le dioxane (Reinwald et coll. 1981), traitement par les détergents (Cardoso de Almeida et Turner, 1983 ; Ferguson et Cross, 1984 ; Grab et coll. 1984 ; Gurnet et coll. 1986), et traitement acide (Jackson et coll. 1985 ; Clarke et coll. 1985).

Certains de ces protocoles (traitement par les détergents et traitement acide) ont pour résultat l'obtention de l'AVS dans son intégrité (forme membranaire). Les autres protocoles livrent l'AVS dépourvu de son pied d'ancrage (forme soluble).

Partant de ces préparations, ont été décrits plusieurs protocoles de purification par chromatographie :

- d'échange ionique (Cross, 1975)
- d'affinité lectinique (Baltz et coll., 1976 ; Reinwald et coll., 1981 ; Diffley et Jayawardena, 1982 ; Ferguson et Cross, 1984)
- d'immunoaffinité (Diffley et Jayawardena, 1982)
- de chromatographie liquide haute performance (Clarke et coll. 1984, 1985)

L'AVS purifié a fait l'objet d'études structurales et fonctionnelles dont nous résumons ici les principaux résultats.

## 2. Structure

L'AVS est une glycoprotéine de masse moléculaire environ 60 kd dont la description structurale est ici résumée.

### \* Structure primaire

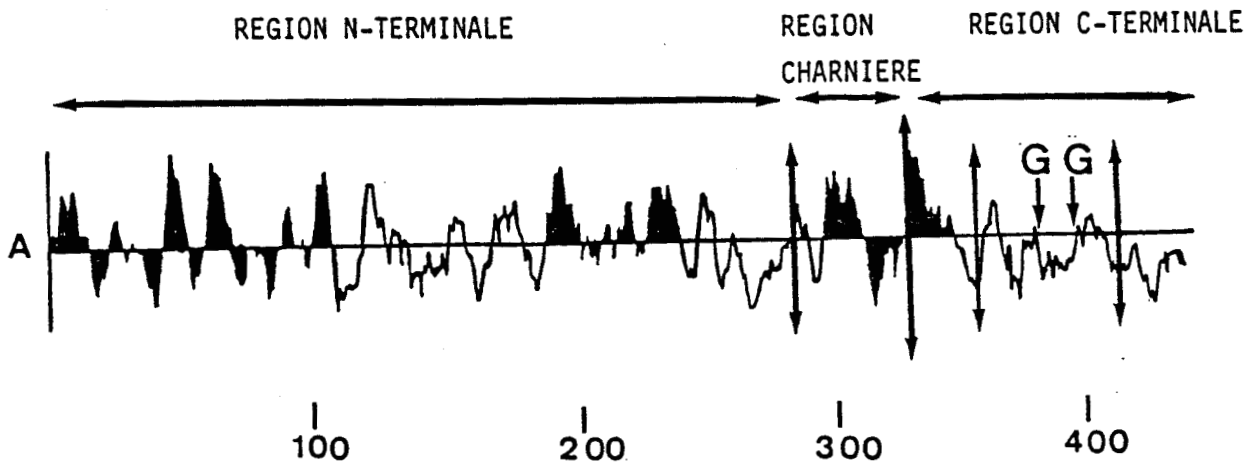
L'axe peptidique comprend 450 à 500 résidus d'acides aminés. Il est divisé en un domaine 2/3 N-terminal et un domaine 1/3 C-terminal par une région charnière sensible aux protéases (Johnson et Cross, 1979 ; Gomes et coll. 1986) (Fig. 17A). Les études comparatives par séquençage cDNA (Rice-Fish, 1981 ; Pays et coll. 1983a, 1983b ; Boothroyd et coll. 1982) montrent que le domaine N-terminal, support de la variation antigénique, présente une grande hétérogénéité au sein de la même espèce (T. brucei). A l'inverse, des homologies du domaine C-terminal permettent de distinguer deux groupes d'AVS : tous les AVS du groupe I sont caractérisés par la présence d'un résidu acide aspartique ou d'une asparagine en acide aminé C-terminal, alors que pour les AVS du groupe II il s'agit d'un résidu sérine.

Gomès et coll. en 1986, ont comparé la distribution relative des régions hydrophiles et hydrophobes de l'AVS à partir de la séquence cDNA de plusieurs variants de T.b. brucei et ont montré que la région C-terminale est très hydrophile alors qu'est retrouvée une distribution alternative de l'hydrophobie/hydrophilie dans la région N-terminale (Fig. 17A).

Concernant les substitutions, l'axe peptidique comprend deux types de glycanes. Les études génétiques déjà citées, indiquant l'existence d'au moins un site potentiel de N-glycosylation (Asn-X-Thr) situé à 50 résidus de l'acide aminé C-terminal des AVS de type I, ou à 5 à 6 résidus pour les AVS de type II. Dans les deux groupes, sont localisés d'autres sites potentiels le long de l'axe peptidique. D'un point de vue structural, tous les AVS sont substitués par au moins un glycanne de type N-oligomannosidique de structure comparable à celle décrite chez les eukaryotes (Strickler et Patton, 1980 ; Holder et Cross, 1981 ; Mc Connel, 1983 ; Egge et coll. 1986 ; Frommel et Balber, 1987 ; Bangs et coll. 1988). Bangs et coll. ont de plus montré que d'autres glycanes du même type étaient issus d'un processus différent de glycosylation.

Un second glycanne constitue la région polaire d'un complexe glycolipidique qui substitue l'acide aminé C-terminal par une liaison peptidique avec le groupement amine d'une éthanolamine phosphate (Ferguson et coll. 1985b). La structure de l'ensemble glycolipidique a été récemment entièrement déterminée (Ferguson et coll. 1988) indiquant la substitution de l'éthanolamine phosphate par un glycanne de structure originale, trimannosique substitué par un nombre

ZONES D'HYDROPHOBIE ET D'HYDROPHILIE  
RELATIVES DU VARIANT AnTat 1-1 A (GOMES ET COLL 1986) (A)  
ET LOCALISATION DES PONTS DISULFURES ET DU GROUPEMENT  
THIOL DANS L'AVS 117 OU MITat 1-4 (ALLEN ET GURNET 1983) (B)



Les courbes représentent l'hydrophobie relative (au dessus) et l'hydrophilie relative (au dessous) de la protéine le long de la séquence déterminées à partir de la séquence cDNA (p77).  
G = sites potentiels de glycosylation

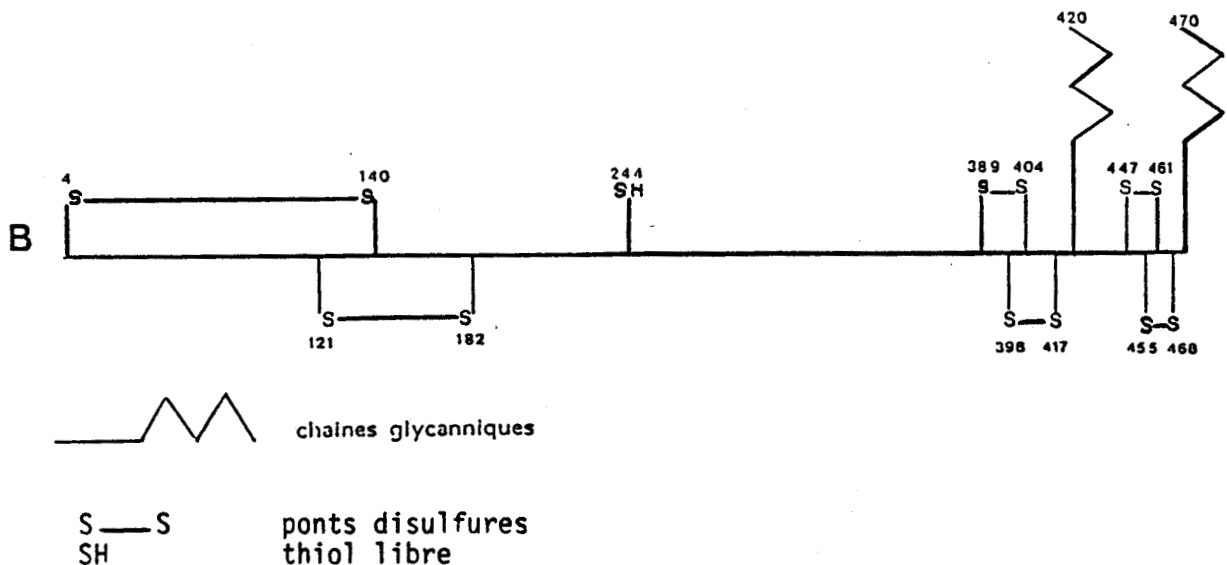


Figure 17

variable de résidus galactose. La glycosamine non acétylée (Strang et coll. 1986) située en bout de chaîne est substituée par une structure dimyristyl phosphatidylinositol dont le rôle a été défini comme l'ancrage membranaire de la molécule (Ferguson et coll. 1985a) (Fig. 18).

#### \* Structure secondaire

L'utilisation des méthodes classiques de détermination de structure secondaire montre avec Lalor et coll.. (1984) une grande diversité dans la fréquence prédictionnelle de distribution en  $\alpha$  hélices,  $\beta$ -turn et  $\beta$ -sheet. La détermination par calcul, à partir d'analyses spectrales de l'AVS de T. equiperdum révèle là aussi une variation des structures secondaires : 28 à 69% de  $\alpha$  hélice ; 25 à 49% de  $\beta$ -sheet ; 17 à 43% de structures désordonnées (Duvillier et coll. 1983). Ces études sont complétées par la cristallographie aux rayons X (Freyman et coll. 1984 ; Metcalf et coll. 1987). Cependant, pour des raisons inexplicables, les auteurs ne parviennent à obtenir de cristal que du domaine 2/3 N-terminal de l'AVS soluble. Partant du variant MiTat 1-2, des 360 acides aminés du domaine, 270 ont été identifiés. La partie non identifiée correspond à la région supérieure de la molécule, probablement épitopique.

Les 270 acides aminés comprennent plusieurs régions en  $\alpha$  hélice dont une grande de 90 Å formant une boucle, et une petite de 30 Å, parallèle à la première (Fig. 19). Metcalf et coll.. (1987) ont comparé MiTat 1-2 à un autre variant IITat 1-24, d'origine et de structure très éloignées, et ont pu obtenir une homologie importante de structure hélicoïdale. Ils suggèrent alors que tous les AVS ont une structure secondaire commune.

#### \* Structure tertiaire (Fig. 19)

L'association des résultats de cristallographie et la détermination des ponts disulfures interchaines ont permis d'approcher la structure tertiaire de l'AVS. Les ponts disulfures ont été localisés uniquement sur un AVS du groupe I, MiTat 1-4 (Allan et Gurnett, 1983). Il comprend 4 ponts dans la région C-terminale et 2 ponts dans la région N-terminale (Fig. 17B). La comparaison de séquences indique une conservation importante des 8 résidus de cystéine dans la région C-terminale essentiellement pour les AVS du groupe I. Le rôle de ces ponts disulfures est de maintenir une structure rigide C-terminale (Allan et Gurnett, 1985). Mais aussi, comme cela a été observé sur un variant de T. congolense, les liaisons joueraient une part importante dans les épitopes cryptiques de la molécule (Fish et coll. 1989). A l'opposé, on observe des différences entre les variants dans le domaine N-terminal avec notamment l'existence d'une 13ème thiol (cystéine position 244) pour le variant AnTat 1-1

STRUCTURE DU COMPLEXE GLYCOLIPIDIQUE  
C-TERMINAL DE L'AVS MEMBRANAIRE  
MITat 1-4 (FERGUSON ET COLL.1988)

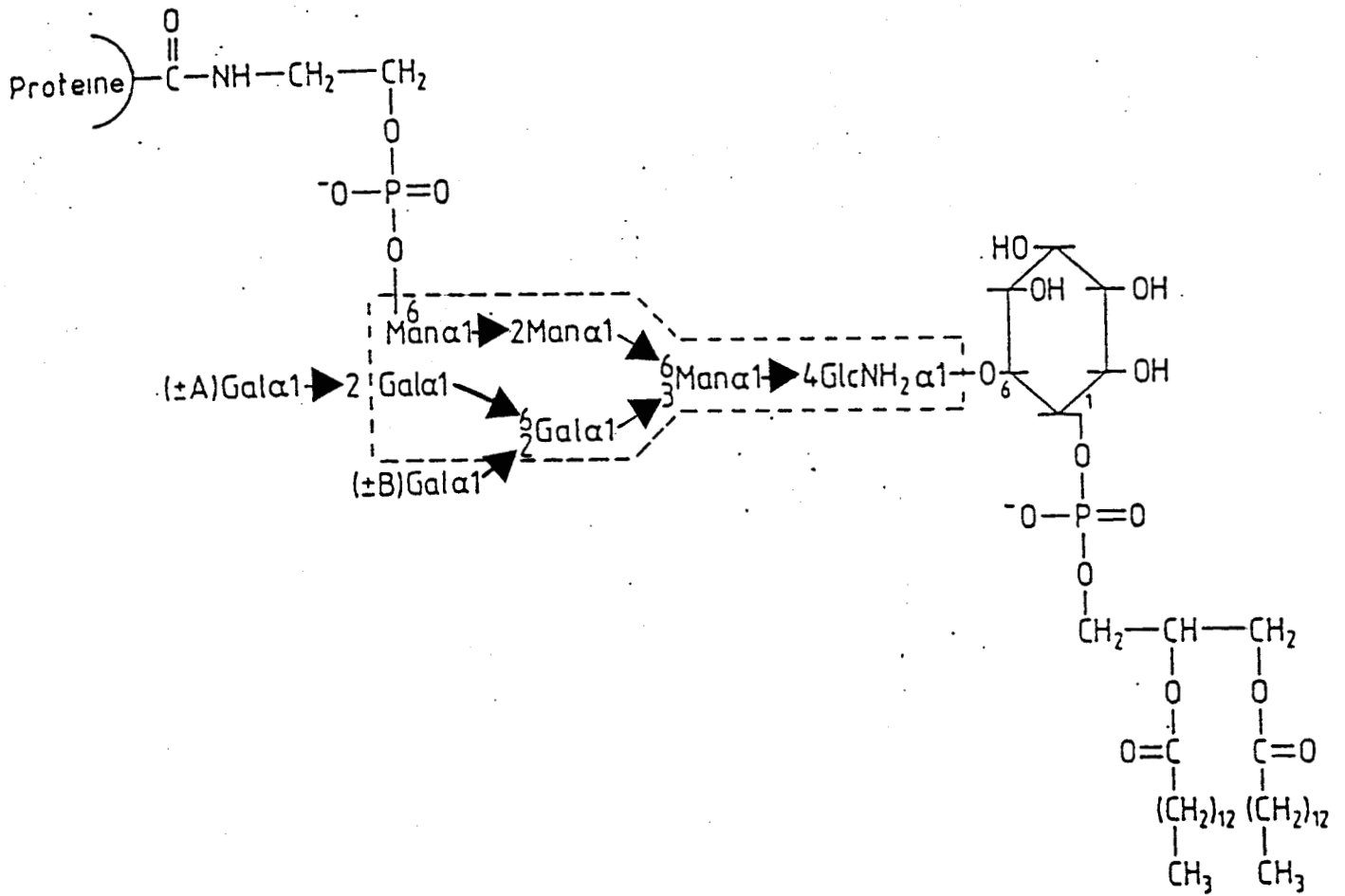
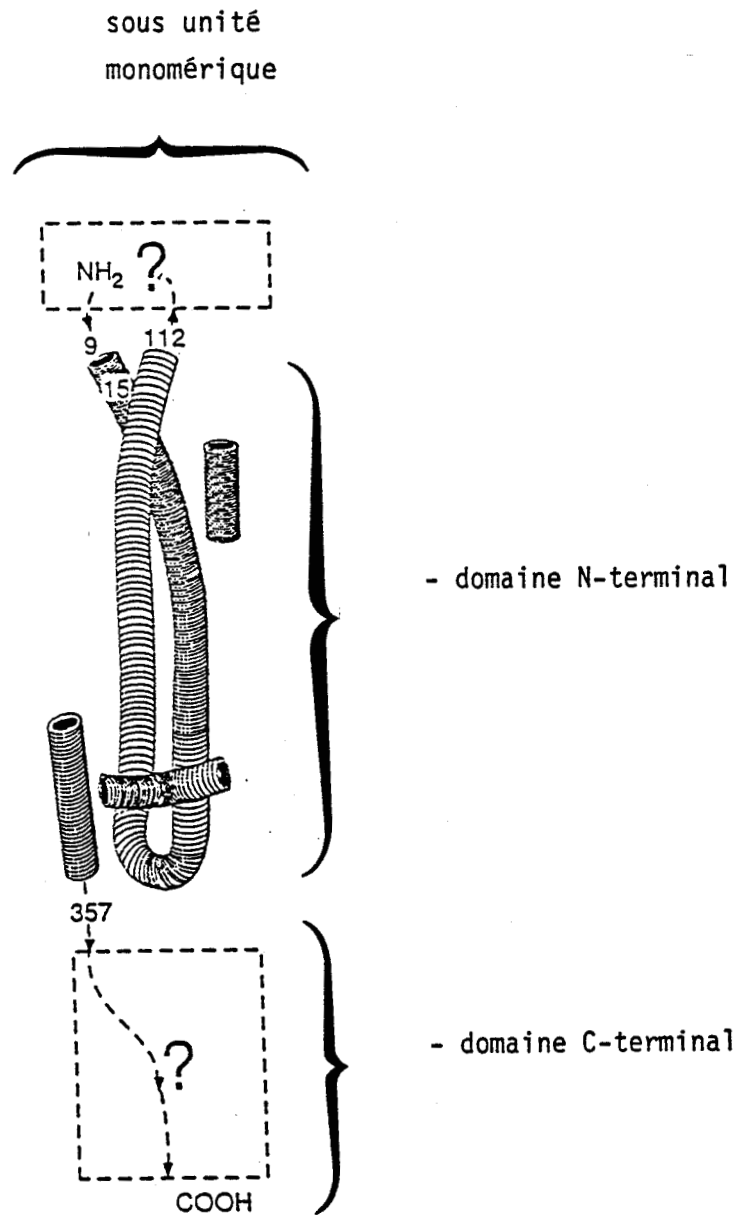


Figure 18

ESTIMATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE HELICOIDALE DE  
l'AVS MITat 1.2 (TURNER 1988)



les cylindres caractérisent les structures hélicoidales, seules représentées

Figure 19

(Pays et coll. 1983a). Néanmoins, Olafson et coll. (1984) remarquent qu'une cystéine située autour du quinzième acide aminé est assez bien conservée. Sur le variant MiTat 1-2, cette cystéine forme une extrémité de la boucle de 131 acides aminés observée par cristallographie. Cette structure, étudiée chez un variant très différent, semble aussi très conservée (Metcalf et coll. 1987).

#### \* Structure quaternaire

Le manteau de surface est constitué de l'association étroite de  $10^7$  AVS. Y-a-t-il des éléments associatifs entre les AVS ? En solution, la molécule peut être dimérique et parfois polymérique (Auffret et Turner, 1981 ; Strickler et Patton, 1982 ; Gurnet et coll. 1986 ; Huet-Duvillier et coll. 1988) pour T. b. brucei mais aussi pour d'autres espèces : T. b. gambiense (Vervoort et coll. 1981) ; et T. evansi (Cross, 1977 ; Vervoort et coll. 1981). Quels sont les phénomènes associatifs, et les régions concernées ? Auffret et Turner (1981) et Metcalf et coll. (1987) invoquent l'intervention de liaisons non covalentes, hydrophobes ou de Van der Waals. Strickler et Patton (1982) par l'utilisation de marqueur bifonctionnels, et Huet-Duvillier et coll. (1988) par marquage spécifique des thiols, proposent l'intervention de pont disulfure interchaîne pour d'autres variants. Les deux domaines sont probablement impliqués puisque Auffret et Turner (1981) obtiennent du dimère C-terminal, et la cristallisation qui sélectionne le domaine N-terminal, donne toujours du dimère. De plus, Homans et coll. en 1989 ont décrit pour le variant MiTat 1-4, une structure d'ancrage formant des dimères en solution.

Ainsi cette revue sur la biochimie de l'AVS permet de montrer que si la structure primaire est différente au sein même d'une sous-espèce, l'architecture de la molécule ainsi que son organisation ont tendance à s'homogénéiser, faisant intervenir des principes physicochimiques différents, pour aboutir à un objectif primordial : assurer la cohésion protectrice du manteau de surface des parasites. Cependant, le manteau joue d'autres rôles notamment dans la "nutrition" des parasites. Il existe alors en surface d'autres constituants appelés antigènes communs dont les rôles ne sont pas tous définis et dont certains se caractérisent par une activité enzymatique pour d'autres par une absence totale d'identification.

#### B. LES ENZYMES MEMBRANAIRES

Les études de la membrane plasmique des trypanosomes ont révélé l'existence de nombreuses activités enzymatiques. Certaines de ces activités étant plus ou moins liées à l'AVS.

## 1. Enzymes membranaires relatifs à l'AVS

Compte-tenu de la structure d'ancrage à phosphatidyl inositol de l'AVS, et sachant que les techniques préparatives de la molécule aboutissent selon les conditions à l'AVS membranaire ou l'AVS soluble dépourvu du pied d'ancrage, le rôle d'un facteur enzymatique endogène dans la libération de la glycoprotéine a été très vite suspecté, initialement par Ferguson et coll.. (1985a) qui suggèrent que la conversion AVS membranaire --> AVS soluble est le résultat de l'action d'une phospholipase C endogène (PLC), l'activation ou l'inhibition de cette enzyme favorisant la libération de l'une ou l'autre forme d'AVS.

Par la suite, Bulow et Overath (1985) proposent la responsabilité de cette PLC dans la perte du manteau de surface qui se produit lors du passage de parasites de l'hôte vertébré à la mouche Tsé-Tsé. Plusieurs équipes purifient l'enzyme en 1986 (Fox et coll. ; Bulow et coll. ; Hereld et coll.). Cette protéine ayant une masse moléculaire d'environ 39 kd, agit lorsqu'elle est située sur la même couche bilipidique que l'AVS, est très spécifique, et enfin est activée par les agents réducteurs. Grab et coll. (1987) localisent la PLC au niveau de la poche flagellaire du parasite, région essentielle dans le dialogue nutritionnel, et proposent un rôle de l'enzyme dans le recyclage du manteau de surface par un mécanisme d'endocytose. Plus récemment, Bulow et coll. en 1989 confirment ce mécanisme de dégradation du manteau tout en soulignant le rôle de la PLC dans la différenciation. Enfin, les études génétiques de l'enzyme ont révélé que son gène n'était pas associé à celui de l'AVS (Carrington et coll. 1989).

Une autre enzyme membranaire a été suspectée comme impliquée dans la libération de l'AVS. Martin et coll. (1978) localisent sur la face cytoplasmique une adénylate cyclase qui est par la suite analysée in situ par perméabilisation membranaire (Voorheis et Martin, 1980). Les auteurs montrent que l'enzyme est dépendant du calcium. De plus, les anestésiques locaux comme le benzyl alcool sont aussi activateurs de l'adénylate cyclase et potentialisateurs de l'activation par le calcium (Voorheis et Martin, 1982). L'implication de l'enzyme dans la libération de l'AVS repose sur l'observation faite par ces auteurs que les effecteurs de l'adénylate cyclase activent aussi la libération du manteau. De même, le zinc agit comme inhibiteur des deux systèmes.

## 2. Autres enzymes décrits

Plusieurs activités enzymatiques très différentes mais de rôle mal défini ont été décrites notamment lors d'études de marqueurs membranaires. Mc



Laughlin en 1981 décèle chez T.b. rhodesiense une ATP-ase très affine pour le calcium. De même, Gbenle et coll. (1986) montrent chez T. brucei l'existence d'une activité 3' nucléotidase probablement portée par la même molécule. Une glucosidase a été localisée en situation membranaire (Steiger et coll. 1980) ainsi qu'une ATPase Na, k dépendante (Voorheis et coll. 1979 ; Provis et coll. 1980) et une glycosyl transférase par Brett et coll. (1980) qui montrent l'existence d'une N-acetylglucosamine transférase au niveau interne de la membrane. D'après ces auteurs, l'enzyme n'agit pas au niveau de l'AVS, car ils n'ont pu observer de protéines cibles de taille correspondante. Cependant, ils n'excluent pas que l'activité concerne les précurseurs de la glycoprotéine.

Enfin, une enzyme du métabolisme lipidique, la dihydrolipoamide déshydrogénase a été localisée au niveau membranaire (Danson et coll. 1987). La présence de cette enzyme est d'autant plus surprenante que les autres enzymes du complexe fonctionnel auquel elle appartient sont en partie absentes. Les auteurs suggèrent alors que l'enzyme joue un autre rôle par exemple dans le transport de métabolites comme le glucose.

De nombreuses enzymes de situation autre que membranaire ont été répertoriées et caractérisées chez les trypanosomes, compte-tenu de nos travaux personnels, nous limiterons notre revue bibliographique aux enzymes de la protéolyse et du métabolisme oxydatif.

### 3. Les enzymes protéolytiques et les enzymes du métabolisme oxydatif

Ces deux familles enzymatiques ont fait l'objet d'études poussées principalement en raison de la recherche de leur éventuelle responsabilité dans la relation hôte parasite (protéases) et aussi de leur place dans un métabolisme original ouvrant des perspectives thérapeutiques intéressantes (métabolisme oxydatif).

#### a. Les protéases

Lorsqu'il décrit en 1975 son protocole de purification de l'AVS, Cross montre clairement l'existence d'activités protéolytiques alcalines de type sérine protéases libérées par rupture cellulaire. Steiger et coll. (1980), dans une étude par fractionnement cellulaire, localisent une protéinase acide au niveau d'organites de type lysosome. Une étude plus systématique de ces enzymes est réalisée par Lech et Gibson (1981) qui, partant de lysat de T. brucei, démontrent six activités peptidasiques similaires aux peptidases d'hématie. Cependant, les auteurs constatent un certain polymorphisme au sein de cette

espèce. North et coll. (1983) élargissant l'investigation en analysant par dosage et gel de polyacrylamide contenant un substrat, le contenu protéasique de T. brucei, T. equiperdum, T. evansi, T. vivax, Leishmania Tarentolae et Chrithidia fasciculata. Pour les quatre espèces de trypanosome, ils identifient une activité de type cystéine protéase, peu exprimée par les formes procycliques (phase invertébrée), et une activité sérine protéase élevée chez ces mêmes formes. Il apparaît cependant que les cystéine-protéases se divisent au moins en deux groupes distincts, dont un ne présente pas les caractéristiques classiques des cystéine-protéases. En effet, à pH 6,0, le dithiotreitol théoriquement activateur, a un effet inverse. Faisant appel à des techniques identiques, Lonsdale-Eccles et coll. (1986) comparent plusieurs espèces de trypanosomes africains (T. congolense, T. evansi, T. b. brucei, T. b. gambiense). Des protéases de masse moléculaire variée caractérisent ces espèces mais les auteurs notent l'existence commune à T. evansi et T. brucei d'une protéase de masse moléculaire environ 28 kd. Les essais d'effecteurs, en particulier le E-64 (trans Epoxy Succinyl-leucyl amido (4-guanido) butane) sur cette molécule, indiquent qu'il s'agit d'enzymes de type cathepsine B et L actives entre pH 5,0 et pH 6,0. Les auteurs confirment le faible taux de cystéine-protéases chez les formes procycliques et ajoutent qu'en revanche le taux est normal chez les formes infestantes du mammifère (formes métacycliques).

De plus, se basant sur des comparaisons de temps de protocole de préparation, les auteurs suggèrent que l'activité à 28 kd est le produit final de la protéolyse de molécules de plus haut poids moléculaire qui ont été aussi observées. Enfin, ils soulignent l'importance de ces protéases en montrant que certaines drogues trypanocides (Berenil et pentamidine) ont un effet inhibiteur sur leur activité. Les mêmes auteurs en 1987, élargissent leur approche par l'utilisation de substrats peptidiques fluorescents et en purifiant les lysosomes. Ils y localisent une activité cystéine-protéase optimale à pH 6,0 de type cathepsine L et de masse moléculaire 27 kd. De plus, l'addition de sérum sain à la préparation lysosomiale fait apparaître des tranches d'activités de poids moléculaire élevé (de 35 à 110 kd selon l'origine des sérums). Plusieurs éléments semblent en faveur de "transporteurs" d'activité plutôt que d'une activation de protéases plasmatiques par des protéases parasites. D'autre part, une enzyme alcaline cytoplasmique de type sérine-protéase, inhibée partiellement par l' $\alpha$  2 macroglobuline (non active sur la cystéine-protéase), et susceptible d'être libérée dans le milieu extracellulaire est identifiée.

La libération extracellulaire d'enzymes protéolytiques parasites est étudiée indirectement par Knowles et coll. sur T. brucei (1987) et T. congolense (1989) qui montrent par gels d'amidon l'existence d'activités peptidasiques

respectivement de 40 kd et 60 kd dans les sérums d'animaux infestés. Les activités étant retrouvées dans les lysats parasitaires, et tout particulièrement dans les formes stumpy. Plus directement, Nwagwu et coll. (1988), en incubant des parasites (T. brucei) dans un tampon phosphate salin glucosé (PSG pH 8,0) ou dans du sérum de rat sain, constatent la libération de deux sérine-protéases (pH 5,4 et pH 8,0) dans le premier et une seule dans le second (pH 8,0). Cette dernière activité est retrouvée dans le sérum de rats infectés. Knowles en 1987 avaient observé une activité peptidasique abolie en présence de sérum sain, là encore il apparaît que l'activité à pH 5,4 est modifiée par le sérum.

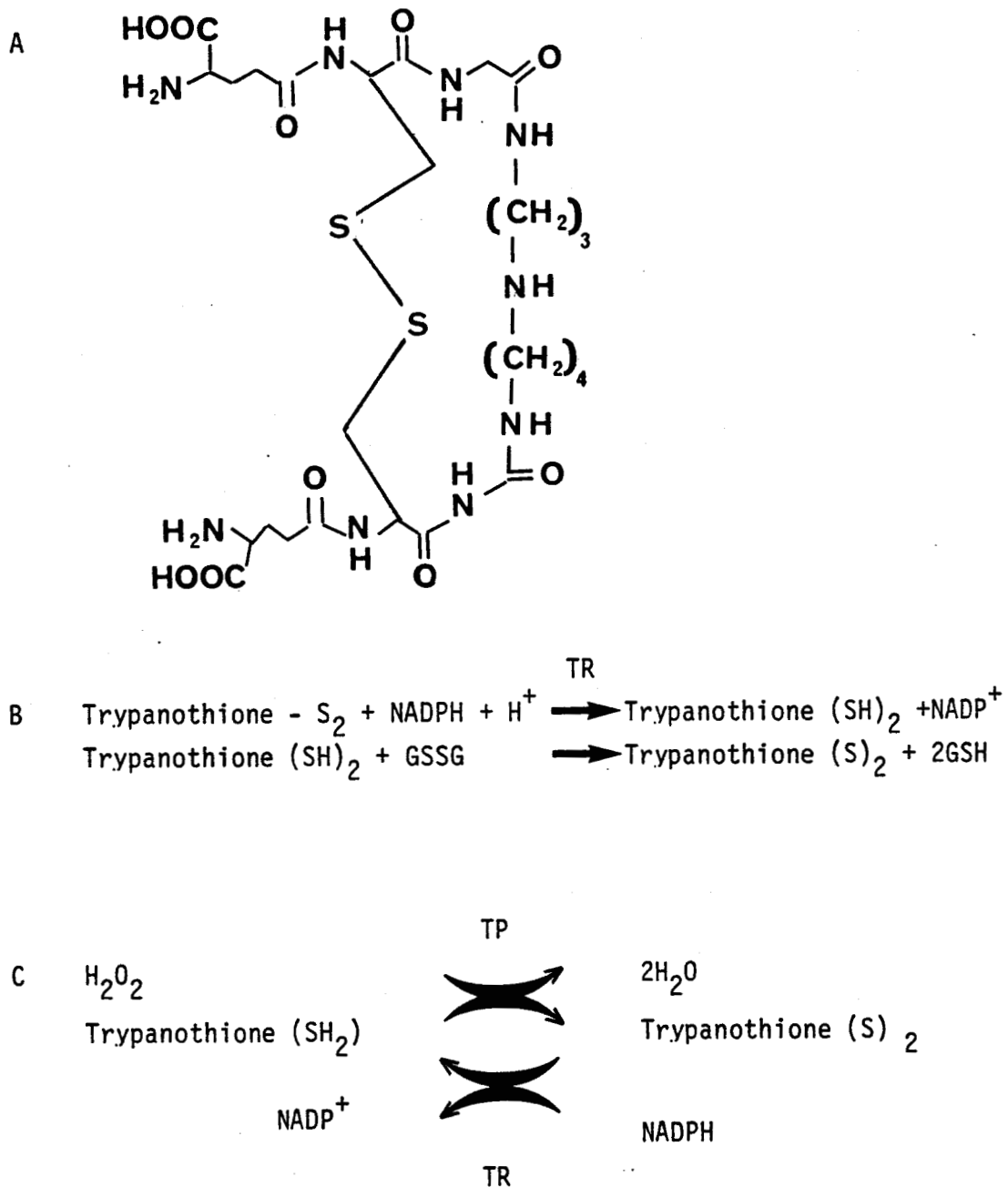
Certaines des études de protéases parasitaires ont porté sur les formes évolutives du trypanosome. Récemment, Pamer et coll.. (1989) ont quantifié une cystéine-protéase de 27 kd supposée identique à celle décrite par Lonsdale-Eccles (1987), au cours du cycle cellulaire et constatent que l'enzyme est plus abondante chez les formes stumpy que chez les formes slender. Cette activité est au contraire peu exprimée chez les formes procycliques comme cela avait été déjà démontré (North et coll. 1983 ; Lonsdale-Eccles, 1986).

#### b. Les enzymes du métabolisme oxydatif

Arrick et coll. (1981) montrent que T.b. brucei présente une sensibilité élevée à l'absence de glutathion réduit (GSH). Le rôle du GSH comme protecteur intracellulaire représentant en effet un grand intérêt en chimiothérapie puisque les trypanosomes africains et américains semblent dépourvus de système efficace de défense contre l'eau oxygénée et ses radicaux libres (Meshnick et coll. 1978 ; Boveris et coll. 1980).

Le glutathion oxydé issu de l'utilisation du GSH doit nécessairement être réduit rapidement. Dans les cellules de mammifères, la glutathion réductase à NADPH est l'enzyme responsable de cette réduction, mais chez les trypanosomes, certaines observations semblent indiquer que le mécanisme est différent (Fairlamb et coll. 1985a). En effet, les auteurs mettent en évidence l'existence d'un co-facteur spécifique, indispensable au fonctionnement de l'enzyme. Ce co-facteur a été caractérisé la même année par Fairlamb et coll. (1985b), il est constitué de deux molécules de glutathion liées covalentiellement par leur groupement COOH à une molécule de spermidine, les auteurs lui donnent le nom de trypanothione (Fig. 20A). Ils retrouvent cette molécule chez T. cruzi, Leishmania, et Crithidae fasciculata. La trypanothione réductase qui régénère le co-facteur réduit a d'ailleurs été isolée chez C. fasciculata (Shames

# LA TRYpanOTHIONE



A structure de la trypanothione

B réduction du glutathion par la trypanothione réductase (TR)

C réduction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par la trypanothione peroxydase (TP)

Figure 20

et coll. 1986) et T. cruzi (Krauth-Siegel et coll. 1987) et son gène est isolé à partir de T. congolense (Shames et coll. 1988). Cette enzyme présente l'originalité d'avoir un site de reconnaissance à la spermidine (Henderson et coll. 1987a).

Si, en 1985, Fairlamb propose le schéma à double ligne pour la réduction du glutathion (Fig. 20B) la responsabilité de ce dernier dans l'élimination de  $H_2O_2$  n'est pas démontrée. Il faut attendre Penketh et coll. en 1986 et 1987 qui proposent un mécanisme enzymatique à  $NADPH_2$  faisant jouer la trypanothione comme réducteur. Cependant, ces auteurs ne peuvent déceler la présence de peroxydase, enzyme nécessaire à la dégradation. Henderson et coll. (1987) parviennent à l'isoler chez C. fasciculata et T. brucei et démontrent que l'élimination de  $H_2O_2$  est réalisée par une trypanothione peroxydase selon un schéma bien établi (Fig. 20C) où comparativement aux systèmes décrits chez les mammifères, la trypanothione remplace le glutathion.

En dehors du potentiel thérapeutique apporté par l'originalité du co-facteur, la trypanothione représente un intérêt dans le sens où elle peut agir directement ou indirectement à d'autres niveaux tant chez l'hôte que chez le parasite.

## CONCLUSION

Parmi les constituants de surface du trypanosome qui sont identifiés dans le "manteau" qui recouvre le parasite et assure une microbiologie de surface, deux groupes de composés sont décrits :

- l'antigène variable de surface,
- les antigènes communs.

Si l'AVS est maintenant parfaitement décrit quant à sa structure, on ignore encore beaucoup de son rôle biologique.

Parmi les antigènes communs, nombre d'activités ont été décrites. Nous limiterons notre intérêt aux activités enzymatiques et plus particulièrement aux activités protéolytiques.

Dans notre recherche de mécanismes expliquant l'immuno dépression et les dysrégulations endocriniennes au cours de la trypanosomiase, notre travail fera largement appel à ces deux types de constituants dont on sait qu'ils peuvent être libérés depuis la membrane plasmique du parasite vers le torrent circulatoire par lequel ils peuvent s'exprimer au niveau moléculaire et aussi au niveau cellulaire et tissulaire.

°00°

DEUXIEME PARTIE :

R E S U L T A T S

°00°

°00°

## CHAPITRE I

PREPARATION ET ETUDE BIOCHIMIQUE DU

MATERIEL DE SURFACE PARASITAIRE

°00°

## INTRODUCTION

Les études enzymatiques, immunologiques, endocriniennes présentées dans le mémoire ont nécessité la préparation et la purification de matériel parasitaire de surface.

Dans ce chapitre sont décrits les différents protocoles utilisés ainsi qu'une caractérisation biochimique des molécules préparées.

### A. OBTENTION DES PARASITES

Les trypanosomes, clonés par l'Institut de Médecine Tropicale de Anvers (Fig. 21) sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans une solution à base de glycérol <sup>1</sup>. Un passage de ce stabilat par injection intrapéritonéale <sup>2</sup> (i.p.) à des souris Swiss mâles est nécessaire pour réactiver la population. Lorsque la parasitémie, contrôlée par observation microscopique, est maximale (2 jours), le sang de souris est injecté <sup>2</sup> i.p. à des rats Sprague-Dawley sous un volume de 5 ml contenant 50 à  $100 \times 10^6$  trypanosomes. Trois jours après l'infestation, les rats sont sacrifiés après anesthésie par injection i.p. de 1,1 ml d'une solution de pentobarbital contenant de l'héparine <sup>2</sup>. le sang de rat parasité est, dès son obtention, repris en solution <sup>4</sup> contenant PSG <sup>3</sup>, héparine, et, selon les protocoles, antiprotéases <sup>5</sup>. Le mélange est déposé sur une colonne de DEAE-cellulose <sup>6</sup> qui retient les éléments sanguins alors que les trypanosomes sont recueillis quantitativement. Une étape de centrifugation (1 500 g, 15 minutes,  $4^{\circ}\text{C}$ ) permet alors le "lavage" des parasites et leur obtention sous forme de culot parasitaire.

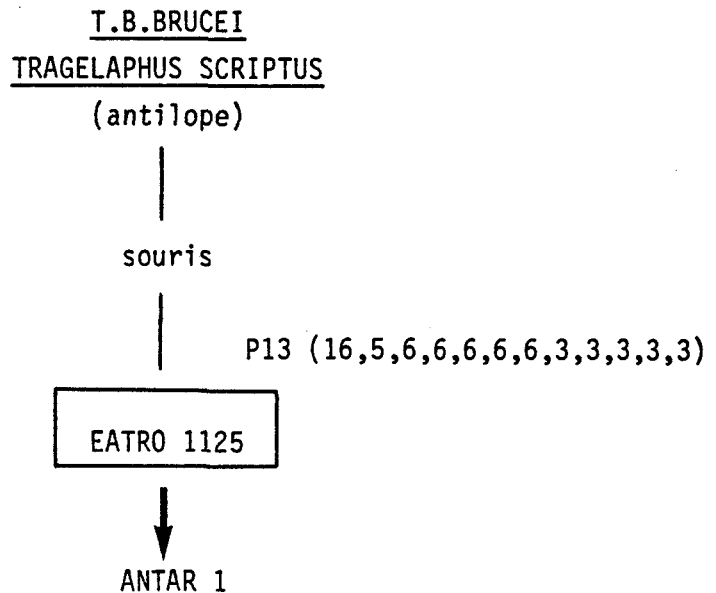
### B. TRAITEMENT DES CULOTS PARASITAIRES

Les culots parasitaires sont soumis à des traitements qui ont pour but la libération du manteau en vue de la préparation de l'antigène de surface (AVS). En réalité les protocoles actuellement utilisés, qu'ils mènent vers l'antigène sous "forme soluble" ou sous "forme membranaire" libèrent aussi toute une série de constituants de surface identifiés ou encore inconnus et à activités biologiques très diversifiées. Il faut souligner néanmoins que sur le plan quantitatif, l'antigène variable est de très loin l'élément constitutif principal du manteau parasitaire.

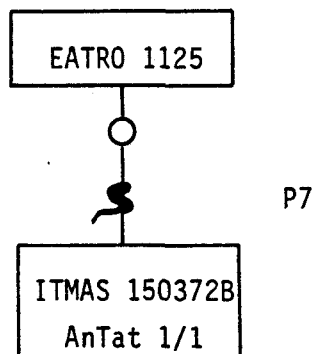


CLONAGE DU VARIANT AnTat 1.1 de Trypanosoma brucei brucei  
(D'APRES MAGNUS ET COLL 1983)

A. Constitution d'un répertoire



B. Clonage



A Un prélèvement sanguin est réalisé sur une antilope naturellement infestée. Après 13 passages adaptatifs sur souris, la population obtenue, EATRO 1125 constitue le répertoire d'antigènes variables AnTAR 1.

B Le clone AnTat 1.1 est obtenu par sélection arbitraire d'un parasite élémentaire, puis multiplication sur souris.

Figure 21

## 1. Préparation et purification de l'antigène de surface sous "forme soluble"

Pour la libération du manteau, nous avons retenu un protocole décrit par Baltz et coll. dès 1976, protocole auquel nous avons apporté plusieurs modifications, qui ont eu pour but, soit d'améliorer le rendement, soit d'assurer le plus possible une conservation de l'intégrité des entités moléculaires libérés depuis la surface parasitaire. Le culot de trypanosomes, dès son obtention, est repris dans un tampon phosphate glucosé <sup>7</sup> de pH 5,5 ou de pH 7,0, enrichi ou non en antiprotéases <sup>5</sup>. Après 20 heures d'incubation sous agitation douce à 4°C, une centrifugation <sup>8</sup> permet d'obtenir les surnageants pH 5,5 ou pH 7,0 qui contiennent les éléments de surface des parasites. Ces surnageants sont conservés directement à -20°C ou après dialyse et lyophilisation.

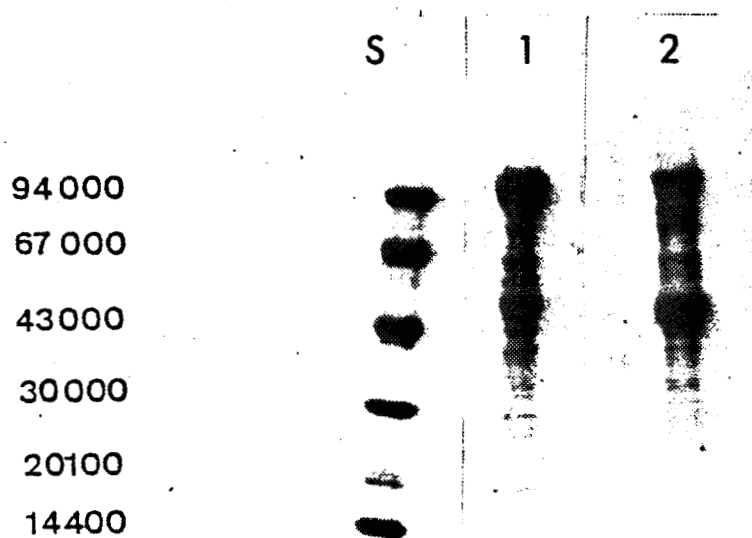
### a. Surnageants pH 5,5 et pH 7,0

Les préparations des surnageants pH 5,5 et pH 7,0 ont fait l'objet d'une étude électrophorétique en gel de polyacrylamide SDS <sup>9</sup>. Le diagramme protéique démontre la grande hétérogénéité du matériel de surface parasitaire. Sa définition apparaît toutefois différente selon la valeur de pH retenue pour le traitement parasitaire initial (Fig. 22).

Dans les deux protocoles, pH 5,5 et pH 7,0, l'étude électrophorétique caractérise des éléments de masse moléculaire allant de 14 à 120 Kd, avec cependant deux bandes dominantes, intensément révélées par le bleu Coomassie et se situant à des valeurs de 60 et 120 Kd. L'influence de la valeur du pH de libération du manteau se situe au niveau de ces deux zones : à pH 5,5, la majorité du matériel se trouve dans la région 120 Kd alors qu'à pH 7,0, c'est la région 60 Kd qui est la plus dense. Nous analyserons dans ce chapitre l'identité de ces fractions et le pourquoi de ces différences. Un autre facteur très important que nous avons fait varier est l'addition ou non avant incubation des parasites, d'antiprotéases. Le protocole sans antiprotéases aura pour traduction en gel, au niveau du surnageant pH 5,5 ou pH 7,0 une plus grande dispersion du matériel protéique dans les régions 60 Kd et surtout 120 Kd (Fig. 23). Comparativement aux surnageants préparés en présence d'antiprotéases, il apparaît en effet que les bandes multiples supplémentaires observées correspondent à des fragments de protéolyse des bandes majeures précédemment décrites.

Ainsi l'antigène variable, élément quantitatif majeur du manteau de surface doit-il être purifié à partir de surnageants pH 5,5 ou pH 7,0, préparés en

PROFIL ELECTROPHORETIQUE DES SURNAGEANTS DE LIBERATION  
DU MANTEAU DE SURFACE PREPARES EN PRESENCE D'ANTIPROTEASES



Coloration bleu Coomassie

échantillons déposés directement en présence de glycérol 10% (v/v)

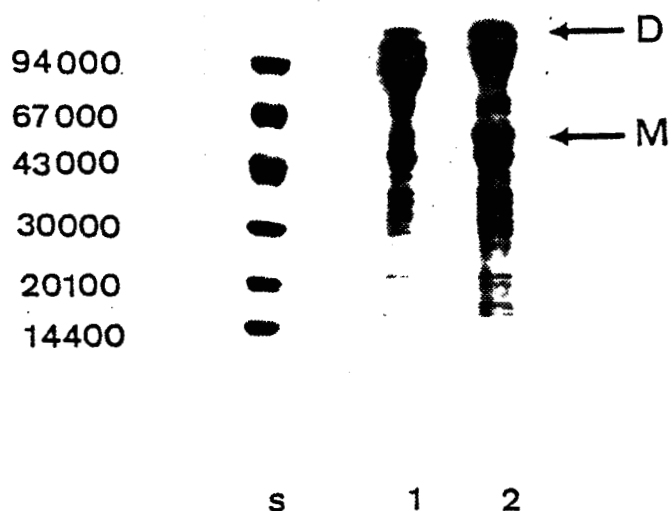
S : standard de poids moléculaire

1 : surnageant pH 5,5

2 : surnageant PH 7,0

Figure 22

PROFIL ELECTROPHORETIQUE DES SURNAGEANTS DE LIBERATION  
DU MANTEAU DE SURFACE PREPARES EN ABSENCE D'ANTIPROTEASES



Coloration bleu Coomassie

échantillons déposés directement en présence de glycerol 10% (v/v)

S: standard de poids moléculaire

1 : surnageant pH 5,5

2 : surnageant pH 7,0

flèches : position de l'AVS      à l'état dimérique : D  
à l'état monomérique : M

Figure 23

présence d'antiprotéases, protocole qui assure une intégrité moléculaire satisfaisante au regard de notre contrôle électrophorétique.

Différentes approches chromatographiques ont été testées en vue de la purification de l'AVS. Nous avons retenu la chromatographie d'affinité sur colonne de Concanavalline-A Sépharose en raison de la nature glycoprotéique de l'antigène de surface.

#### b. Purification sur Concanavalline-A Sépharose

##### Protocole chromatographique et analyse des fractions

Nous avons repris et adapté le protocole proposé par Baltz et coll. (1976), protocole fondé sur l'affinité de l'AVS pour une lectine, la Concanavalline-A (Con-A). Le surnageant pH 5,5 ou pH 7,0 est déposé sur une colonne de Con-A Sépharose équilibrée en tampon phosphate pH 8,0<sup>10</sup>. La fraction non retenue (F1 Con-A) est éluée par le passage du tampon d'équilibre. L'AVS sera obtenu par étapes d'élution à l'aide d'un tampon dont le pouvoir éluant est progressivement amplifié par l'addition de  $\alpha$  méthyl mannoside et d'agents dissociants. Trois fractions sont ainsi obtenues en gradient discontinu :

- la fraction  $F_2$  éluée par le tampon d'équilibre enrichi en  $\alpha$  méthyl mannoside 10% p:v (0,5M)

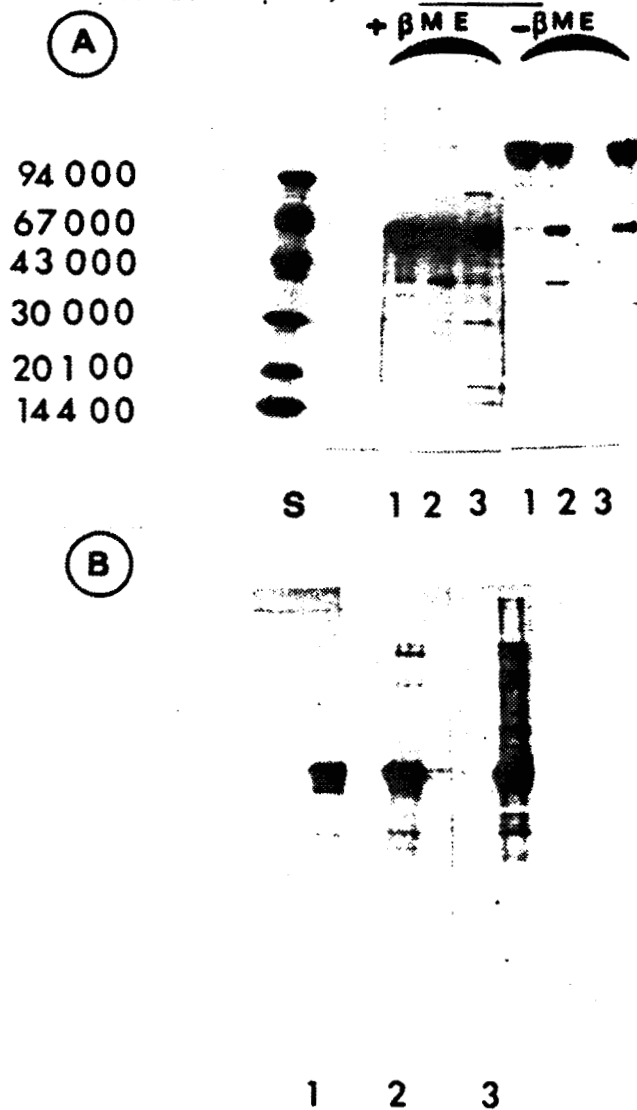
- la fraction  $F_3$  éluée par le tampon précédent enrichi en  $\beta$  mercaptoéthanol 1% v:v (143,3 mM)

- la fraction  $F_4$  éluée par le tampon  $\alpha$  méthyl mannoside,  $\beta$  mercaptoéthanol, enrichi en SDS 0,1% p:v (3,46 mM).

Les fractions  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$  et  $F_4$  sont soumises à une dialyse contre de l'eau désionisée, et lyophilisées.

Au regard des protocoles initialement décrits qui s'arrêtent à l'élution par l' $\alpha$  méthyl mannoside, le rendement est ici considérablement augmenté. A partir de chromatographies de surnageants parasitaires obtenus à pH 5,5 en présence d'antiprotéases, nous avons calculé les pourcentages relatifs de matériel dans les trois fractions  $F_2$ ,  $F_3$  et  $F_4$  qui respectivement correspondent à 31%, 26% et 43% de la quantité totale d'antigène variable obtenu. Ainsi, le rendement est-il augmenté d'un facteur 3 avec la mise en évidence de fractions d'AVS très affines pour la Concanavalline. Sur le plan qualitatif les trois fractions ont un comportement électrophorétique en gel de polyacrylamide SDS comparable, après révélation par le bleu Coomassie (Fig. 24A) ou par immunotransfert<sup>9</sup> en révélation à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre la fraction  $F_2$

PROFILS ELECTROPHORETIQUES DES FRACTIONS ANTIGENIQUES  
PURIFIEES PAR CHROMATOGRAPHIE DE CONCAVALINE-A SEPHAROSE  
(PARTANT D'UN SURNAGEANT pH 5,5 EN PRESENCE D'ANTIPROTEASES)



A coloration bleu Coomassie

B révélation par immunotransfert à l'aide d'un immunosérum dirigé contre la fraction  $F_2$

+  $\beta$ ME : tampon de reprise d'échantillons

-  $\beta$ ME : tampon de reprise d'échantillons

s : standard de poids moléculaire

1 : fraction  $F_2$

2 : fraction  $F_3$

3 : fraction  $F_4$

Figure 24

(Fig. 24B). Dans ces conditions, en effet,  $F_3$  et  $F_4$  sont révélées par l'immunsérum anti- $F_2$ . Au plan de la taille moléculaire, lorsque le gel de polyacrylamide est réalisé en milieu réducteur, pour les trois fractions  $F_2$ ,  $F_3$  et  $F_4$ , une bande de masse 60 Kd est observée. En absence d'agent réducteur, la fraction  $F_2$  correspond essentiellement à l'antigène de surface d'une masse moléculaire de 120 Kd avec présence d'une trace de matériel à 60 Kd. Pour  $F_3$  et  $F_4$  qui ont été élués en présence du réducteur, si la fraction 120 Kd est toujours dominante, la fraction 60 Kd est plus nettement caractérisée (Fig. 24A). La sensibilité aux réducteurs de l'antigène variable traduit la structure organisée de l'AVS constitué en dimère d'une entité de base de 60 Kd, par pont disulfure. Concernant le surnageant pH 7,0, le résultat est comparable en gel à celui obtenu avec le surnageant pH 5,5.

Au delà de l'analyse comparative par électrophorèse, a été menée une étude biochimique des trois fractions : composition en amino-acides, en sucres et en phosphore.

#### \* Composition en amino-acides

Les échantillons ont été hydrolysés et analysés sur autoanalyseur Beckman de Type 119 CL <sup>11</sup>. Les compositions amino-acides des fractions antigéniques purifiées sur Con-A sont présentées Tableau 4. Les résultats sont exprimés en nombre de résidus pour 100 résidus dosés et ne révèlent aucune différence significative dans la répartition des acides aminés majeurs : acide aspartique et/ou asparagine, thréonine, acide glutamique et/ou glutamine, alanine et lysine.

#### \* Composition en sucres

La composition en oses neutres et en osamines est déterminée, après méthanolyse, par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode de Kamerling (1975) modifiée par Montreuil et coll. (1986) <sup>12</sup>. Le tableau 5A montre que les trois fractions présentent qualitativement la même distribution glucidique : mannose, galactose, glucose et glucosamine. Qualitativement, la fraction  $F_4$  s'individualise par une augmentation des résidus mannose et une diminution relative de la teneur en galactose et en glucosamine.

#### \* Composition en phosphore

La composition en phosphore a été réalisée par une technique colorométrique (Itaya et Michio, 1966) sur des échantillons ayant subi une série de précipitations acides suivies d'une étape de chauffage du précipité en milieu

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES FORMES SOLUBLES (F2, F3 ET F4 de Con-A

SEPHAROSE) DE L'ANTIGENE VARIABLE

|         | F2   | F3   | F4   |
|---------|------|------|------|
| ASX     | 10,5 | 10,6 | 11,1 |
| THR     | 8,9  | 9,0  | 8,7  |
| SER     | 6,3  | 6,9  | 6,4  |
| GLU     | 12,5 | 12,4 | 12,0 |
| PRO     | 3,6  | 3,7  | 3,8  |
| GLY     | 8,1  | 8,4  | 8,1  |
| ALA     | 15,4 | 14,7 | 14,4 |
| VAL     | 2,7  | 2,8  | 3,2  |
| 1/2 CYS | 2,4  | 1,9  | 1,7  |
| MET     | 0,6  | 0,7  | 0,9  |
| ILE     | 3,4  | 3,4  | 3,8  |
| LEU     | 8,5  | 8,4  | 8,8  |
| TYR     | 2,3  | 2,2  | 2,3  |
| PHE     | 1,5  | 1,5  | 1,9  |
| LYS     | 9,3  | 9,3  | 8,5  |
| HIS     | 1,9  | 1,9  | 1,9  |
| TRP     | ND   | ND   | ND   |
| ARG     | 2,2  | 2,2  | 2,5  |

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

ND = non dosé

Tableau 4



COMPOSITION GLUCIDIQUE ET TENEUR EN PHOSPHORE DES FORMES SOLUBLES  
(FRACTIONS F2, F3 ET F4 de Con-A Sepharose) DE L'ANTIGENE VARIABLE

| A             | F2   | F3   | F4   |
|---------------|------|------|------|
| Mannose       | 10,3 | 10,4 | 13,7 |
| Galactose     | 3,8  | 4,3  | 2,9  |
| Glucose       | 0,7  | 0,9  | 1,3  |
| Glucosamine * | 7,8  | 5,8  | 4,8  |

Résultats exprimés en nombre de résidus par mole de glycoprotéine.

\* dosage réalisé après hydrolyse HCl 5,6 N ; 24 h à 100°C sur autoanalyseur d'acides aminés.

| B                                                                                               | F2  | F3  | F4  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| Prétraitement de l'échantillon                                                                  |     |     |     |
| Précipitation par l'acide trichloroacétique et chauffage du précipité à 80°C pendant 20 minutes | 1,2 | 1,2 | 1,1 |
| Précipitation par l'acide trichloroacétique                                                     | 2,0 | 1,8 | 2,0 |

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

Tableau 5

acide <sup>13</sup> (Baltz et coll. 1982). Les résultats, présentés sur le tableau 5B sont comparables pour les trois fractions : un ou deux résidus de phosphore sont dosés en fonction des conditions opératoires retenues. L'étape de chauffage en milieu acide semble déterminante. En effet, un résidu est dosé après chauffage en milieu acide alors que l'on en dose deux en l'absence de cette étape, ce qui indiquerait une fragilité différente des liaisons phosphates dans la molécule.

Dans le cas où le même protocole Concanavaline-A Sépharose est appliqué à des surnageants pH 5,5 ou pH 7,0 obtenus sans addition d'antiprotéases, les fractions éluées correspondent à des fragments de protéolyse de l'AVS encore affines pour la lectine, ceci confirmant les observations initiales faites sur gel avec les surnageants non purifiés (Fig. 25).

La fraction exclue, F<sub>1</sub> Con-A, représente 40% en moyenne du matériel de départ "surnageant pH 5,5" (p/p). Cette fraction est très hétérogène et comprend en gel de polyacrylamide plusieurs dizaines de protéines de poids moléculaire très variable allant de 14 Kd à plus de 100 Kd (Fig. 26).

#### Sous-fractionnement des fractions F<sub>1</sub> et F<sub>2</sub> Con-A

Dans notre travail qui a eu pour but de mettre en évidence d'éventuelles propriétés biologiques aux constituants de surface du trypanosome, nous avons principalement utilisé les fractions de Concanavaline A Sépharose F<sub>1</sub> et F<sub>2</sub>. Toutefois, ces études ont nécessité le plus souvent de nouvelles étapes de purification.

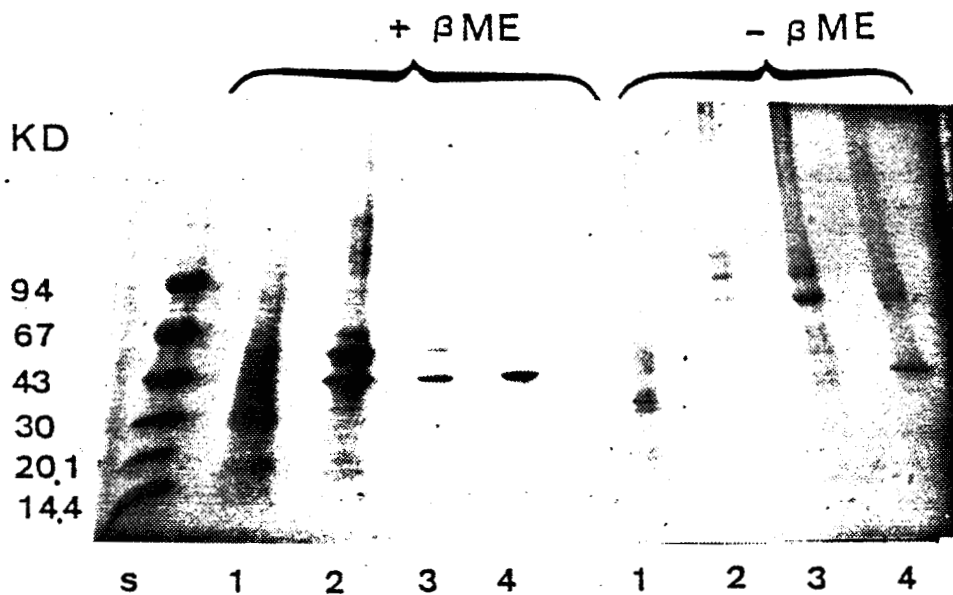
##### - Fraction F<sub>1</sub> Con-A Sépharose

Deux sous-fractionnement ont été réalisés en vue de l'utilisation de cette fraction pour la définition des propriétés biologiques :

- la chromatographie sur colonne de biogel P60
- la chromatographie sur colonne d'α méthyl mannoside agarose.

La fraction F<sub>1</sub>, polydispersée en électrophorèse correspondant à un mélange d'éléments protéiques, a fait l'objet d'un sous-fractionnement par chromatographie d'exclusion sur colonne de biogel P60 équilibrée en tampon acide acétique 0,1 M <sup>14</sup>. En réalité, la reprise du matériel lyophilisé F<sub>1</sub> Con-A n'est pas totale. L'insoluble correspond à une proportion non sélective du matériel, excepté pour les masses moléculaires supérieures à 70 Kd qui sont retrouvées en totalité dans l'insoluble (Fig. 26). Quant au profil

PROFIL ELECTROPHORETIQUE DES FRACTIONS ANTIGENIQUES  
PURIFIEES PAR CHROMATOGRAPHIE DE CONCAVALINE-A SEPHAROSE  
(PARTANT D'UN SURNAGEANT pH 5,5 PREPARE EN ABSENCE D'ANTIPROTEASES)



Coloration bleu Coomassie

+βME : tampon de reprise d'échantillons

-βME : tampon de reprise d'échantillons

S : standard de poids moléculaires

1 : fraction  $F_1$

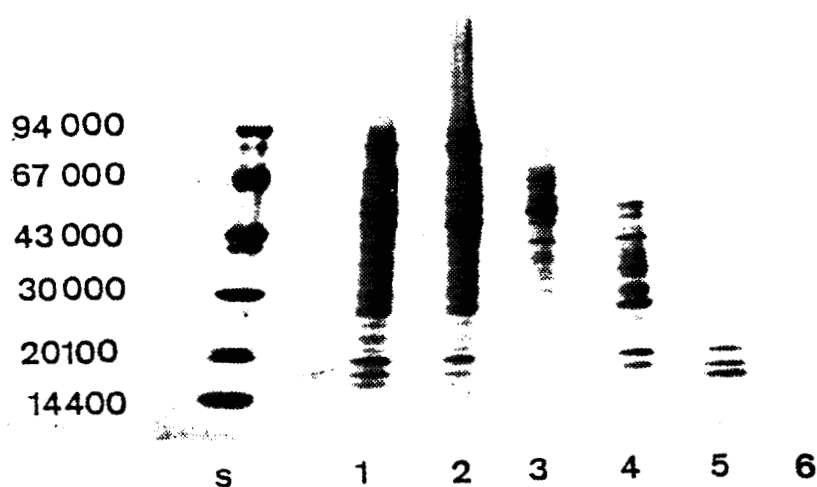
2 : fraction  $F_2$

3 : fraction  $F_3$

4 : fractions  $F_4$

Figure 25

PROFIL ELECTROPHORETIQUE DES SOUS-FRACTIONS DE BIOGEL P60  
DE LA F<sub>1</sub> DE CONCAVALINE-A SEPHAROSE  
(F<sub>1</sub> DE Con-A PARTANT D'UN SURNAGEANT pH 5,5 PREPARE EN PRESENCE D'ANTIPROTEASES)



Coloration bleu Coomassie

-  $\beta$ ME : tampon de reprise d'échantillons

S : standard de poids moléculaire

1 : F1 de Con-A

2 : partie insoluble

3 : F1 a de P60

4 : F1 b de P60

5 : F1 c de P60

6 : F1 d de P60

Figure 26

chromatographique (Fig. 27), il comprend une fraction exclue ( $F_1a$ ), une trainée découpée arbitrairement en deux fractions ( $F_1b$ ,  $F_1c$ ) suivies d'un pic terminal ( $F_1d$ ). L'analyse en gel de polyacrylamide-SDS permet de définir les plages de taille moléculaire correspondant aux fractions :  $F_1a$  (30 à 70 Kd) ;  $F_1b$  (18 à 50 Kd) ;  $F_1c$  (14 à 30 Kd) (Fig. 26). La fraction  $F_1d$  n'étant pas révélée par le bleu de Coomassie ou étant quantitativement insuffisante. L'insolubilité partielle de la fraction  $F_1$  Con-A avant chromatographie, l'insolubilité également après chromatographie des sous-fractions, génèrent l'utilisation biologique du matériel, bien que le choix du biogel eût été correct en fonction du but recherché, à savoir une sélection par taille moléculaire des principales fractions. L'insolubilité pourrait être la dénaturation introduite par l'utilisation de l'acide acétique 0,1 M choisi pour obtenir un minimum d'interaction gel-fraction.

De même en vue de l'utilisation de la fraction  $F_1$  Con-A-Sépharose dans des protocoles à visée immunologique, la présence de traces de Concanavaleine A contaminante peut gêner considérablement l'interprétation des résultats. Aussi nous avons repurifié la fraction  $F_1$  Con-A sur un gel d' $\alpha$ - méthyl mannoside agarose <sup>15</sup>, gel dont la propriété est de retenir la Con-A avec une capacité de 10 à 15 mg de lectine par millilitre de gel. La fraction exclue ( $F_1'$  Con-A), analysée en gel de polyacrylamide SDS présente un profil identique à celui du produit de départ  $F_1$  Con-A, ce qui atteste de la faible contamination du matériel initial par la lectine.

#### - Fraction $F_2$ Con-A Sépharose

La fraction  $F_2$  Con-A Sépharose correspond à l'antigène variable de surface du trypanosome. Cette préparation a été soumise à :

- un sous fractionnement sur colonne HPLC G4000.

Dans le but d'obtenir sélectivement la forme dimérique de l'AVS, forme majoritaire dans  $F_2$  Con-A, nous avons fait appel à la chromatographie de gel perméation en HPLC G4000 <sup>16</sup>. Cette colonne très sélective, est équilibrée en tampon phosphate 0,1 M pH 7,0 additionné de SDS 0,1 % (p/v). Le profil chromatographique (Fig. 28) laisse apparaître plusieurs pics dont les temps de rétention rapportés à un témoin de masses moléculaires, correspondent pour le pic majeur à la forme dimérique de l'AVS, et pour les autres à plusieurs polymères de taille compatible avec la notion de tetramère, d'octamère et d'homologues supérieurs. Le pic majeur, dimérique, a été conservé après dialyse et lyophilisation.

- un passage sur colonne d' $\alpha$  méthyl mannoside agarose pour éliminer toute

PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DU  
FRACTIONNEMENT SUR BIOGEL P60 DE LA FRACTION  $F_1$  DE  
CONCAVALINE-A SEPHAROSE

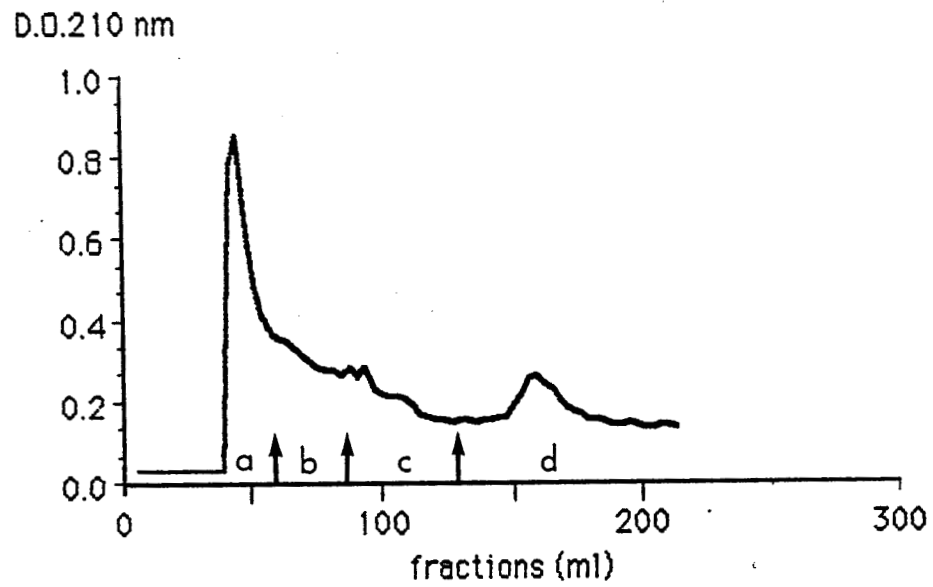
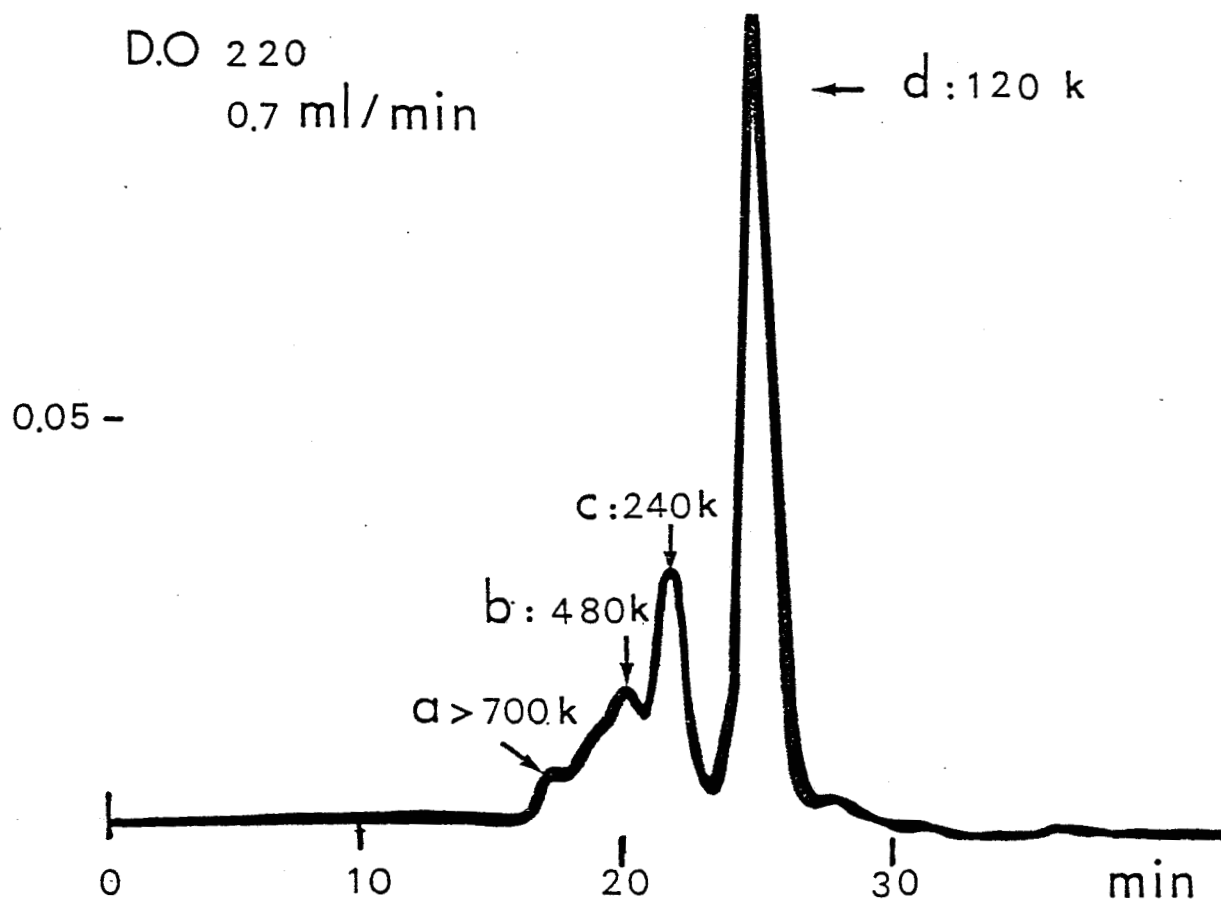


Figure 27

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE DE GEL  
PERMEATION DE LA FRACTION  $F_2$  DE CONCAVALINE-A SEPHAROSE.  
(PARTANT D'UN SURNAGEANT pH 5,5 PREPARE EN PRESENCE D'ANTIPROTEASES)



Colonne Beckman TSK SW G4000

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

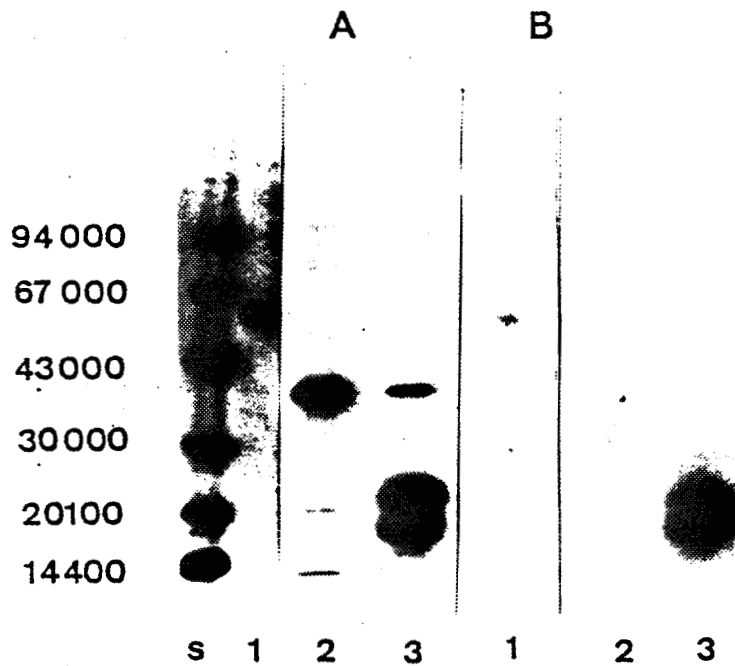
Figure 28

trace de Con-A éventuellement contaminante ;

Un autre impératif, la mise en évidence d'activités biologiques pour l'antigène variable, au niveau de l'hôte et donc sa responsabilité dans le dialogue hôte-parasite a provoqué la nécessité de localiser dans la molécule d'antigène variable la "zone", le "domaine" moléculaire responsable. Ainsi, nous avons été amenés à tenter la séparation de fragments glycosylés et non glycosylés de l'AVS, la séparation du domaine N-terminal ou C-terminal. Cette préparation des domaines a été réalisée en utilisant un protocole développé au laboratoire par Gomès et coll. (1986), qui fait appel à une hydrolyse trypsique <sup>17</sup> de l'AVS, qui clive la molécule au niveau d'une "zone charnière" libérant alors les extrémités N- et C- terminales. Les deux fragments correspondant à ces domaines sont ensuite séparés à partir de l'hydrolysate par chromatographie d'exclusion sur colonne de biogel P-30 équilibrée en tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M. Les fractions analysées en gel de polyacrylamide et colorées par le bleu Coomassie (Fig. 29.A) et par le PAS <sup>9</sup> (Fig. 29.B) correspondent au segment 2/3 N-terminal non glycosylé de l'AVS pour la fraction exclue (F<sub>1</sub>), et au 1/3 C-terminal glycosylé pour la fraction retardée (F<sub>2</sub>). Ces résultats ont été confirmés, par les études de composition amino-acides et glucidiques des fragments, comparés à l'AVS natif (Tableau 6) et à la séquence cDNA de l'AVS AnTat 1.1 déterminée par Pays et coll. (1983) (Fig. 30). La composition des deux fractions montre une plus grande richesse relative en cystéine, lysine, asparagine ou/et acide aspartique et thréonine, pour la fraction F<sub>2</sub> P30. Ces acides aminés sont en effet plus représentés dans la région C-terminale (Fig. 30). La composition glucidique a révélé l'absence de sucres dans la fraction F<sub>1</sub> P30 et une composition pour la F<sub>2</sub> P30 comparable à l'AVS native, confirmant que cette région est la seule glycosylée. Le 1/3 C-terminal contient donc les glycanes de type N (Johnson et Cross, 1977) ainsi que la structure phosphoglycanique C-terminale déterminée par Ferguson et coll. en 1988, substituant l'acide aminé C-terminal de l'AVS. Pour confirmer, et compléter cet analytique, nous avons fait appel à la RMN du phosphore <sup>18</sup>. Le spectre RMN du 1/3 Ct est caractérisé par deux pics de résonance à 0,52 et 15,73 ppm par rapport au standard interne d'acide phosphorique (Fig. 31). Le premier pic à 0,52 ppm se trouve dans la région des phosphodiesters (Brauer et coll. 1984) et correspond au phosphore de la liaison ethanolamine phosphate-mannose décrite par Ferguson et coll. (1985a). Le second pic à 15,73 ppm se trouve dans une région où résonnent les phosphores impliqués dans les liaisons phosphonates (Clonek et coll. 1970), et les phosphates cycliques (Cerdan et coll. 1986). Ce pic correspond à l'inositol phosphate cyclique résultat du clivage enzymatique



PROFILS ELECTROPHORETIQUES DES SOUS-FRACTIONS DE BIOGEL P30 DE LA  $F_2$  DE  
CONCAVALINE-A SEPHAROSE APRES HYDROLYSE TRYPSIQUE (PARTANT D'UN  
SURNAGEANT pH 5,5 PREPARE EN PRESENCE D'ANTIPROTEASES).



A - Coloration bleu Coomassie

B - Coloration P.A.S.

+ $\beta$ ME : tampon de reprise d'échantillons

S : standard de poids moléculaire

1 :  $F_2$  de ConA

2 :  $F_1$  de P30

3 :  $F_2$  de P30

Figure 29

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

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

\* Site potentiel de glycosylation

↓ Sites de clivage mineur par la trypsine

Séquence amino acide de l'antigène variable AnTat 1.1 de T.b.brucei  
(d'après les résultats de séquence DNA réalisé par PAYS et coll. (1983))

Figure 30

TABLEAU COMPARATIF DES COMPOSITIONS AMINO-ACIDES ET OSIDIQUES  
DE L'ANTIGENE VARIABLE DE SURFACE (F<sub>2</sub> DE Con-A)  
NATIF ET DE SES FRACTIONS TRYPSIQUES.

|              | Antigène | Fractions trypsiques           |                                |
|--------------|----------|--------------------------------|--------------------------------|
|              | natif    | F <sub>1</sub> P <sub>30</sub> | F <sub>2</sub> P <sub>30</sub> |
| amino-acides |          |                                |                                |
| ASX          | 11.18    | 9.87                           | 13.75                          |
| THR          | 8.52     | 8.51                           | 11.39                          |
| SER          | 5.42     | 5.36                           | 6.97                           |
| GLX          | 13.40    | 13.31                          | 12.91                          |
| PRO          | 3.63     | 3.66                           | 3.03                           |
| GLY          | 7.33     | 8.23                           | 6.42                           |
| ALA          | 14.00    | 16.64                          | 11.01                          |
| VAL          | 4.57     | 2.62                           | 2.00                           |
| CYS/2        | 1.93     | 0.71                           | 6.05                           |
| MET          | 0.34     | 0.26                           | 0.42                           |
| ILE          | 3.52     | 4.07                           | 2.07                           |
| LEU          | 8.39     | 10.78                          | 3.58                           |
| TYR          | 2.33     | 2.13                           | 1.75                           |
| PHE          | 1.56     | 1.27                           | 1.48                           |
| LYS          | 9.71     | 8.34                           | 13.63                          |
| HIS          | 1.88     | 2.00                           | 1.55                           |
| ARG          | 2.30     | 2.13                           | 0.73                           |

Résultats exprimés en résidus pour 100 résidus.

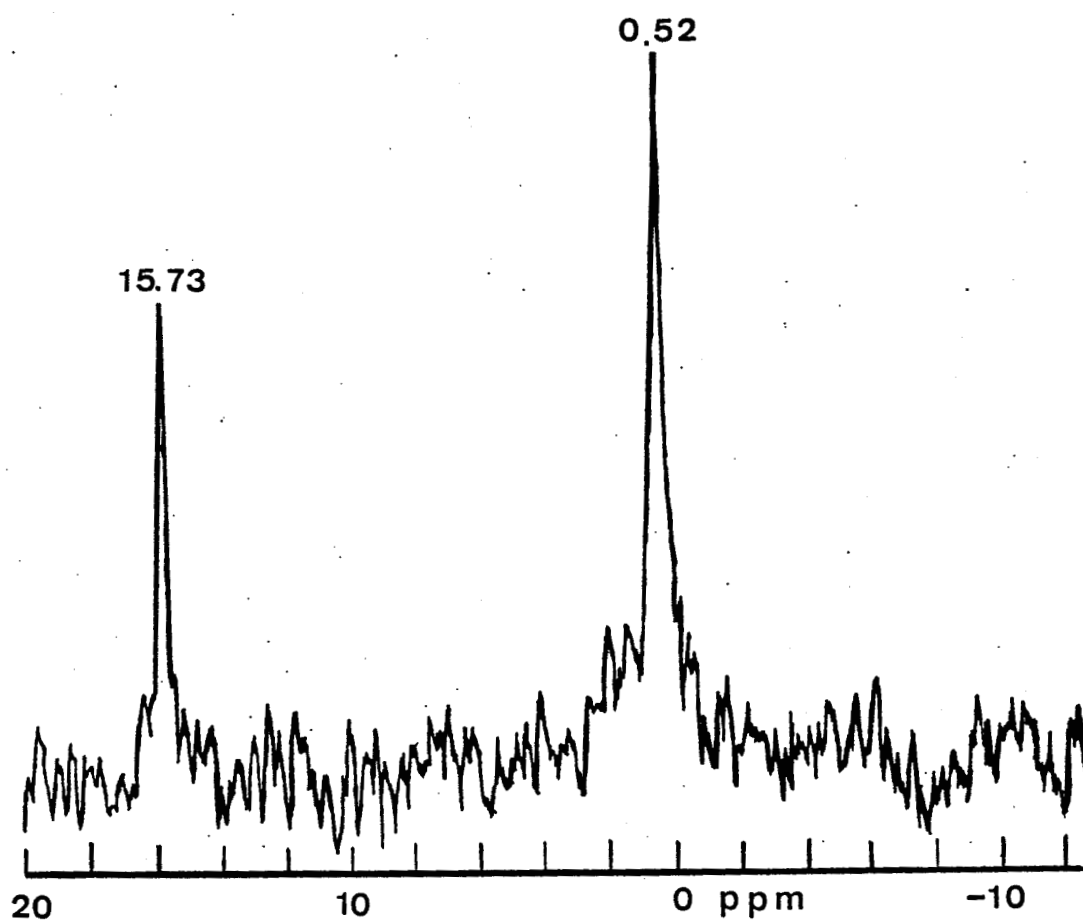
oses/osamines

|                    |      |      |
|--------------------|------|------|
| MAN                | 10.3 | 11.3 |
| GAL                | 3.8  | 6.0  |
| GLC                | 0.7  | 1    |
| GLCNH <sub>2</sub> | 7.8  | 6.3  |

Résultats exprimés en nombre de résidus par mole de glycoprotéine

Tableau 6

SPECTRE RMN  $^{31}\text{P}$  DECOUPLE DE LA FRACTION  
TRYPSIQUE  $\text{F}_2\text{P}_{30}$  DE L'AVS



- balayage de champ 10000 scans
- glissements chimiques en partie par million (ppm) déterminés par rapport au standard externe (acide orthophosphorique 85%)

Figure 31

du phosphatidyl inositol (Dawson et coll. 1971). Ces résultats sont totalement en accord avec la structure proposée par Ferguson et coll. (1985b, 1988) (Fig. 32) et ils ont été aussi vérifiés par les passages en RMN d'un témoin inositol phosphate cyclique qui a donné comme glissement chimique la valeur de 15,97 ppm.

Ainsi nous avons à notre disposition pour l'étude des propriétés biologiques de l'AVS :

- la molécule native à l'état dimérique débarrassée de toute trace de lectine contaminante ;

- des fragments caractéristiques de sa structure, à savoir son domaine N- et C-terminal. Le fragment C-terminal présente un axe peptidique riche en ponts disulfures contenant des substituants N-glycosidiques et un substituant C-terminal complexe, hétérogène, comprenant éthanamine, phosphore, sucres et glycerol, terminé dans la forme soluble de l'AVS par une structure inositol phosphate cyclique caractéristique. Si la forme soluble représente à priori la "forme circulante" de l'AVS spontanément libérée par le parasite dans le sang de l'hôte infesté, il n'est pas interdit non plus que lors de la lyse parasitaire, des formes "membranaires" représentatives de l'état natif de l'AVS soient aussi libérées. De ce fait la préparation d'AVS sous forme membranaire était-elle indispensable pour juger si possible de l'activité biologique de cet état moléculaire natif.

## 2. Préparation de l'antigène de surface "sous forme membranaire" (Clarke et coll. 1985)

La préparation d'AVS sous forme membranaire a été réalisée à partir de trypanosomes ayant incorporé en condition de survie de l'acide myristique radiomarké <sup>19</sup>. Après incorporation du marqueur pendant 30 minutes, les trypanosomes sont centrifugés et le culot remis en suspension dans de l'acide trifluoroacétique 0,1% glacé, puis centrifugé.

L'analyse en gel de polyacrylamide SDS du surnageant permet plusieurs observations (Fig. 33) : en bleu Coomassie, le surnageant se caractérise par une bande majeure de poids moléculaire inférieur à 120 Kd si on compare avec le comportement de l'AVS soluble (Fig. 33.A) ; en autoradiographie, on retrouve la bande majeure inférieure à 120 Kd qui sous l'effet d'agent réducteur se retrouve à une masse moléculaire inférieure à 60 Kd. Un immunotransfert sur ces bandes radioactives, réalisé avec un anticorps polyclonal dirigé contre l'AVS soluble confirme l'identité du matériel obtenu.

EXTREMITÉ GLYCANNIQUE C-TERMINALE  
DE L'ANTIGÈNE VARIABLE DE SURFACE  
MITat 1-4 SOUS FORME SOLUBLE  
(d'après FERGUSON ET COLL 1985b, 1988)

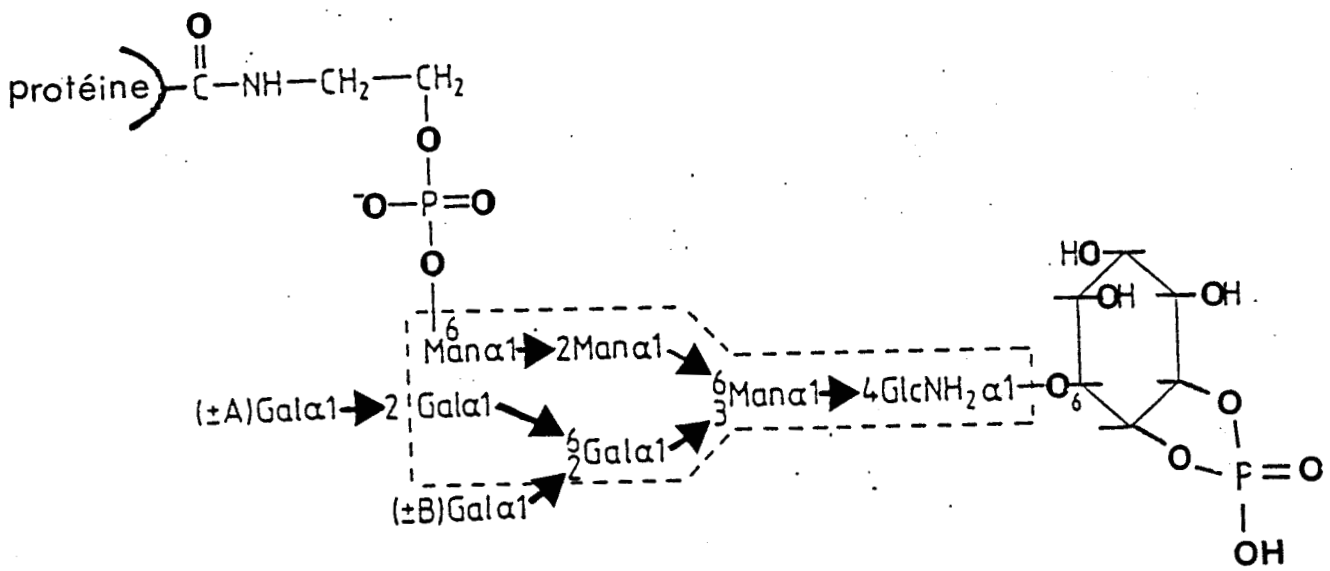
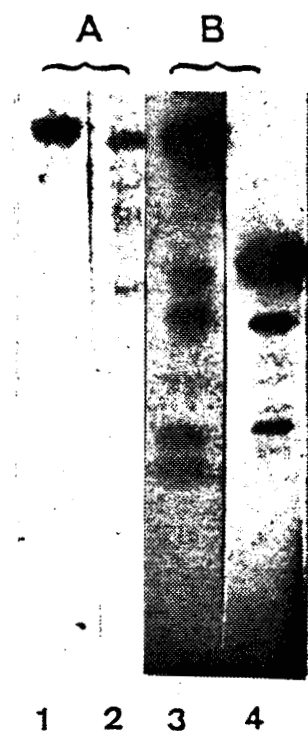


Figure 32

PROFIL ELECTROPHORETIQUE DE L'AVS SOUS FORME MEMBRANAIRE



A coloration bleu Coomassie

B autoradiographie

pour 1,2,3 : tampon de reprise d'échantillons - $\beta$ ME

4 : tampon de reprise d'échantillons + $\beta$ ME

1 : témoin AVS soluble

2, 3, 4 : AVS membranaire marqué à l'acide myristique  $^{14}\text{C}$

Figure 33

## Conclusion

Les étapes préparatives et les différents protocoles de purification ont permis de mettre à notre disposition un matériel répondant à des définitions précises de situation moléculaire :

- forme soluble, forme membranaire de l'AVS,
- forme native, forme dégradée de l'AVS par les enzymes de surface du trypanosome, (préparation en présence ou en absence d'antiprotéases)
- forme dimérisée, forme monomère de l'AVS
- fragments N-terminal non glycosylé, C-terminal glycosylé de l'AVS

Le niveau de dégradation de l'AVS étant lié à la libération depuis le manteau de surface du parasite d'enzymes, nous avons tenté de définir les activités enzymatiques principales contenues dans les surnageants pH 5,5 et pH 7,0 préparés sans addition d'antiprotéases.

## C. ACTIVITES ENZYMATIQUES

### 1. Activité AVS réductrice

Dès le début de ce travail, lorsque nous avons comparé différentes conditions de libération du manteau de surface du trypanosome, est apparue la notion de dégradation par enzymes des éléments constitutifs du manteau.

Deux hypothèses pouvaient être avancées selon que le protocole préparatif comportait ou non l'addition d'antiprotéases

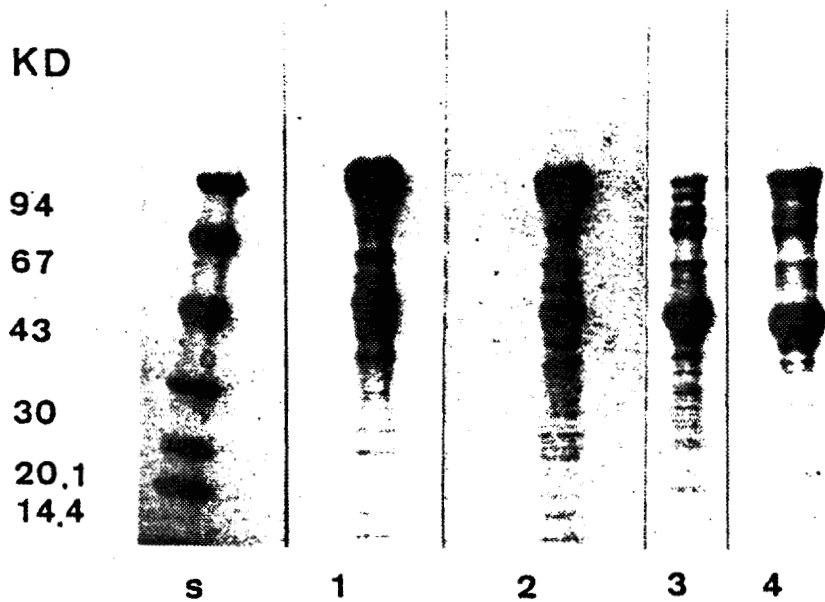
- celle de l'action d'enzymes protéolytiques très intense
- celle d'enzyme de "dédimérisation" de l'antigène variable.

Cette dernière hypothèse relevait essentiellement de la différence de comportement électrophorétique d'un surnageant pH 5,5 par rapport à un surnageant pH 7,0. Pour le premier, dominance de la fraction 120 Kd, pour le second, dominance de la fraction 60 Kd (Fig. 34).

Nous avons systématiquement recherché sur ce phénomène de passage dimère-monomère, l'influence de différents facteurs et tenté de caractériser une activité enzymatique responsable.



PROFIL ELECTROPHORETIQUE DES SURNAGEANTS DE  
LIBERATION DE pH 5,5 ET pH 7,0 EN PRESENCE OU EN ABSENCE DE NEM



Coloration bleu Coomassie

échantillons déposés directement en présence de glycérol 10 %

S : standard de poids moléculaire

1 : surnageant pH 5,5 sans NEM

2 : surnageant pH 5,5 avec NEM

3 : surnageant pH 7,0 sans NEM

4 : surnageant pH 7,0 avec NEM

Figure 34

a. Rôle des antiprotéases dans la définition des surnageants pH 5,5 et pH 7,0. Mise en évidence à pH 7,0 de libération de tubuline. Rapport dimère/monomère

Parmi les antiprotéases ajoutées au tampon de libération de l'AVS, figurent un inhibiteur de sérine protéase (PMSF), un inhibiteur de la trypsine et des endoprotéinase à lysine (TLCK) et un inhibiteur de cystéine protéases (NEM). Ce dernier, le N éthyl maleimide, inhibe par blocage du groupement thiol le site actif de l'enzyme. Nous avons donc comparé les matériels obtenus par libération à pH 5,5 ou 7,0 du manteau en présence ou non de NEM.

Pour le surnageant pH 5,5, le profil n'est pas influencé (Fig. 34). En revanche, à pH 7,0, la quantité relative de matériel "60 Kd" se trouve renforcée en absence de NEM (Fig. 34).

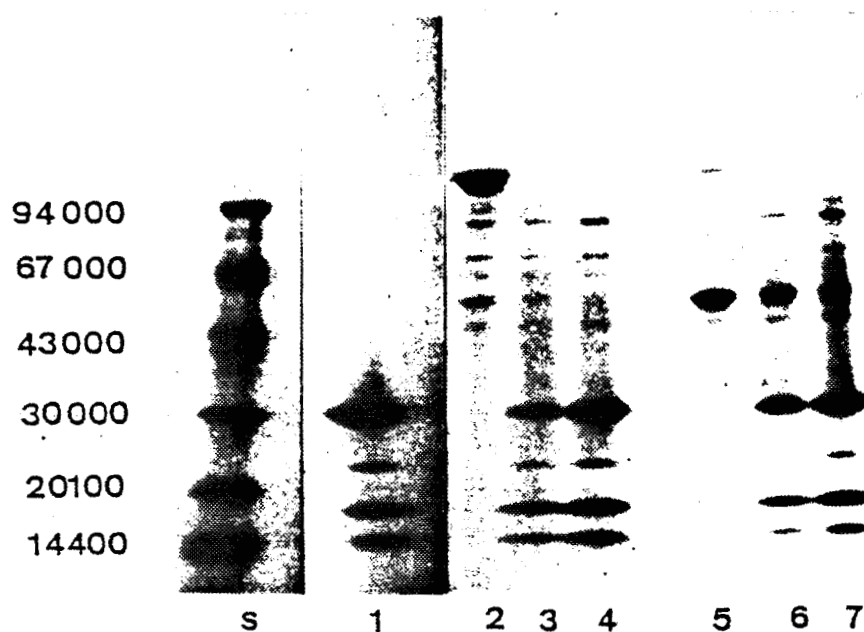
Se dégage de ces premières observations le fait que deux facteurs influençant d'éventuelles activités enzymatiques (pH, inhibiteur) peuvent aussi modifier la qualité du matériel obtenu par notre protocole de libération du manteau de surface parasitaire. Si les fractions 120 Kd correspondent à l'AVS, l'enzyme dont nous suspectons la présence, sensible au NEM, serait capable de réduire à l'état monomérique le dimère de l'antigène variable. Toutefois, la définition électrophorétique dans la zone 50/70 Kd dans les conditions expérimentales retenues est délicate d'interprétation et on ne peut éliminer au vu des électrophorèses la présence possible d'une autre entité moléculaire. Pour résoudre cette ambiguïté, des études complémentaires à la simple étude électrophorétique décrite ont été entreprises, elles ont consisté en

- la comparaison en électrophorèse avant et après traitement des fractions soumise à précipitation par la Concanavaline-A ;
- l'utilisation de l'immunotransfert avec révélation à l'aide d'anticorps anti AVS.

\* Précipitation par la Con-A

Nous avons étudié les profils électrophorétiques de surnageants pH 5,5 ou 7,0 après addition de concentrations élevées de Con-A (1 mg/ml) et contact de 1h30 à 4°C sous agitation. Les rapports lectine/surnageant étaient en volume de 1 et 0,6. Dans ces conditions, pour le surnageant pH 5,5, la totalité des bandes 120 Kd et 60 Kd disparaissent de l'électrophorégramme après révélation en bleu Coomassie. Pour le surnageant 7,0 au contraire, si la faible bande de 120 Kd disparaît, il persiste une bande dans la zone 60 Kd qui correspond donc à une entité différente de l'AVS (Fig. 35).

PROFIL ELECTROPHORETIQUE DES SURNAGEANTS pH 5,5 ET pH 7,0  
PRE-INCUBES AVEC LA CONCAVALINE-A 1mg/ml



Coloration bleu Coomassie

échantillons déposés directement en présence de glycérol 10 % (v/v)

S : standard de poids moléculaire

1 : témoin Con-A 20  $\mu$ l

2 : surnageant pH 5,5

3 : surnageant pH 5,5 + Con-A (1 : 0,6 v/v)

4 : surnageant pH 5,5 + Con-A (1 : 1 v/v)

5 : surnageant pH 7,0

6 : surnageant pH 7,0 + Con-A (1 : 0,6 v/v)

7 : surnageant pH 7,0 + Con-A (1 : 1 v/v)

Figure 35

#### \* Immunotransfert

De même, la comparaison d'immunotransferts réalisés avec un immunosérum dirigé contre l'AVS ( $F_2$  Con-A) sur les surnageants pH 5,5 et pH 7,0 confirme les résultats précédents, à savoir que le surnageant pH 7,0, et en particulier la bande 60 Kd est hétérogène, le rapport 120 Kd/60 Kd en bleu Coomassie étant très différent du même rapport après immunotransfert (Fig. 36).

Ainsi de ces deux approches expérimentales, se trouve confirmée pour le surnageant pH 7,0, l'hétérogénéité de la bande 60 kd où le bleu Coomassie révèle d'une part de l'antigène variable et, d'autre part, une protéine que nous avons cherché à identifier

- en inhibant la libération de l'antigène variable par le pCMPSA ;
- en sous-fractionnant sur Con-A Sépharose le produit obtenu.

#### \* Effet du pCMPSA

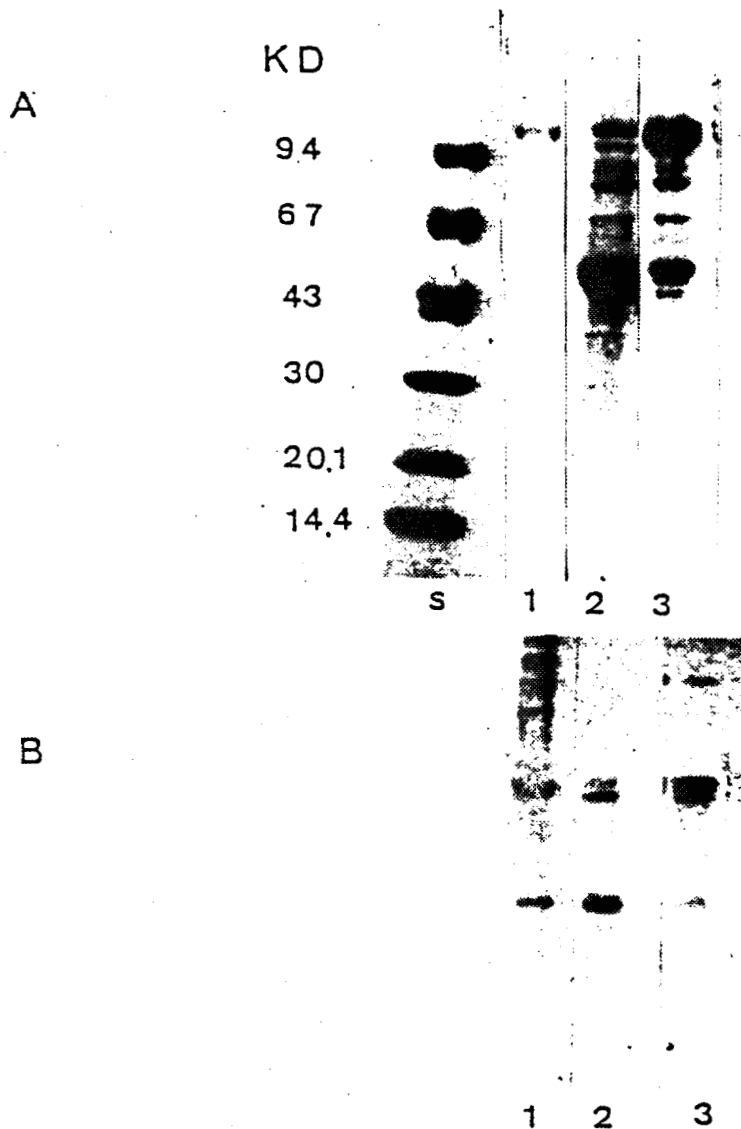
Le pCMPSA, inhibiteur de la libération spontanée de l'AVS, est ajouté à concentration 5 mM dans le tampon de libération du manteau de surface parasitaire. Que ce soit à pH 7,0 ou 5,5, le résultat se caractérise par un matériel majoritairement exprimé à 60 Kd (Fig. 37). Nous avons vérifié que ce matériel n'était pas affine pour la Con-A en réalisant une incubation avec de la Con-A comme précédemment décrit. Les rapports lectine/surnageant étaient en volume de 1, 0,6 et 0,3. La figure 38 du gel de polyacrylamide montre l'absence d'effet de la lectine sur le matériel 60 Kd.

#### \* Isolement du contaminant par chromatographie sur Concanavoline-A Sépharose

Le dépôt du surnageant pH 7,0 obtenu en présence de pCMSA sur colonne de Con-A Sépharose confirme l'absence de libération d'antigène par les trypanosomes et permet l'isolement et la caractérisation de la bande contaminante dans le tampon d'équilibre de la colonne.

Devant l'importance quantitative de ce matériel pH 7,0 58 Kd, notre attention s'est portée sur la tubuline. En effet, la membrane du trypanosome est recouverte sur sa face interne d'une couche de microtubules, dont la tubuline est l'élément essentiel. Partant de la fraction exclue de Con-A Sépharose, un immunotransfert avec un anticorps monoclonal antitubuline réalisé par l'équipe du Pr Schrevel (U.A. CNRS N° 290, laboratoire de biologie cellulaire, Université de Poitiers 96022 Poitiers cedex) a permis de confirmer notre hypothèse (Fig. 39). Il semble donc que la bande 60 Kd obtenue à pH 7,0 soit

DETERMINATION IMMUNOLOGIQUE DE LA  
PRESENCE D'AVS AnTat 1.1 DANS LES SURNAGEANTS  
DE LIBERATION pH 5,5 et pH 7,0  
APRES MIGRATION ELECTROPHORETIQUE



A - Coloration bleu Coomassie

B - révélation par immunotransfert à l'aide d'un immunosérum dirigé contre l'AVS purifié (F2 de Con-A)

1 : tampon de reprise d'échantillons -  $\beta$ ME

2,3 : échantillons déposés directement en présence de glycérol 10% (v/v)

S : standard de poids moléculaire

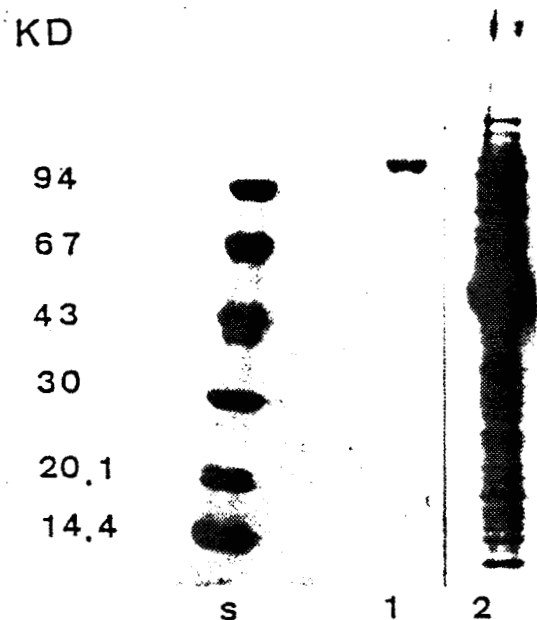
1 : témoin AVS

2 : surnageant pH 7,0

3 : surnageant pH 5,5

Figure 36

PROFIL ELECTROPHORETIQUE DU SURNAGEANT DE  
LIBERATION A pH 7,0 EN PRESENCE DE pCMPSA 5mM



coloration bleu Coomassie

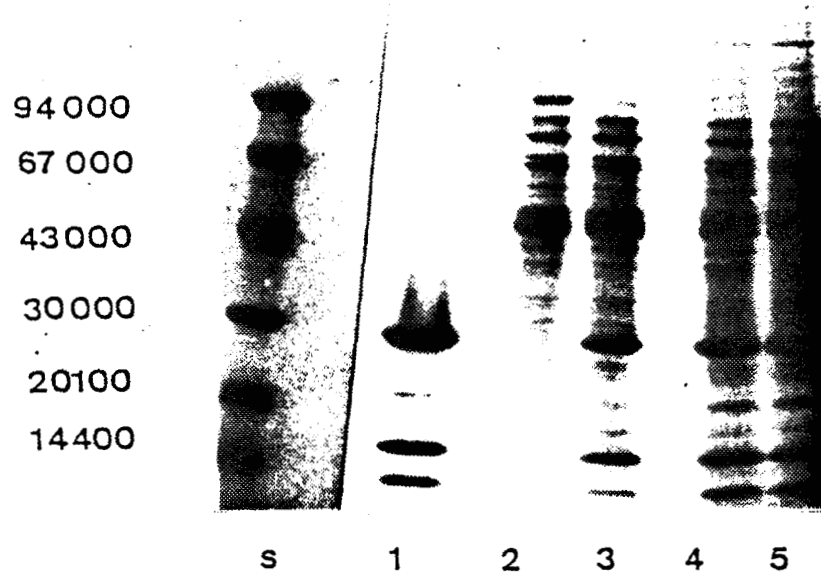
S : standard de poids moléculaire

1 : témoin AVS (F2 Con-A sépharose) repris dans le tampon - $\beta$ ME

2 : surnageant pH 7,0 pCMPSA 5 mM, déposé directement en présence de glycérol 10 %.

Figure 37

PROFIL ELECTROPHORETIQUE DU SURNAGEANT DE  
LIBERATION A pH 7,0 EN PRESENCE DE pCMPSA 5mM  
PRE-INCUBES AVEC LA CONCAVALINE A 1mg/ml



coloration bleu Coomassie

échantillons déposés directement en présence de glycérol 10 % (v/v)

S : standard de poids moléculaire

1 : témoin Con-A 20  $\mu$ l

2 : surnageant pH 7,0 pCMPSA 5 mM

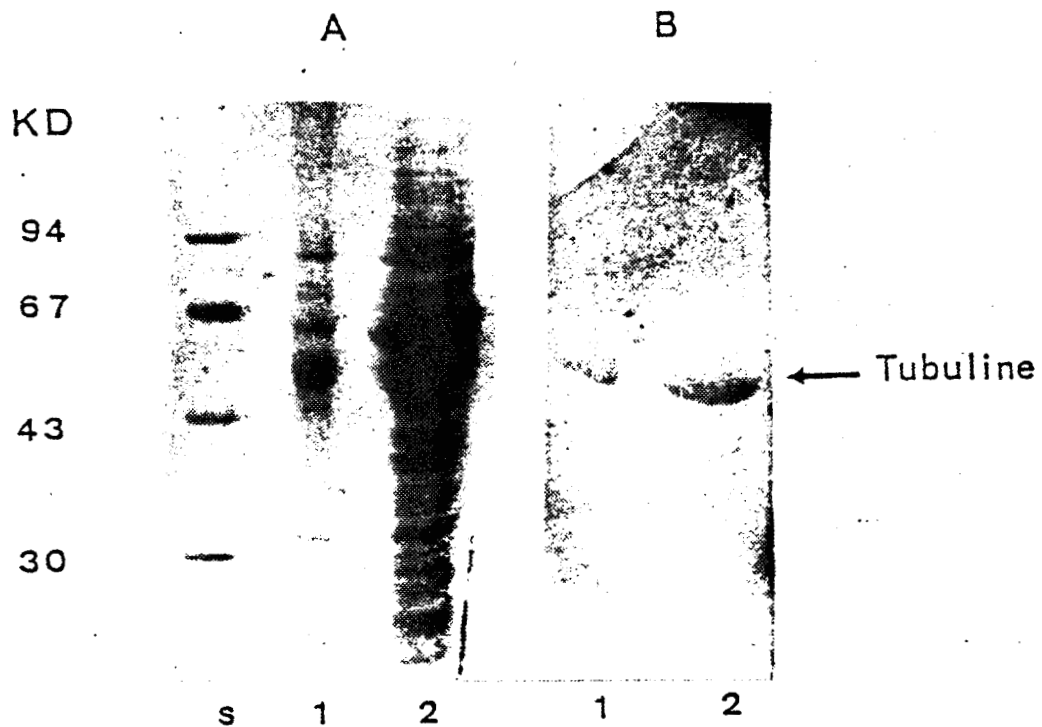
3 : surnageant pH 7,0 pCMPSA 5 mM, + Con-A (1 : 0,3 v/v)

4 : surnageant pH 7,0 pCMPSA 5 mM, + Con-A (1 : 0,6 v/v)

5 : surnageant pH 7,0 pCMPSA 5 mM, + Con-A (1 : 1 v/v)

Figure 38

REVELATION IMMUNOLOGIQUE PAR DES ANTICORPS  
ANTITUBULINE DE LA FRACTION EXCLUE SUR CONCAVALINE-A  
SEPHAROSE DU SURNAGEANT DE LIBERATION pH 7,0 EN PRESENCE DE pCMPSA 5 mM



A coloration bleu Coomassie

B révélation par immunotransfert à l'aide d'anticorps monoclonaux G-11 B-1 dirigés contre la forme acétylée de l' $\alpha$  tubuline

+  $\beta$ ME : tampon de reprise d'échantillons

S : standard de poids moléculaire

1 : fraction exclue de Concanavalline-A Sépharose

2 : lysat parasitaire par congélation décongélation

Figure 39



largement contaminée par de la tubuline. Il est confirmé aussi qu'à pH 5,5 la tubuline n'est pas perçue en bleu Coomassie sur l'électrophorégramme.

Au total, il apparaît : que, lorsque les trypanosomes sont traités en tampon phosphate glucosé à pH 7,0 sans addition de NEM, mais en présence d'antiprotéases telles que TLCK, PMSF, la quantité relative d'AVS monomère est plus importante que lorsque la libération du manteau a lieu à pH 5,5 ;

que l'état monomère d'AVS obtenu à pH 7,0 est instable puisque l'on peut montrer le retour progressif à une forme dimère. En effet, nous avons constaté qu'après chromatographie sur Concanavalline-A Sépharose du surnageant pH 7,0, l'AVS était obtenu majoritairement sous forme de dimère ;

qu'à pH 7,0 les mécanismes membranaires permettent en quantité importante la libération de tubuline.

#### b. Mise en évidence d'un système enzymatique de conversion dimère/monomère d'AVS

Parmi les approches expérimentales retenues, la première a consisté à faire varier le pH et la température d'incubation des surnageants de libération pH 5,5 et pH 7,0.

#### \* Influence du pH et de la température sur le rapport dimère/monomère dans les surnageants pH 5,5 et pH 7,0

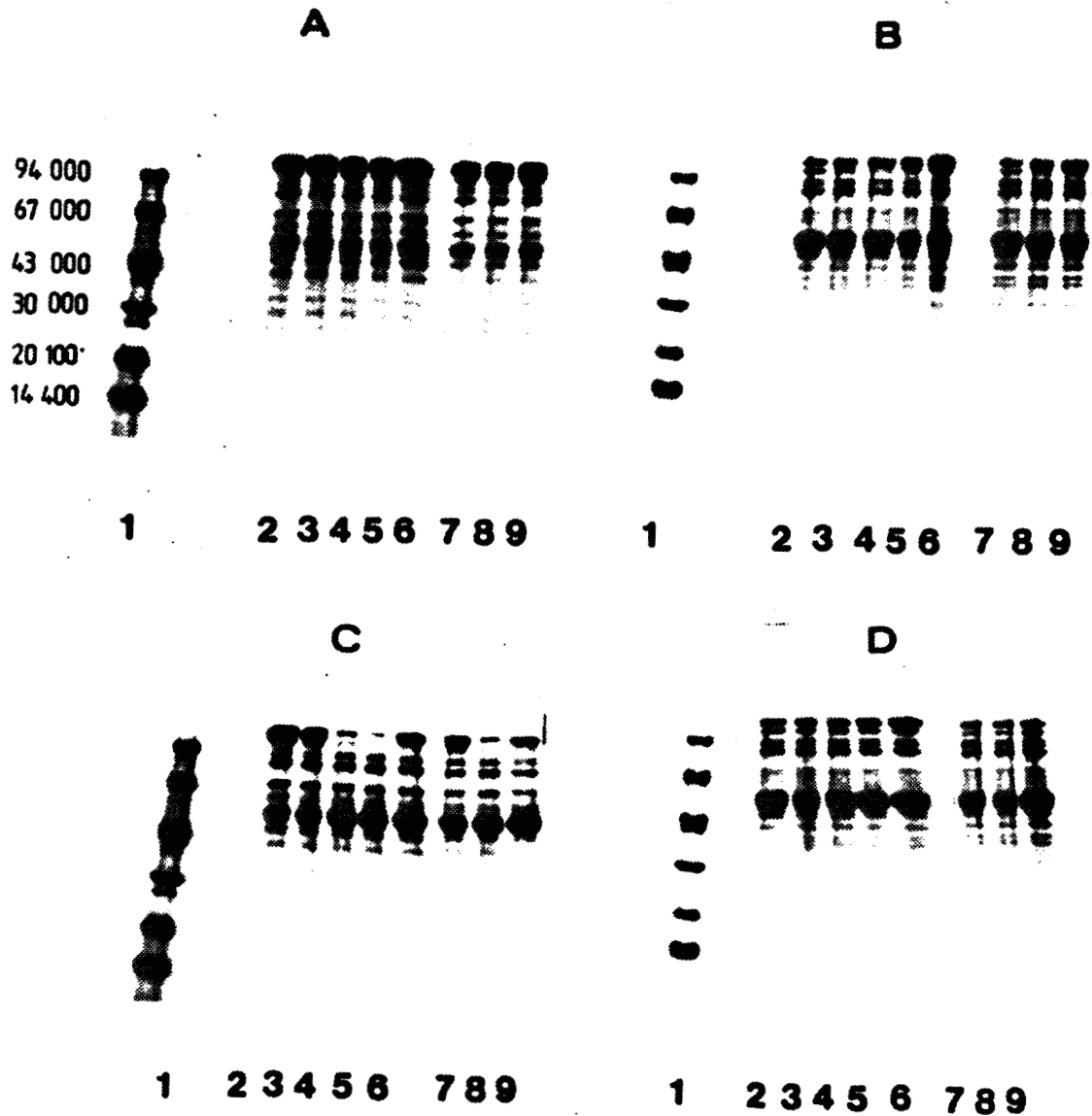
Des surnageants pH 5,5 ou pH 7,0 ont été modifiés quant à leur valeur de pH : les surnageants pH 5,5 sont portés à pH 7,0 à l'aide d'une solution de soude normale ; les surnageants pH 7,0 sont portés à pH 5,5 à l'aide d'une solution d'acide orthophosphorique 4% (v/v). Les deux surnageants initiaux sont mis en incubation ainsi que les surnageants à pH modifié, soit à 4°C, soit à température ambiante, soit à 37°C, 1 heure, 3 heures, 6 heures 30 et 24 heures, puis analysés en gel de polyacrylamide :

- surnageant pH 5,5 natif (Fig. 40.A). Le profil n'est pas modifié quelles que soient les conditions d'incubation.

- surnageant pH 7,0 natif (Fig. 40.B). Il apparaît une augmentation de la bande 120 Kd en fonction du temps d'incubation à température ambiante, et en fonction de la température pendant trois heures.

- surnageant pH 5,5 porté à pH 7,0 (Fig. 40.C). A température ambiante, les profils sont différents selon le temps : à 1 heure, les deux bandes 60 Kd et 120 Kd sont d'intensité égale ; à 3 heures et 6 heures 30, la bande 60 Kd est

PROFILS ELECTROPHORETIQUES DES SURNAGEANTS DE LIBERATION  
pH 5,5 ET pH 7,0 INCUBES A DES TEMPS, pH ET TEMPERATURES DIFFERENTS



A surnageant pH 5,5

B surnageant pH 7,0

C surnageant pH 5,5 modifié à pH 7,0

D surnageant pH 7,0 modifié à pH 5,5

échantillons déposés directement en présence de glycérol 10%

1 : standard de poids moléculaire

incubation des surnageants à température ambiante : t 0 (2), t 1H (3),  
t 3 H (4), t 6 H 30 (5), t 24 H (6).

incubation des surnageants durant trois heures : 4°C(7), 20°C (8), 37°C (9)

Figure 40

dominante ; à 24 heures, les deux bandes sont équivalentes. Après 3 heures d'incubation à 4°C, la bande 60 Kd est plus intense que la bande 120 Kd, à 37°C cette différence est accentuée pour être totale à température ambiante.

- surnageant pH 7,0 porté à 5,5 (Fig. 40.D). On ne note pas de différence significative des surnageants dans les conditions utilisées, excepté après 24 heures à température ambiante où il semble qu'il y ait aussi une évolution vers les formes dimères.

Ainsi, il apparaît dans le surnageant pH 5,5 un mécanisme de transformation de l'AVS dimère en AVS monomère, révélé et ne s'exprimant qu'après passage à pH 7,0 en incubation prolongée à température ambiante, et aboutissant à une transformation complète après trois heures d'incubation.

Au delà, à 24 heures d'incubation, du dimère en quantité non négligeable est à nouveau caractérisé et impose la notion de redimérisation spontanée de l'AVS. En effet, l'augmentation de la température provoque le rapprochement moléculaire (agitation thermique) et favorise l'association des monomères de l'AVS par rapprochement des thiols libres.

A partir de ces résultats, nous avons étudié plus précisément : les caractéristiques du système de conversion, des effecteurs et des substrats potentiels.

## 2. Température, pH optimum, mécanisme d'intervention enzymatique.

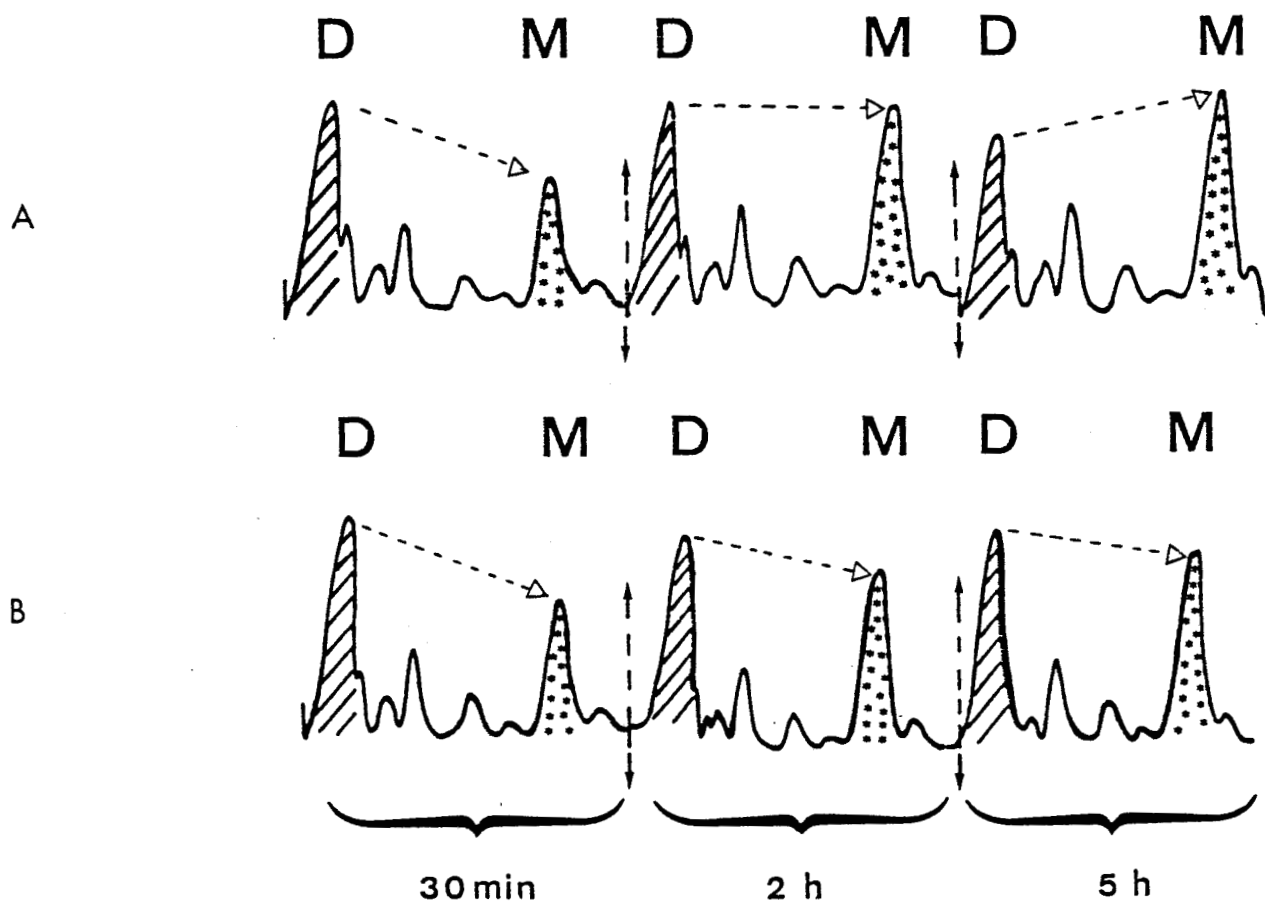
### \* température

L'existence de forme dimère après trois heures d'incubation à 37°C (Fig. 38.C) pouvant être attribuée à une transformation plus lente qu'à température ambiante ou au contraire beaucoup plus rapide, suivie d'une redimérisation, nous avons réalisé en parallèle une cinétique aux deux températures et nous avons observé par intégration du gel de polyacrylamide bleu Coomassie, que la conversion est plus rapide à 20°C (Fig. 41).

### \* pH

Pour déterminer la zone de pH optimum, nous avons suivi l'efficacité de la transformation durant 3 heures à pH 6,0, pH 6,5, pH 7,1, pH 7,6, pH 7,7, pH 8, pH 8,5 et pH 9,0. Le résultat de cette expérience se traduit par une zone de pH optimum large de 7 à 8 pour l'expression de la conversion (Fig. 42). La détermination du pourcentage relatif du matériel par calcul des surfaces obtenues après intégration du gel, permet de préciser ces résultats avec, à pH 8,0, le maximum de présence relative de monomère.

EFFET DE LA TEMPERATURE SUR  
L'EFFICACITE DE LA CONVERSION.  
INTEGRATION DES BANDES PROTEIQUES  
APRES MIGRATION ELECTROPHORETIQUE

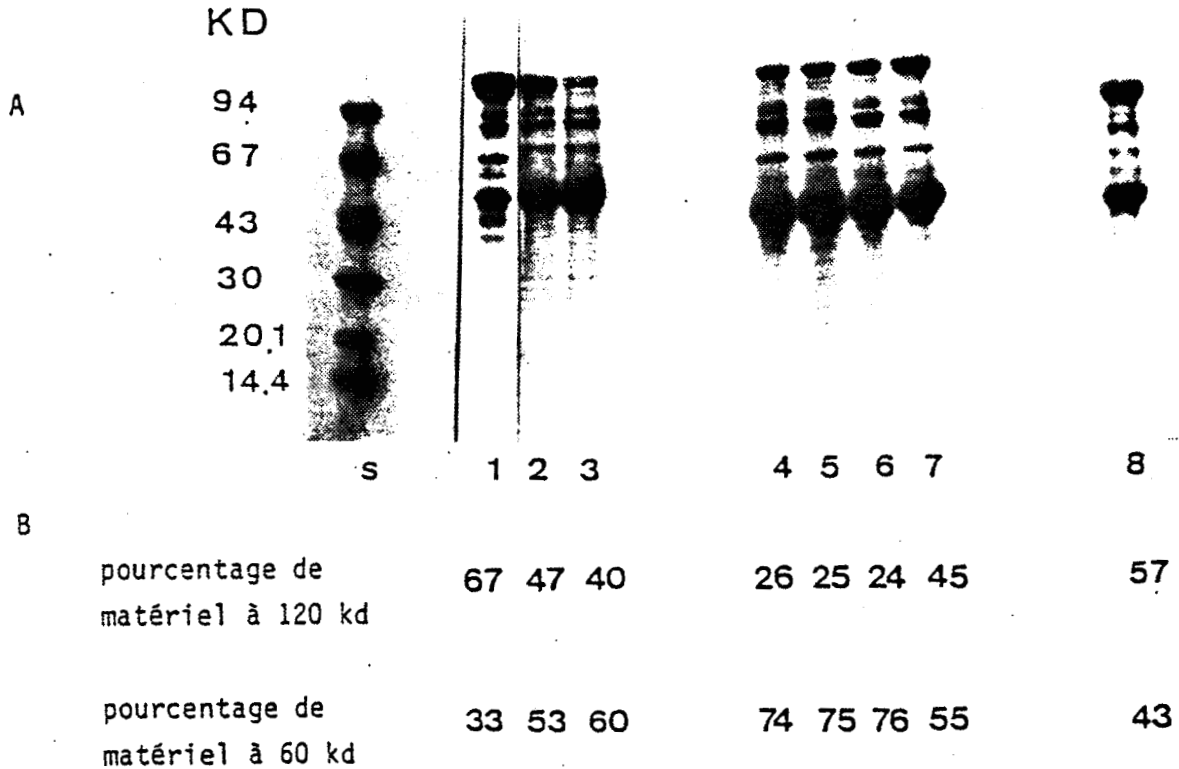


D : AVS dimère  
M : AVS monomère

Le surnageant pH 5,5 modifié à pH 7,0 est incubé à température ambiante (A) ou à 37°C (B) durant 30 minutes, 2 heures et 5 heures.

Figure 41

PROFILS ELECTROPHORETIQUES DU SURNAGEANT DE LIBERATION pH 5,5  
INCUBE 3 HEURES A TEMPERATURE AMBIANTE A DIFFERENTS pH



A coloration bleu Coomassie

B pourcentage de matériel 120 kd et 60 kd estimé par intégration des bandes

échantillons déposés directement en présence de glycérol 10% (v/v)

S : standard de poids moléculaire

1 : surnageant modifié à pH 6,0

2 : " " 6,5

3 : " " 7,1

4 : " " 7,6

5 : " " 7,7

6 : " " 8,0

7 : " " 8,5

8 : " " 9,0

Figure 42

#### \* mécanisme d'action

Compte tenu de la structure de l'AVS dimère, et partant de notre hypothèse à savoir une ouverture d'un pont disulfure interchaîne, nous avons effectué un marquage par l'acide iodoacétique radioactif <sup>20</sup> sur le surnageant pH 5,5 porté à pH 7,5, en début et en fin d'incubation. L'autoradiographie du gel (Fig. 43) montre une bande radioactive à 60 Kd beaucoup plus intense dans le surnageant modifié à pH 7,5 après quatre heures d'incubation à température ambiante. Ce résultat indique sans ambiguïté que le monomérisation de l'AVS s'accompagne de l'expression de thiols libres, par rupture de ponts disulfures essentiels à l'organisation dimérique de l'antigène variable.

#### 3. Identification d'effecteurs

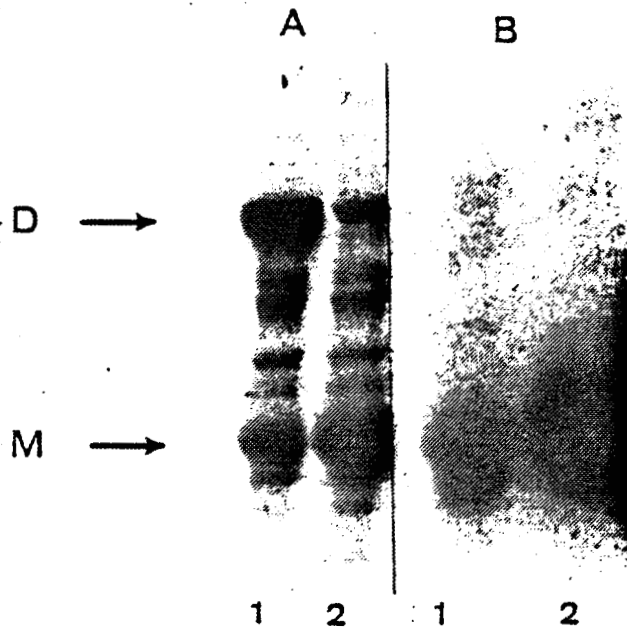
La mise en évidence de thiols dans le mécanisme d'action du système de conversion nous a amené à étudier la conversion de l'AVS en présence de composés affines pour les groupements thiols : NEM, Cd<sup>+</sup>, E-64 (L-trans Epoxy succinyl-leucyl amido(4-guanido) butane) à la concentration finale de 0,1 mM. L'analyse des résultats en gel montre que seul le E-64 n'inhibe pas la conversion (Fig. 44).

L'influence d'un cofacteur enzymatique, le glutathion sous forme réduite et oxydée, en concentration finale 1 mM a été aussi analysée en comparaison avec la cystéine et la cystine à la même concentration (Fig. 45). De cette expérience ressortent trois indications : seul le glutathion réduit a une action positive sur la conversion, en l'accéléralant ; ce même composé inhibe la redimérisation observée à 24 heures ; le glutathion oxydé, la cystéine et la cystine inhibent la conversion.

De plus le glutathion réduit fait apparaître à 24 heures une nouvelle bande de masse moléculaire supérieure à 60 Kd. Cette bande pourrait correspondre à l'AVS réduit par le glutathion selon un mécanisme non enzymatique. En effet, nous avons vérifié qu'en présence d'agents réducteurs l'AVS monomère présente une masse moléculaire supérieure à celle de l'AVS monomère "naturel", ceci probablement en raison d'une désorganisation de la structure tertiaire de la molécule. Cette observation atteste encore l'hypothèse d'un système enzymatique intervenant dans le processus de monomérisation.

Ces résultats indiquant la probable intervention d'un système enzymatique de type thiol-reductase, pH et thermo-dépendant, nous avons soumis des substrats potentiels à ce système.

PROFIL ELECTROPHORETIQUE DU SURNAGEANT DE  
LIBERATION pH 5,5 MODIFIE A pH 7,5 ET MARQUE  
PAR L'ACIDE IODO ACETIQUE  $^{14}\text{C}$



A coloration bleu Coomassie

B autoradiographie

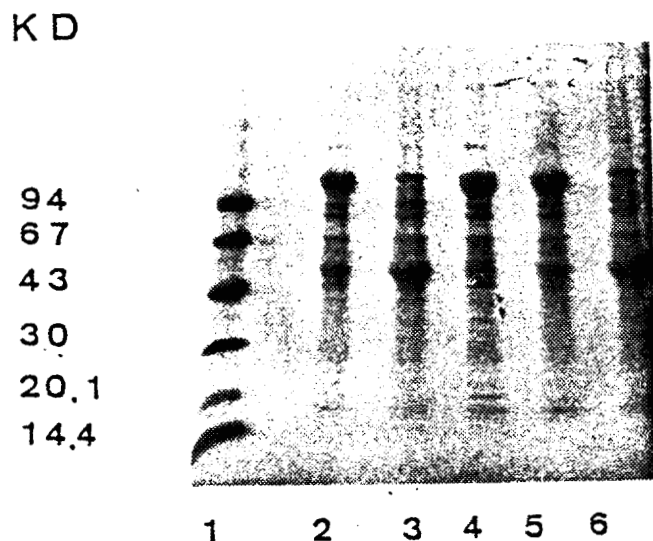
échantillons déposés directement en présence de glycérol 10 % (v:v)

1 surnageant modifié à pH 7,5 au t 0 d'incubation à température ambiante

2 surnageant modifié à pH 7,5 au t 4 H d'incubation à température ambiante

Figure 43

PROFIL ELECTROPHORETIQUE DE L'EFFET DU NEM, E-64 ET  
Cd<sup>+</sup> 0,1 mM SUR LA CONVERSION DIMERE/MONOMERE



coloration bleu Coomassie

échantillons déposés directement en présence de glycérol 10%  
(v/v)

1 : standard de poids moléculaire

2 : surnageant pH 5,5 modifié à pH 7,0 t o

3 : surnageant pH 5,5 modifié à pH 7,0 t 3 h

4 : " en présence de NEM 0,1 mM

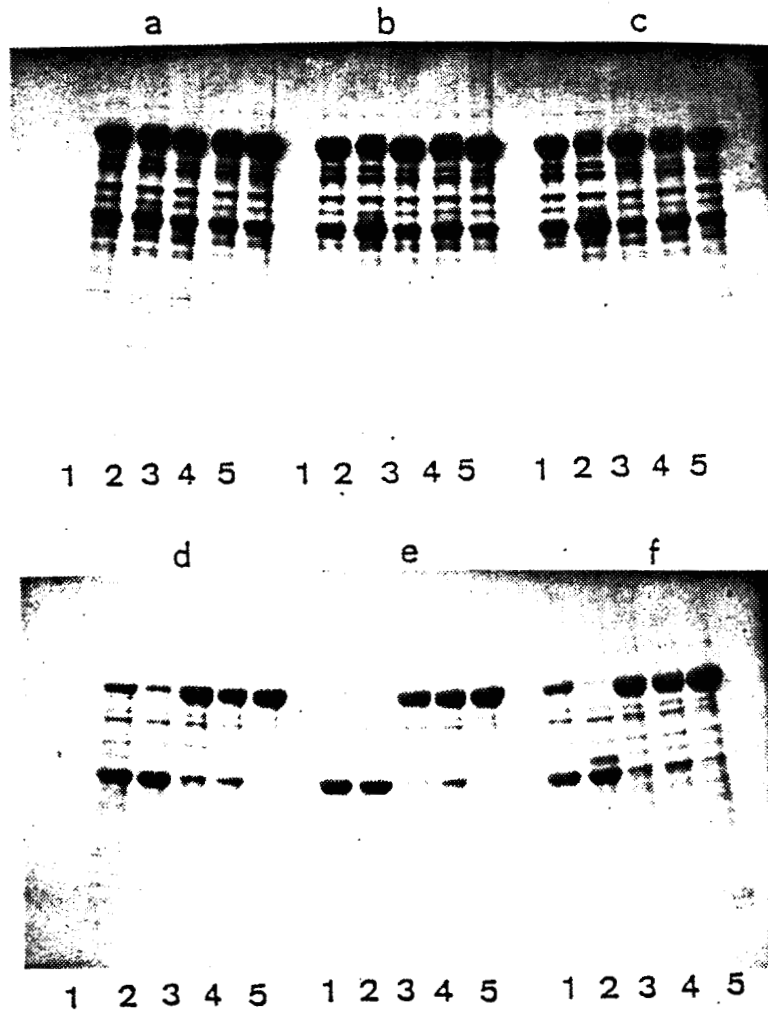
5 : " en présence de Cd<sup>+</sup> 0,1 mM

6 : " en présence de E-64 0,1 mM

Figure 44



PROFILS ELECTROPHORETIQUES DU SURNAGEANT pH 5,5 MODIFIE  
A pH 7,0 INCUBE EN PRESENCE DE DIFFERENTS COFACTEURS 1mM



Coloration bleu Coomassie

Echantillons déposés directement en présence de glycérol 10% v/v

incubation à température ambiante : t 0 (a), t 30 mn (b)

t 1 h (c) t 3 h (d) t 6 h (e) t 24 h (f)

1 : surnageant pH 5,5 modifié à pH 7,0

|     |   |                                 |
|-----|---|---------------------------------|
| 2 : | " | additionné de glutathion réduit |
| 3 : | " | additionné de glutathion oxydé  |
| 4 : | " | additionné de cystéine          |
| 5 : | " | additionné de cystine           |

Figure 45

#### 4. Substrats potentiels

##### a) Immunoglobulines

Nous avons choisi ce type de substrat en raison de sa structure très riche en ponts disulfures interchaînes et aussi dans le mesure où un effet des constituants du manteau sur les immunoglobulines pourrait constituer un élément intéressant dans le dialogue hôte-parasite, au plan de l'immunosuppression. Une préparation d'IgG<sub>1</sub> humaines fournies par le laboratoire du Pr Rousseaux (Institut de Recherches sur le Cancer de Lille et URA 409 CNRS, BP 311 59020 Lille) a été ajoutée au surnageant pH 5,5 modifié pH 7,0, et une incubation a été réalisée en parallèle avec un tampon pH 5,5 modifié pH 7,0.

La même expérience a été réalisée avec une préparation d'IgM humaines de la même origine. Nous avons représenté sur la figure 46 pour les IgG, et la figure 47 pour les IgM les résultats de ces incubations par l'intégration des gels de polyacrylamide colorés au bleu Coomassie, intégrations qui permettent une meilleure comparaison de la conversion dans les différentes conditions. Ces résultats montrent que :

- \* le système de conversion est sans effet direct apparent sur les immunoglobulines, qu'il s'agisse d'IgG ou d'IgM ;

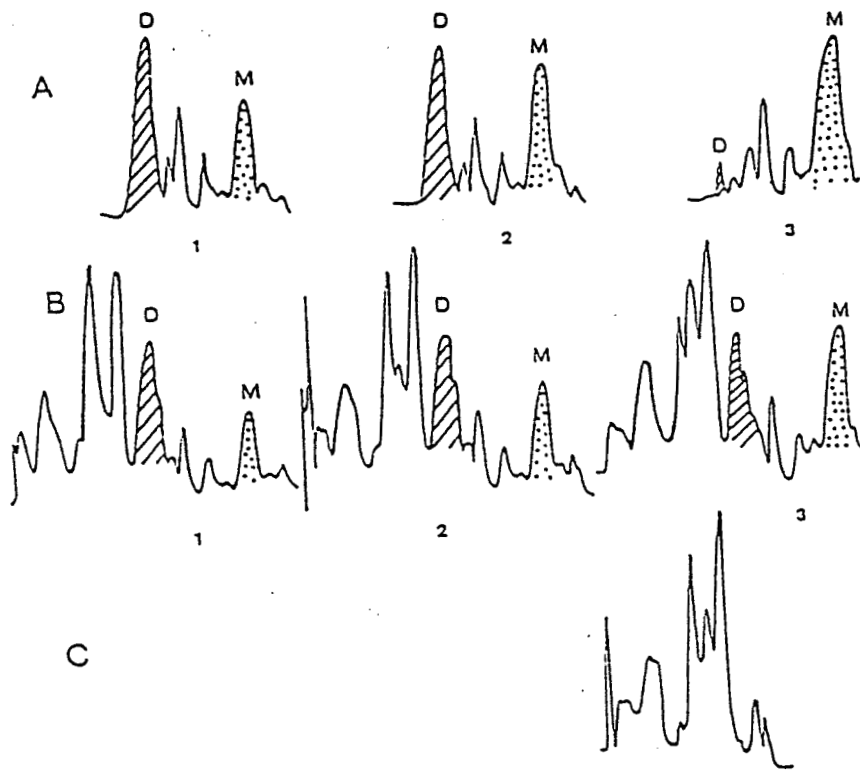
- \* le rendement de la conversion du dimère de l'AVS est plus faible lorsque l'incubation est réalisée en présence de ces substrats. La conversion est ralentie.

##### b) Insuline, LH

Deux substrats de faible taille moléculaire ont été également proposés au système : l'insuline qui présente au plan structural un intérêt du fait de son organisation en deux axes peptidiques réunis par deux ponts disulfures ; la LH qui est formée de l'association de deux sous unités glycoprotéiques  $\alpha$  et  $\beta$ , association qui dépend de l'intégrité de ponts disulfures à l'origine de leur structure tridimensionnelle.

Le résultat de l'incubation en présence d'insuline (Fig. 48) se caractérise essentiellement par un effet inhibiteur sur la conversion. En ce qui concerne la LH, nous avons travaillé avec la molécule marquée fournie par le laboratoire du professeur JUTISZ (Unité CNRS : Laboratoire des hormones polypeptidiques, 91198 Gif-sur-Yvette). L'incubation se traduit : en bleu Coomassie par une inhibition de la conversion de l'AVS (Fig. 49A) ; en radioactivité, par une absence de modification du profil d'électrophorétique (intégration de l'autoradiographie : Fig. 49.B).

EFFET DU SYSTEME DE CONVERSION SUR  
LES IgG<sub>1</sub> HUMAINES. INTEGRATION DES BANDES  
PROTEIQUES APRES MIGRATION ELECTROPHORETIQUE



D : AVS DIMERE

M : AVS MONOMERE

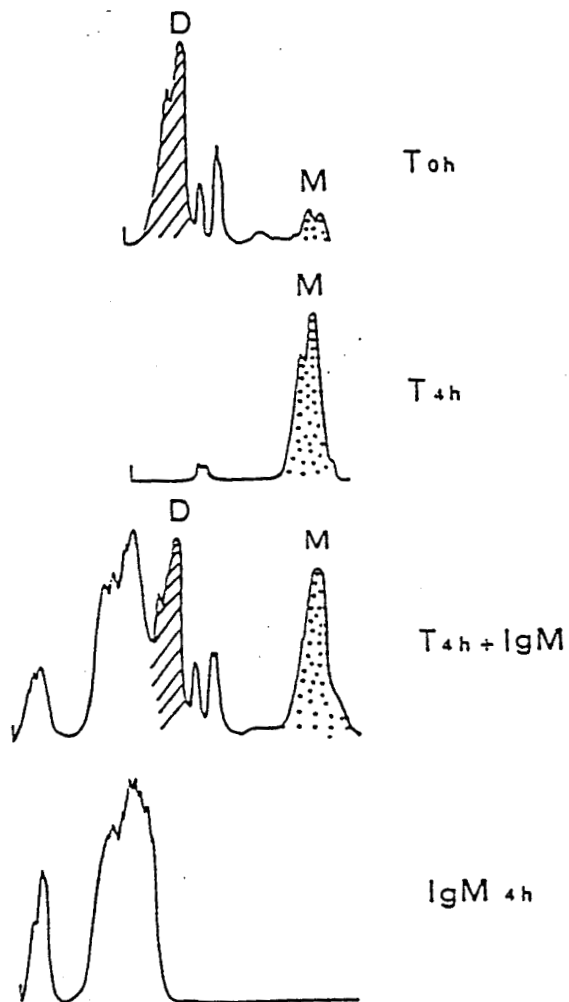
A Contrôle : surnageant pH 5,5 modifié à pH 7,0, incubé à température ambiante 30 minutes (1), 1 heure (2), 4 heures (3).

B surnageant pH 5,5 modifié à pH 7,0, incubé à température ambiante 30 minutes (1), 1 heure (2), 4 heures (3), en présence d'IgG<sub>1</sub>

C témoin IgG<sub>1</sub> incubées dans le tampon pH 5,5 modifié à pH 7,0, 4 heures à température ambiante.

Figure 46

EFFET DU SYSTEME DE CONVERSION  
SUR LES IgM HUMAINES. INTEGRATION  
DES BANDES PROTEIQUES APRES MIGRATION  
ELECTROPHORETIQUE.



D : AVS dimère

M : AVS monomère

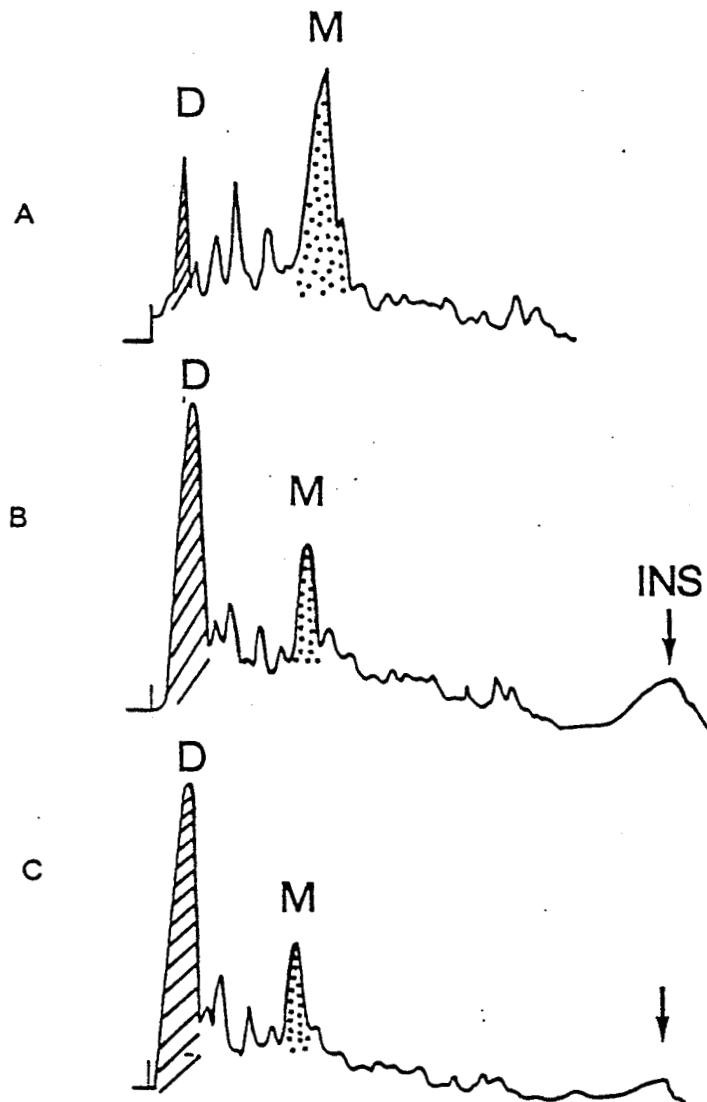
A Contrôle : surnageant pH 5,5 modifié à pH 7,0 incubé à température ambiante en début d'incubation (t 0) et après quatre heures (t 4h)

B surnageant pH 5,5 modifié à pH 7,0 incubé à température ambiante 4 heures en présence d'IgM

C témoin IgM incubées dans le tampon pH 5,5 modifié à pH 7,0, 4 heures à température ambiante.

Figure 47

EFFET DU SYSTEME DE CONVERSION  
SUR L'INSULINE. INTEGRATION DES  
BANDES PROTEIQUES APRES MIGRATION  
ELECTROPHORETIQUE



D : AVS dimère

M : AVS monomère

INS : insuline libre

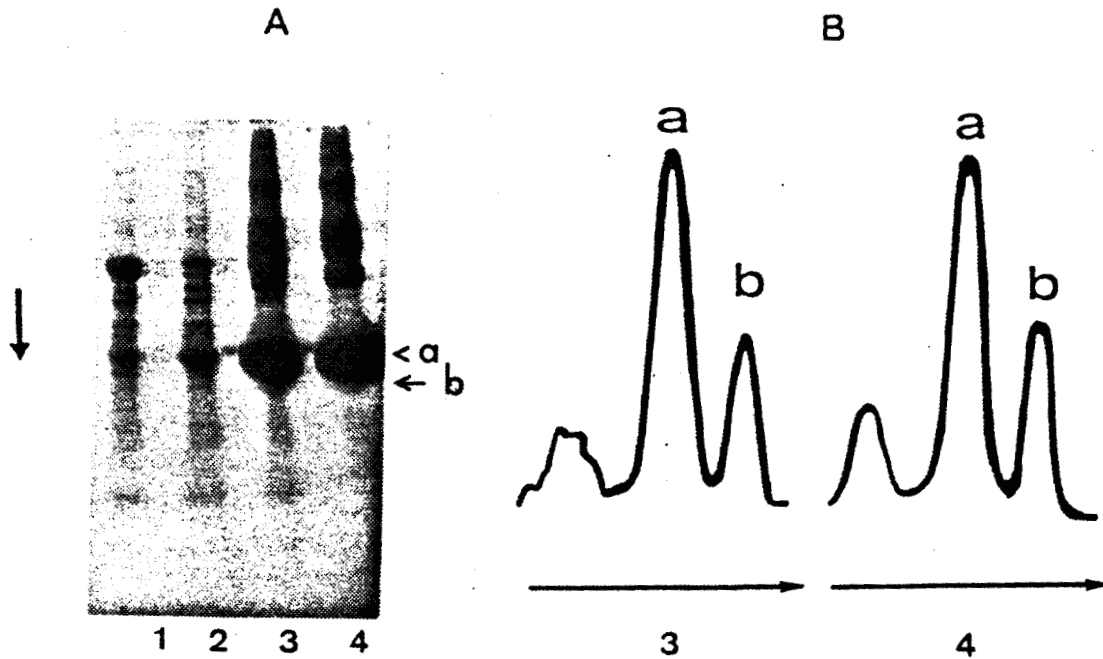
A surnageant pH 5,5 modifié à pH 7,0 incubé 4 heures à température ambiante.

B surnageant pH 5,5 modifié à pH 7,0 incubé 4 heures à température ambiante en présence d'insuline.

C surnageant pH 5,5 modifié à pH 7,0 au t 0 d'incubation

Figure 48

EFFET DU SYSTEME DE CONVERSION  
SUR LA LH RADIOMARQUEE



A : coloration bleu Coomassie du gel de polyacrylamide

B : intégration de l'autoradiographie

1 : surnageant pH 5,5 modifié à pH 7,0 t 0

2 : surnageant pH 5,5 modifié à pH 7,0 t 4 H à température ambiante

3 : surnageant pH 5,5 modifié à pH 7,0 t 4 H à température ambiante en présence de LH radiomarquée

4 : tampon pH 5,5 modifié à pH 7,0 t 4 H à température ambiante en présence de LH radiomarquée

a LH native

b LH sous-unité  $\alpha$

Figure 49

c) AVS membranaire

Nous avons testé l'effet de la conversion sur la forme membranaire de l'AVS homologue, radiomarkée à l'acide myristique  $^{14}\text{C}$  et préparée par traitement acide. La comparaison de l'incubation de cette préparation dans le surnageant modifié et dans le tampon modifié effectuée par intégration des autoradiographies montre clairement que l'AVS membranaire est bien sensible au système de conversion (Fig. 50).

d) Trypanosoma evansi AnTat 3-5

Enfin, nous avons recherché chez une espèce voisine de T. brucei l'existence du système, et le cas échéant, si l'AVS de type evansi pouvait être substrat du système de T. brucei.

Dans un premier temps, par une étude comparative avec T. brucei, nous avons montré que l'AVS de T. evansi AnTat 3.5 se comportait aussi sous forme d'un dimère de masse moléculaire supérieure à 120 Kd, qui, en présence de réducteur, apparaissait aussi sous forme monomérique (Fig. 51.A). Un marquage à l'acide iodoacétique de ces fractions indique une structure monomérique à thiol comme pour T. brucei.

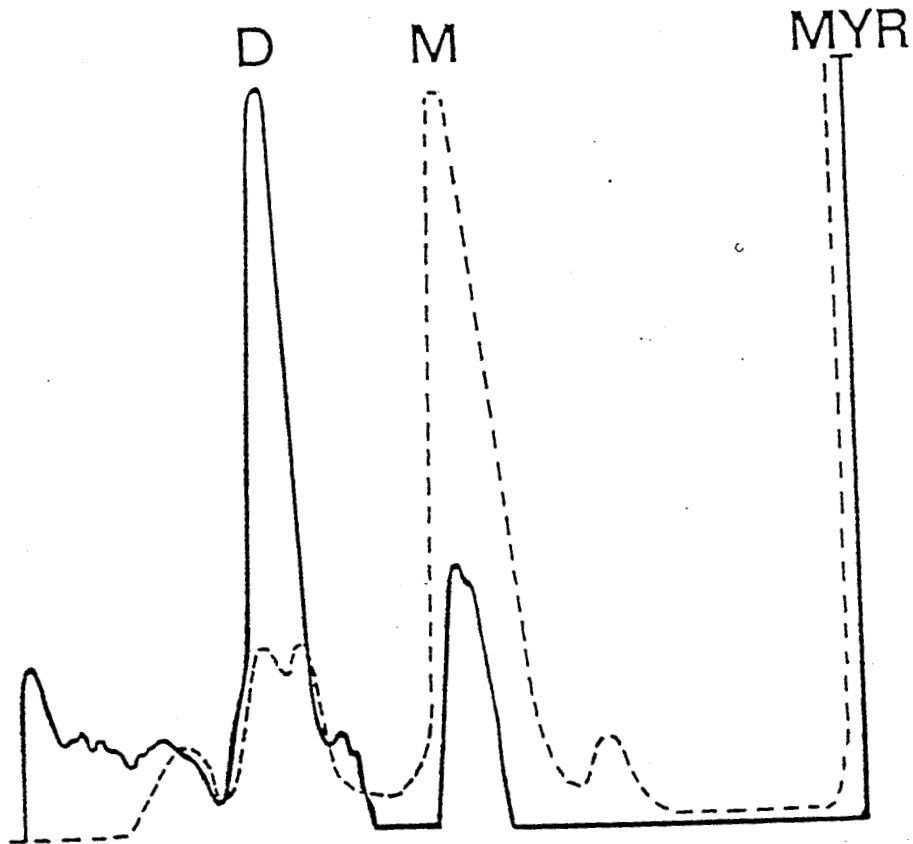
La seconde approche a consisté à modifier le surnageant pH 5,5 de T. evansi à pH 7,0 et d'observer son comportement à température ambiante. Il n'est apparu aucune modification claire de l'AVS (Fig. 51.B). Enfin, nous avons mélangé 0,25 volume de surnageant pH 5,5 modifié à pH 7,0 de T. brucei à 0,75 volume de surnageant pH 5,5 modifié à pH 7,0 de T. evansi et comparé l'incubation de ce mélange à celle de 1 volume de surnageant modifié de T. evansi (Fig. 51). Nous n'avons pu observer non plus dans ce cas de conversion de l'AVS de T. evansi alors que la conversion de l'AVS de T. brucei a été ralentie (Fig. 51).

Tous ces essais de substrat, la spécificité des conditions d'observation de la conversion, confirment tout d'abord l'existence d'un système enzymatique propre au parasite. De plus, un ensemble de fractions de poids moléculaire variable mais riches en ponts disulfures paraît empêcher en partie la conversion du dimère AVS, jouant alors le rôle d'inhibiteurs compétitifs.

Conclusion

Nous avons démontré par cette étude l'existence dans le manteau de surface de Trypanosoma brucei brucei AnTat 1.1 d'un système enzymatique particulier à savoir une AVS-disulfure réductase qui s'exprime de manière optimale à pH basique et à température ambiante. Son action se situe au niveau

EFFET DU SYSTEME DE CONVERSION  
SUR L'AVS MEMBRANAIRE MARQUE A L'ACIDE  
MYRISTIQUE<sup>14</sup>C. INTEGRATION DES BANDES RADIOACTIVES  
APRES MIGRATION ELECTROPHORETIQUE ET AUTORADIOGRAPHIE.



D : AVS Dimère

M : AVS Monomère

MYR : Acide myristique libre

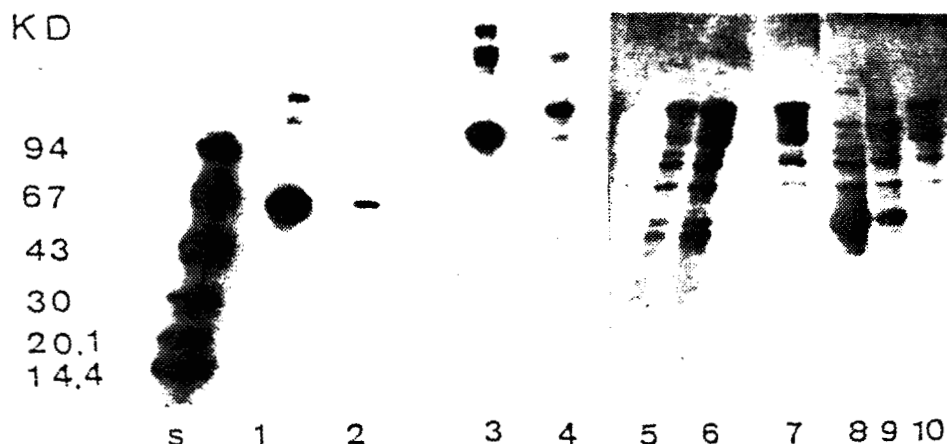
— AVS membranaire marqué, incubé 4 heures à température ambiante dans le tampon pH 5,5 modifié à pH 7,0.

----- AVS membranaire marqué, incubé 4 heures à température ambiante dans le surnageant pH 5,5 modifié à pH 7,0

Figure 50



ETUDE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE DU SYSTEME  
DE CONVERSION AVS DIMERE - AVS MONOMERE CHEZ  
TRYPANOSOMA EVANSI AnTat 3.5



Coloration bleu Coomassie

1,2 : tampon de reprise d'échantillons +  $\beta$ ME

3,4 : tampon de reprise d'échantillons -  $\beta$ ME

5-10 : échantillons déposés directement en présence de glycérol 10 % (v/v)

S : standard de poids moléculaire

1,3 : AVS de T.b.brucei AnTat 1.1 purifié sur Con-A Sépharose

2,4 : AVS de T.evansi AnTat 3.5 purifié sur Con-A Sépharose

5 : T.evansi surnageant pH 5,5

6 : T.evansi surnageant pH 5,5 modifié pH 7,0 t 0

7 : T.evansi surnageant pH 5,5 modifié pH 7,0 t 4H

8 : T.b.brucei surnageant pH 5,5 modifié pH 7,0 t 4H

9 : T.b.brucei surnageant pH 5,5 modifié pH 7,0 + T.evansi surnageant pH 5,5 modifié (1/3, v/v) t 4H

10 : T.evansi surnageant pH 5,5 modifié pH 7,0 t 4H

Figure 51

de l'AVS dimère avec une spécificité étroite, conduisant à sa réduction en forme monomère. Si l'action de ce système est bien uniquement ciblée sur l'AVS, cela nous amène à plusieurs remarques. On montre en effet que l'AVS de AnTat 1.1 a une structure quaternaire non figée, qui n'est pas représentative de tous les trypanosomes et doit donc appartenir à une "panoplie" dont dispose le genre Trypanosoma pour parfaire la cohésion du manteau et déjouer les défenses de l'hôte, voire favoriser des échanges nutritifs avec celui-ci. Cependant il faut souligner que l'activité s'exprime plus nettement à une température proche de celle de la mouche, et qu'elle ne s'exprime pas chez T. evansi, espèce non transmise cycliquement par le diptère. Ceci est une possible voie dans la compréhension de la finalité du système. L'AVS monomère constituerait-il la première étape dans la déplétion du manteau chez la forme procyclique ?

D'autre part nous avons testé l'effet du système sur des substrats intéressants dans la relation hôte-parasite, et, si ces substrats ne sont pas apparemment structuralement modifiés, ils sont en partie utilisés par le système. De plus, leur rôle d'inhibiteur compétitif influence probablement le métabolisme du parasite.

Enfin, il existe d'autres molécules qui représentent un intérêt dans notre modèle et qui seraient susceptibles d'être modifiées : l'IL-2 dont un pont disulfure est essentiel pour son activité (Smith, 1988) ; le récepteur des lymphocytes T avec ses sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  reliées par un pont disulfure (Bensoussan, 1988) ; et des protéines réducteur-sensibles impliquées dans la trypanolyse non immune (Hadjuck et coll, 1988).

## D. ACTIVITES PROTEOLYTIQUES

### Introduction

L'intégrité du matériel de surface des trypanosomes, obtenu après libération en tampon phosphate glucosé, étant dépendante du pH et de la présence d'inhibiteurs protéasiques, notre intérêt s'est porté vers la recherche d'enzymes protéolytiques et leur caractérisation dans les surnageants de libération du manteau parasitaire et aussi dans les fractions antigéniques purifiées sur Concanavalline-A Sépharose.

## 1. Surnageants de libération pH 5,5 et pH 7,0

Cette étude a été menée à partir de surnageants pH 5,5 et pH 7,0 préparés sans antiprotéases, congelés en petits volumes directement après l'étape de centrifugation qui termine la libération du manteau de surface parasitaire. Les surnageants ont tout d'abord été examinés en gel de polyacrylamide SDS enrichi en gélatine pour révéler d'éventuelles activités protéasiques. Les activités ont ensuite été estimées par dosage fluorométrique soit sur préparations brutes, soit sur l'éluat de fractionnement des surnageants parasitaires en HPLC gel perméation sur colonne TSK SW G4000 (LKB).

### a. Gels d'activité<sup>9</sup>

La gélatine contenue dans la structure du gel de polyacrylamide constitue le substrat potentiel des activités protéolytiques. Après migration, le gel est lavé, incubé 4 heures à 37°C dans des tampons de pH 6,0 ou pH 8,3 contenant ou non du DTT (dithiotreitol), puis il est coloré par le bleu Coomassie. Les bandes non colorées correspondent alors à des zones d'activités protéolytiques dans la mesure où la gélatine y a été dégradée par les enzymes.

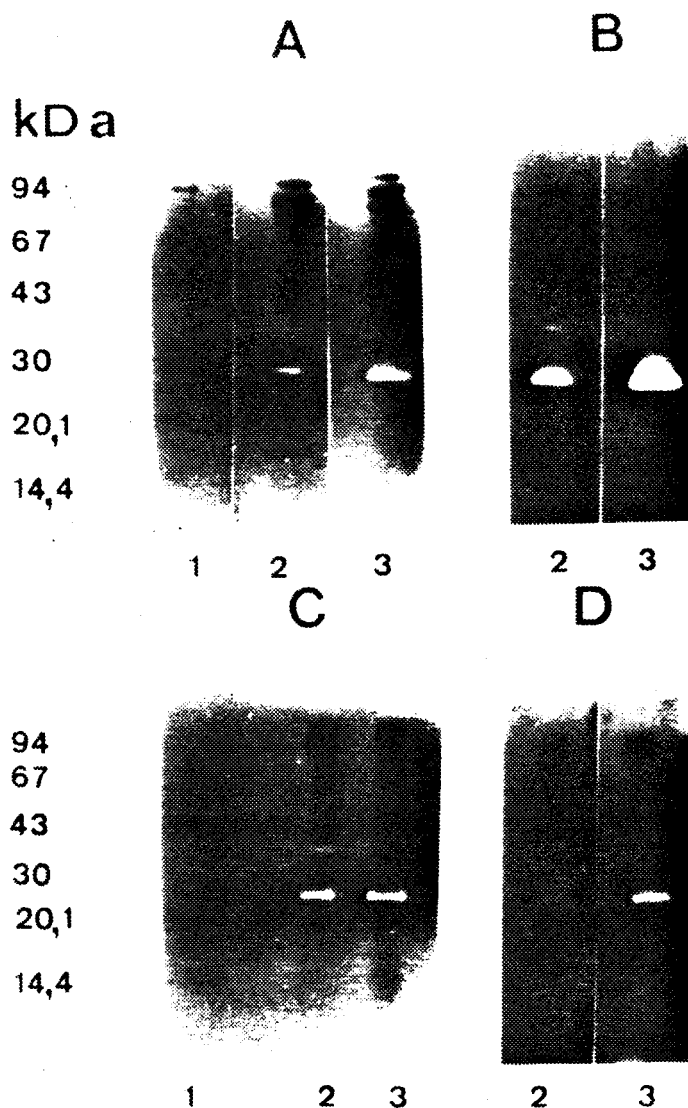
En absence de DTT, l'incubation des gels aux deux pH se traduit par l'existence dans les deux surnageants d'une bande décolorée de masse moléculaire apparente 29 Kd accompagnée seulement dans le surnageant pH 5,5 d'une bande de 39 Kd (Fig. 52.A et C). En présence de DTT la bande de masse 29 Kd est beaucoup plus intense, particulièrement lors de l'incubation à pH 6,0 (Fig. 52.B et D).

Par cette première approche, nous confirmons l'hypothèse de la présence dans les surnageants pH 5,5 ou pH 7,0 d'une activité protéolytique, qui peut être amplifiée par le DTT, et qui se répartit en au moins deux zones de taille moléculaire. Pour préciser ce résultat, nous avons entrepris une étude qualitative plus spécifique par les dosages fluorométriques d'activités protéolytiques sur substrat de synthèse.

### b. Dosage fluorométrique<sup>21</sup>

La technique consiste en l'incubation de l'échantillon en présence de substrats peptidiques fluorogènes : Z-PHE-ARG-NMec et Z-ARG-ARG-NMec à pH 6,0 ou pH 8,3 en présence de DTT. L'activité peptidasique est caractérisée par la fluorescence émise par le substrat hydrolysé, elle est quantifiée par rapport à une gamme de calibration de N-méthylcoumarine. Les essais sont aussi réalisés en présence de l'inhibiteur de thiol-protéase, le E-64 à 2µM ou en absence de DTT.

PROFILS ELECTROPHORETIQUES D'ACTIVITES ENZYMATIQUES  
DES SURNAGEANTS pH 5,5 ET pH 7,0 PREPARES EN ABSENCE  
D'ANTIPROTEASES



Coloration bleu Coomassie

échantillons déposés directement en présence de glycérol 10 % (v/v)

A,C : incubation sans dithiotreitol

B,D : incubation avec dithiotreitol

A,B : incubation à pH 6,0

C,D : incubation à pH 8,3

1 : standard de poids moléculaire

2 : surnageant pH 5,5

3 : surnageant pH 7,0

Figure 52

#### **\* Surnageants bruts**

Nous avons analysé les deux surnageants, pH 5,5 et pH 7,0, en plusieurs essais de volumes différents (50 et 100 µl), ainsi qu'à plusieurs reprises (de 3 à 9 essais), les résultats représentant les moyennes des essais.

Les activités peptidasiques à pH 6,0 dans les deux surnageants sont très élevées (Tableau 7.A) avec pour le substrat Z-PHE-ARG-NMec une activité deux fois plus élevée dans le surnageant pH 7,0 que dans le surnageant pH 5,5, alors que l'activité est équivalente et plus faible avec le substrat Z-ARG-ARG-NMec. Nous avons représenté l'effet du DTT en facteur d'activation et l'effet du E-64 en pourcentage d'inhibition (tableau 7.B). L'effet du DTT est équivalent pour les deux surnageants : l'activation est de l'ordre d'un facteur 2 pour le substrat Z-PHE-ARG-NMec alors qu'elle est plus faible pour le substrat Z-ARG-ARG-NMec (Facteurs 1,1 et 1,3). A l'inverse, l'effet du E-64 différencie les deux surnageants, surtout avec le substrat Z-PHE-ARG-NMec où l'inhibition est de 55,5% dans le surnageant pH 5,5 contre 78,2% dans le surnageant pH 7,0. Avec le substrat Z-ARG-ARG-NMec le pourcentage d'inhibition par le E-64 est proche de zéro pour les deux surnageants.

Les activités peptidasiques à pH 8,3 sont plus élevées qu'à pH 6,0 (Tableau 8.A) et sont sensiblement identiques dans les deux surnageants pour les deux substrats. De plus, l'effet du DTT, identique pour les deux surnageants, est plus important que dans le dosage à pH 6,0, particulièrement avec le substrat Z-ARG-ARG-NMec. Concernant l'effet du E-64, on retrouve une sensibilité supérieure, avec le substrat Z-PHE-ARG-NMec, dans le surnageant pH 7,0 et une faible inhibition pour les deux surnageants avec le substrat Z-ARG-ARG-NMec (Tableau 8.B).

De ces résultats nous retiendrons :

- qu'il existe dans les surnageants des activités peptidasiques élevées, de type thiol-protéases (E-64 sensibles) et non thiol-protéases (E-64 résistantes) ;
- que certaines activités sont davantage exprimées à pH 8,3 où l'activation par le DTT est plus forte alors que l'inhibition par le E-64 y est plus faible, ce qui implique qu'il existe des activités non thiol-protéases activées par le DTT ;
- que les deux surnageants analysés se différencient essentiellement par leur sensibilité au E-64.

Partant de ces observations, nous avons voulu définir la ou les masses moléculaires des enzymes se rapportant à ces activités.

ACTIVITES PEPTIDASQUES A pH 6,0  
DES SURNAGEANTS pH 5,5 ET pH 7,0

A activité en présence de DTT

|                  | Z PHE-ARG-NMec <sup>*</sup> | Z ARG-ARG-NMec <sup>0</sup> |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| surageant pH 5,5 | 407 ± 30                    | 328 ± 11                    |
| surageant pH 7,0 | 766 ± 69                    | 312 ± 50                    |

résultats exprimés en U/L

B Effet du DTT et du E-64

|                     | Z-PHE-ARG-NMec <sup>*</sup>           |                                            | Z-ARG-ARG-NMec <sup>0</sup>           |                                            |
|---------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|
|                     | facteur<br>d'activation<br>par le DTT | pourcentage<br>d'inhibition<br>par le E-64 | facteur<br>d'activation<br>par le DTT | pourcentage<br>d'inhibition<br>par le E-64 |
| surageant<br>pH 5,5 | 1,8 ± 0,40                            | 55,5 ± 7,49                                | 1,1 ± 0,05                            | 0,8 ± 1,32                                 |
| surageant<br>pH 7,0 | 2,1 ± 0,42                            | 78,2 ± 5,17                                | 1,3 ± 0,02                            | 4,0 ± 2,57                                 |

moyenne et écart-type sur 7 essais (\*) ou 3 essais (0)

Tableau 7

ACTIVITES PEPTIDASQUES A pH 8,3  
DES SURNAGEANTS pH 5,5 ET pH 7,0

A activité en présence de DTT

|                  | Z PHE ARG-NMec* | Z ARG-ARG-NMec <sup>0</sup> |
|------------------|-----------------|-----------------------------|
| surageant pH 5,5 | 675 $\pm$ 93    | 642 $\pm$ 16.               |
| surageant pH 7,0 | 681 $\pm$ 70    | 560 $\pm$ 19.               |

(résultats exprimés en U/L)

B Effet du DTT et du E-64

|                     | Z-PHE-ARG-NMec*                       |                                            | Z-ARG-ARG-NMec <sup>0</sup>           |                                            |
|---------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|
|                     | facteur<br>d'activation<br>par le DTT | pourcentage<br>d'inhibition<br>par le E-64 | facteur<br>d'activation<br>par le DTT | pourcentage<br>d'inhibition<br>par le E-64 |
| surageant<br>pH 5,5 | 2,3 $\pm$ 0,38                        | 22,4 $\pm$ 10,95                           | 2,8 $\pm$ 0,04.                       | 2,7 $\pm$ 1,46                             |
| surageant<br>pH 7,0 | 2,4 $\pm$ 0,35                        | 43,5 $\pm$ 14,08                           | 3,5 $\pm$ 0,13.                       | 3,2 $\pm$ 2,32                             |

moyenne et écart-type sur 7 essais ( \* ) ou 3 essais (0)

Tableau 8

### **\* Fractionnement par chromatographie HPLC**

Une colonne HPLC gel perméation<sup>16</sup> munie d'une pré-colonne, est équilibrée en tampon phosphate pH 7,0 sans SDS. Plusieurs injections de 0,2 ml de surnageant ont été nécessaires pour avoir avec une collection de 0,7 ml par fraction, suffisamment de matériel pour les différents tests, avec une prise d'essai de 0,2 ml d'éluat par dosage. Les résultats apparaissent sous forme de chromatogrammes d'activité, activité qui est représentée à l'échelle logarithmique.

Nous avons tout d'abord comparé dans les fractions des deux surnageants, les activités E-64 sensibles et E-64 résistantes, aux deux pH.

#### **A pH 6,0 (Fig. 53)**

- Vis-à-vis du substrat Z-PHE-ARG-NMec, le surnageant pH 5,5 présente un massif large d'activité dont le maximum se situe au temps de rétention 29 minutes qui correspond d'après la calibration, à une masse moléculaire d'environ 70 Kd. En présence de E-64 ce pic est préservé, et l'activité E-64 sensible se résoud en deux pics de faible activité dont le plus élevé a un temps de rétention de 32 minutes (MM 30 kd environ) (Fig. 53A). On retrouve l'activité E-64 résistante à 29 minutes dans le surnageant pH 7,0 mais l'activité E-64 sensible est plus importante avec un pic à 32 minutes suivi d'une trainée. De plus, en début de chromatogramme, apparaît un pic d'activité E-64 sensible correspondant à du matériel de très haut poids moléculaire (Fig 53.B).

- Vis-à-vis du substrat Z-ARG-ARG-NMec, apparaît à nouveau un pic, relativement étroit, d'activité E-64 résistante, à 29 minutes (Fig. 53.C,D).

#### **A PH 8,3, les résultats sont différents (Fig. 54)**

- L'activité E-64 résistante correspondant à la masse moléculaire 70 Kd atteint des valeurs beaucoup plus élevées dans les deux surnageants : pour le substrat Z-PHE-ARG-NMec (facteur 3,2 dans le surnageant pH 5,5, facteur 5,8 dans le surnageant pH 7,0) ; et surtout pour le substrat Z-ARG-ARG-NMec (facteur 5,1 pour le surnageant pH 5,5, facteur 8,5 pour le surnageant pH 7,0).

- L'activité E-64 sensible vis à vis du substrat Z-PHE-ARG-NMec se traduit dans le surnageant pH 5,5 par un pic plus élevé au temps 31 minutes (Fig 54.A). Dans le surnageant pH 7,0, cette activité est distribuée en trois pics : un pic de très haut poids moléculaire, un pic à 28 minutes et un troisième à 33 minutes (Fig. 54.B). Vis à vis du substrat Z-ARG-ARG-NMec, on

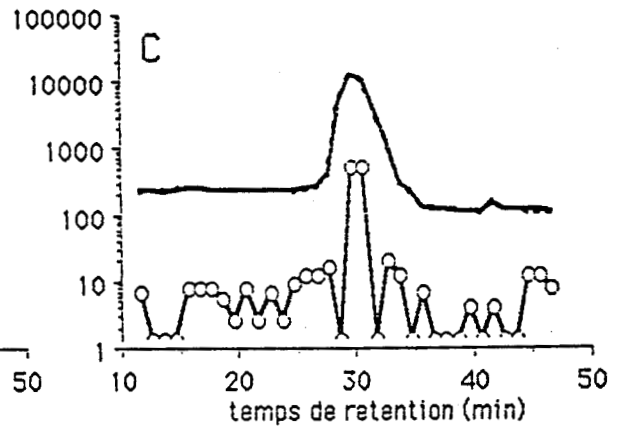
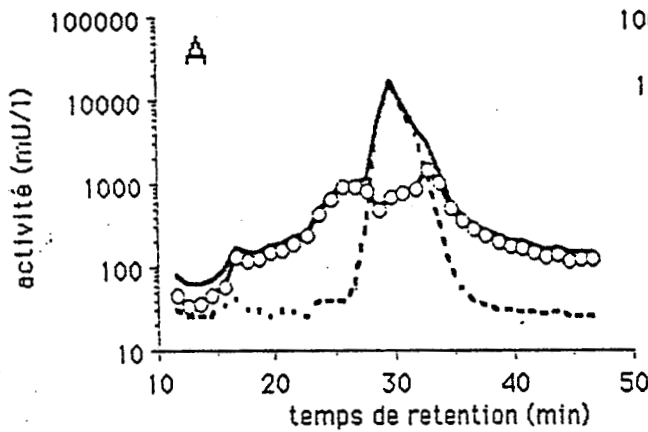


PROFILS D'ACTIVITES PEPTIDASQUES A pH 6,0 DES SURAGEANTS  
pH 5,5 ET pH 7,0 FRACTIONNES SUR HPLC G4000

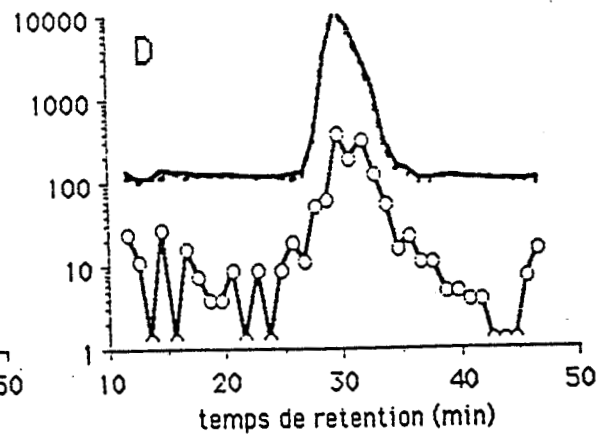
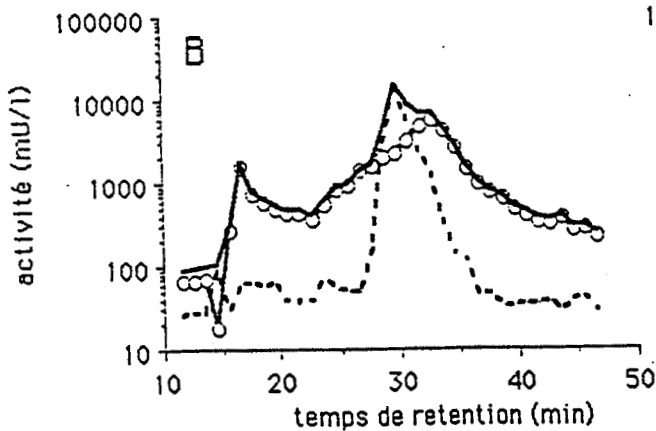
surnageant pH 5,5

Z-PHE-ARG-NMec

Z-ARG-ARG-NMec



surnageant pH 7,0



— activité  
- - - activité en présence de E-64  
—○— activité sensible au E-64

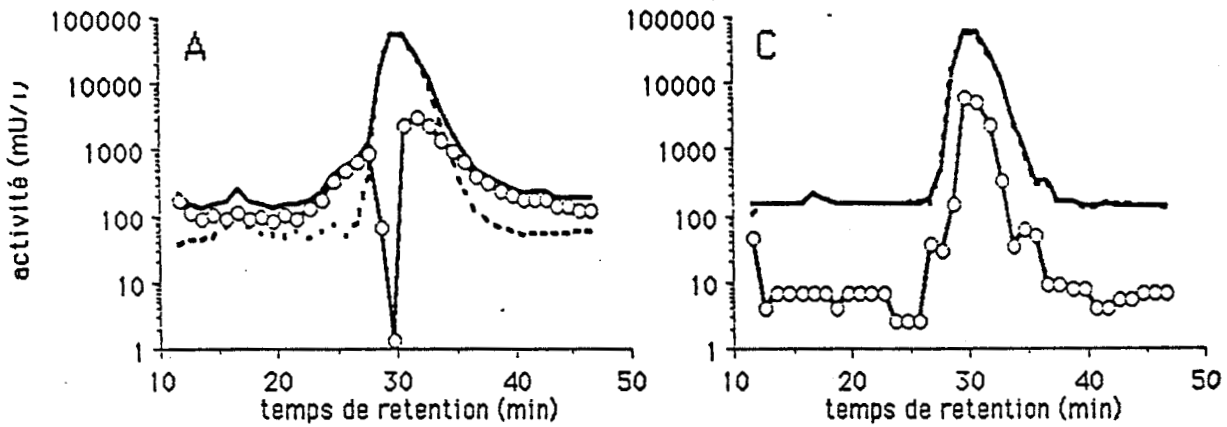
Figure 53

PROFILS D'ACTIVITES PEPTIDASQUES A pH 8,3 DES  
SURNAGEANTS pH 5,5 ET pH 7,0 FRACTIONNES SUR HPLC G4000

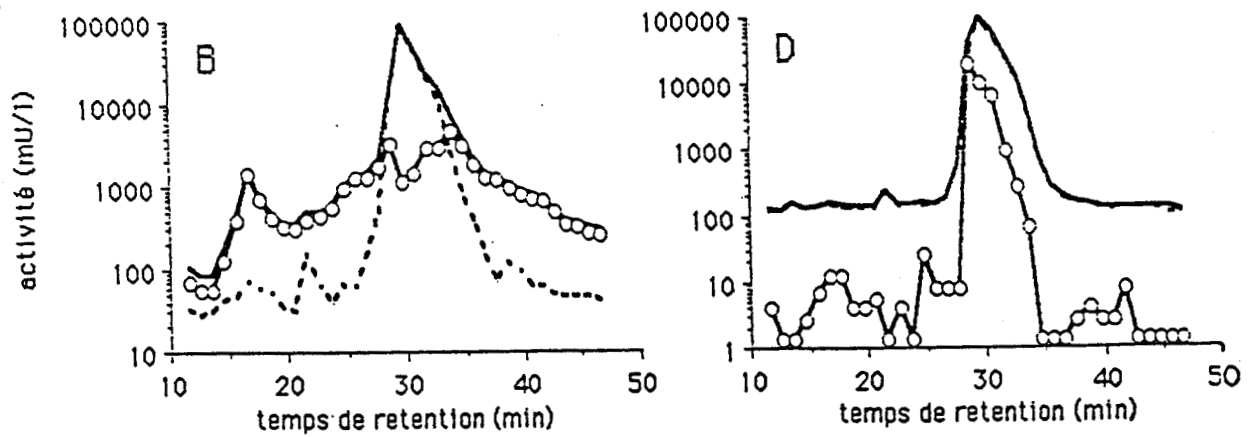
surnageant pH 5,5

Z-PHE-ARG-NMec

Z-ARG-ARG-NMec



surnageant pH 7,0



— activité  
---- activité en présence de E-64  
—○— activité sensible au E-64

Figure 54

retrouve une activité E-64 sensible à 29 minutes dans le surnageant pH 5,5 (Fig. 54.C) et à 28 minutes dans le surnageant pH 7,0 (Fig. 54.D).

Ce fractionnement en HPLC permet de distinguer les activités E-64 sensible et E-64 résistante.

L'activité E-64 résistante correspond à une masse moléculaire 70 Kd, elle est accompagnée d'une activité E-64 sensible en faible taux relatif.

L'activité E-64 sensible correspond à plusieurs entités dont une de masse moléculaire 30 Kd.

Notons enfin que les substrats permettent de différencier les activités : Z-ARG-ARG-NMec montre principalement l'activité E-64 résistante ; Z-PHE-ARG-NMec montre l'activité E-64 sensible et l'activité E-64 résistante.

Pour compléter cette étude nous avons analysé les constituants des surnageants de libération après purification sur Concanavaline-A Sépharose.

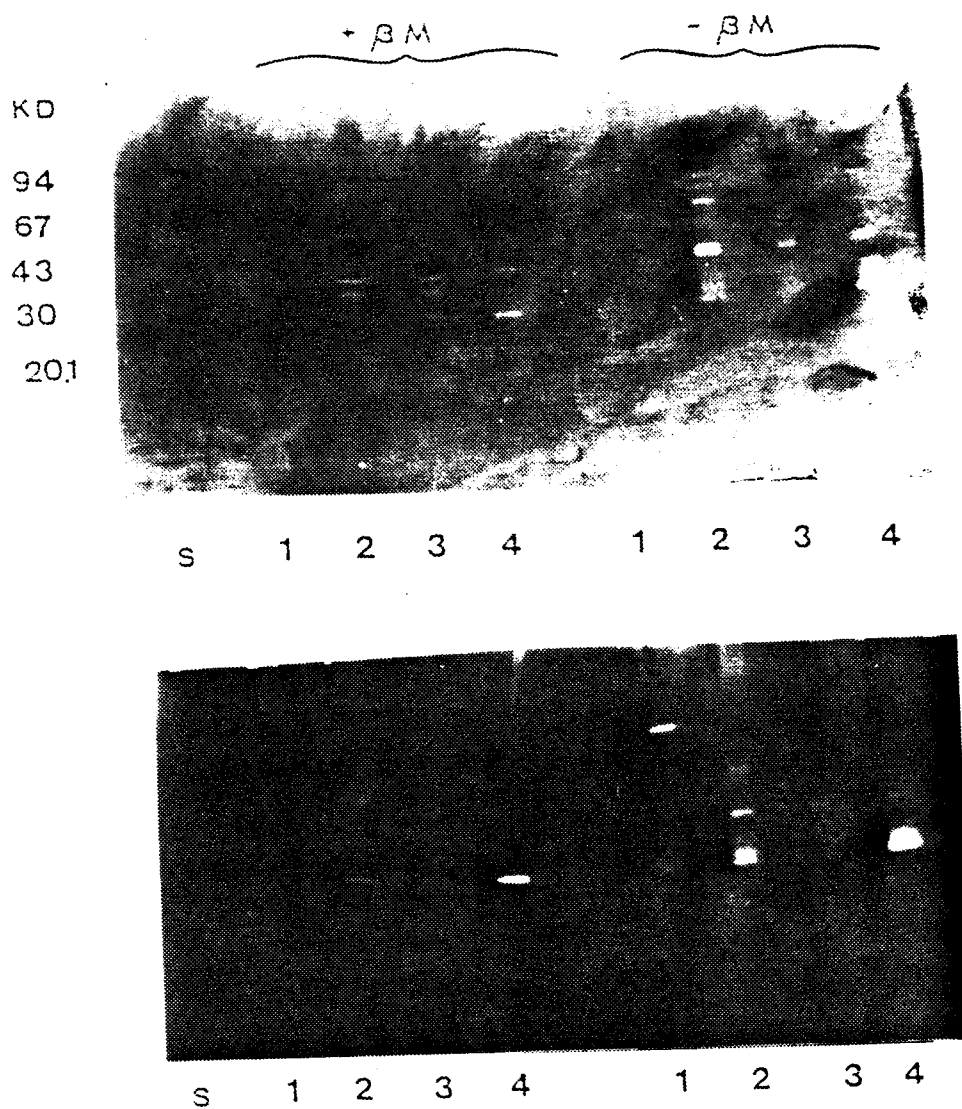
## 2. Fractions purifiées sur Concanavaline A Sépharose (Fractions Con-A)

La préparation de ces fractions a été réalisée exactement selon le protocole décrit chapitre B partant de surnageants sans antiprotéases. Les fractions Con-A ont été analysées en gel d'activité puis en dosage avant et après fractionnement par HPLC.

### a. Gels d'activité (Fig. 55)

Les fractions ont été déposées en présence ou non de réducteur ( $\beta$  mercaptoethanol) et l'incubation a été réalisée en présence de DTT à PH 6,0. Cette révélation montre de nombreuses bandes d'activités caractéristiques des différentes fractions. On observe dans la fraction  $F_1$  du surnageant pH 5,5 une bande à environ 60 kd de masse moléculaire, insensible au réducteur, alors que dans la  $F_1$  du surnageant pH 7,0 une bande apparaît à environ 120 Kd et n'est pas observée en présence de réducteur. Les fractions retenues ( $F_2$ ,  $F_3$ ,  $F_4$ ) ont en commun deux bandes à 30 Kd et 40 Kd, insensibles au réducteur, et d'intensité relative variable selon la fraction. La bande à 40 Kd est plus intense dans la  $F_2$  et la  $F_3$ , moins intense dans la  $F_4$ . Enfin, apparaissent dans les  $F_2$  des bandes de plus haut poids moléculaire à 60 Kd et plus de 120 Kd.

- 119 -  
 PROFILS ELECTROPHORETIQUES  
 D'ACTIVITES ENZYMATIQUES ETUDIEES A pH 6,0 DES FRACTIONS  
 DE CONCAVALINE-A SEPHAROSE



A : Fractions de con-A sépharose à partir du surnageant pH 5,5  
 B : Fractions de con-A sépharose à partir du surnageant pH 7,0  
 Coloration bleu Coomassie

+ βME : tampon de reprise d'échantillons

- βME : tampon de reprise d'échantillons

S : standard de poids moléculaire

1 : F1 de Con-A

2 : F2 de Con-A

3 : F3 de Con-A

4 : F4 de Con-A

Ce résultat permet de distinguer les fractions retenues sur Con-A, et de les différencier plus nettement encore de la fraction exclue. Le dosage fluorométrique va confirmer en partie ces observations.

b. Dosage fluorométrique (Tableau 9)

Ces dosages ont été réalisés à pH 6,0 dans les trois conditions précédemment décrites. Le tableau des activités relatives montre que avec le substrat Z-PHE-ARG-NMec, pour les deux préparations, la fraction  $F_4$  est plus riche en activité, mais les autres fractions n'en sont pas dépourvues, notamment la fraction  $F_2$  du surnageant pH 7,0. De plus, l'inhibition par le E-64 est presque totale dans les fractions retenues, à l'inverse des fractions  $F_1$ . Avec le substrat Z-ARG-ARG-NMec, au contraire, c'est la fraction  $F_1$  qui est dominante, et les autres fractions sont peu actives. L'inhibition par le E-64 est faible pour la fraction  $F_1$ , inefficace pour les autres fractions. On retrouve donc la différence qualitative observée en gel d'activité entre la fraction  $F_1$  et les autres fractions, et une différence quantitative entre ces fractions en particulier avec le substrat Z-PHE-ARG-NMec.

Nous avons analysé, sur la base de ces différences la fraction  $F_1$  et la fraction  $F_2$  après fractionnement en HPLC G4000 avec respectivement les substrats Z-ARG-ARG-NMec et Z-PHE-ARG-NMec à pH 6,0 (Fig. 56). Le comportement E-64 confirme les dosages précédents avec les fractions  $F_1$  peu sensibles au E-64 et les fractions  $F_2$  très sensibles. De plus, les fractions  $F_1$  se caractérisent par un pic à 30 minutes suivi d'un épaulement à 32 minutes. L'activité résiduelle E-64 sensible correspondrait plutôt au pic 30 minutes (surtout à pH 5,5). Pour les fractions  $F_2$  l'activité E-64 sensible est étalée autour de 30 minutes avec un épaulement à 25 minutes, l'activité E-64 résistante s'individualisant vers 31-32 minutes.

Là encore, par rapport aux surnageants de départ on distingue les activités E-64 sensibles et E-64 résistantes. Si on compare les profils chromatographiques à ceux des surnageants (Fig. 53), on constate que la fraction  $F_1$  correspond au profil Z-ARG-ARG-NMec qui est donc essentiellement constitué d'activité de type sérine protéase (E-64 résistante). Quand à la fraction  $F_2$ , la comparaison avec le surnageant permet d'observer que l'activité E-64 résistante a pratiquement disparu, l'activité E-64 sensible apparaissant très étalée.

ACTIVITES PEPTIDASQUES A pH 6,0  
DES FRACTIONS DE CONCAVALINE-A DES SURNAGEANTS  
pH 5,5 ET pH 7,0

|                | Z-PHE-ARG-NMec  |                           |                    | Z-ARG-ARG-NMec  |                           |                    |
|----------------|-----------------|---------------------------|--------------------|-----------------|---------------------------|--------------------|
|                | Activité<br>DTT | Activité<br>DTT<br>+ E-64 | Inhibition<br>E-64 | Activité<br>DTT | Activité<br>DTT<br>+ E-64 | Inhibition<br>E-64 |
| pH 5,5         |                 |                           |                    |                 |                           |                    |
| F <sub>1</sub> | 53,6            | 50                        | 6,6 %              | <u>100</u>      | 96,5                      | 3,5 %              |
| F <sub>2</sub> | 44,3            | 3,9                       | 91,0 %             | 5,6             | 5,6                       | 0                  |
| F <sub>3</sub> | 39,3            | 2,8                       | 93,0 %             | 3,9             | 3,9                       | 0                  |
| F <sub>4</sub> | <u>100</u>      | 4,3                       | 96,0 %             | 3,9             | 3,9                       | 0                  |
| pH 7,0         |                 |                           |                    |                 |                           |                    |
| F <sub>1</sub> | 38              | 34,9                      | 8,0 %              | <u>100</u>      | 97,7                      | 2,5 %              |
| F <sub>2</sub> | 76              | 2,6                       | 96,5 %             | 8,8             | 8,8                       | 0                  |
| F <sub>3</sub> | 38              | 1,8                       | 95,0 %             | 4,6             | 4,6                       | 0                  |
| F <sub>4</sub> | <u>100</u>      | 4,1                       | 96,0 %             | 6               | 4,2                       | 30%                |

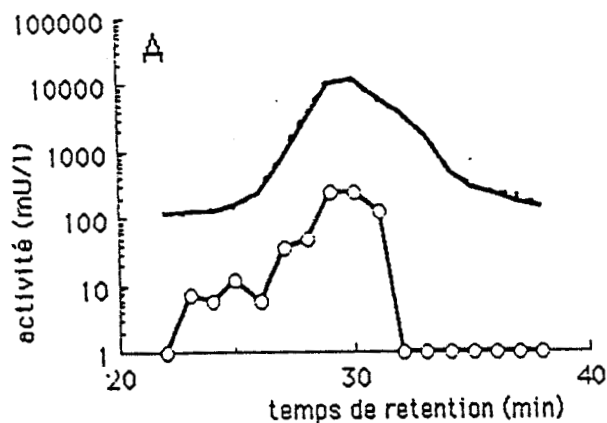
Les résultats sont rapportés en pourcentage de la valeur la plus élevée dans le test d'un surnageant donné pour un substrat donné

Tableau 9

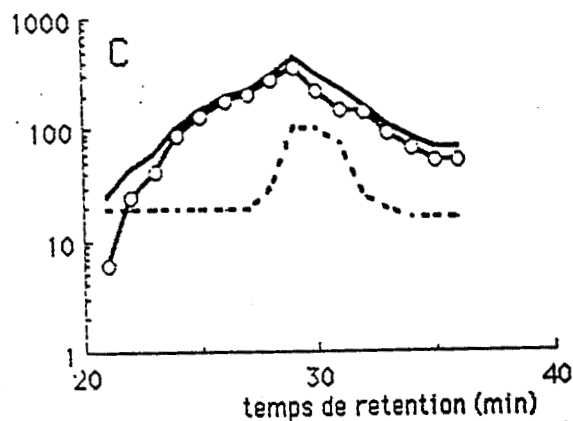
ACTIVITES PEPTIDASQUES A pH 6,0 DES FRACTIONS  
F1 et F2 de CONCAVALINE-A SEPHAROSE  
CHROMATOGRAPHIEES SUR HPLC G4000

surnageant pH 5,5

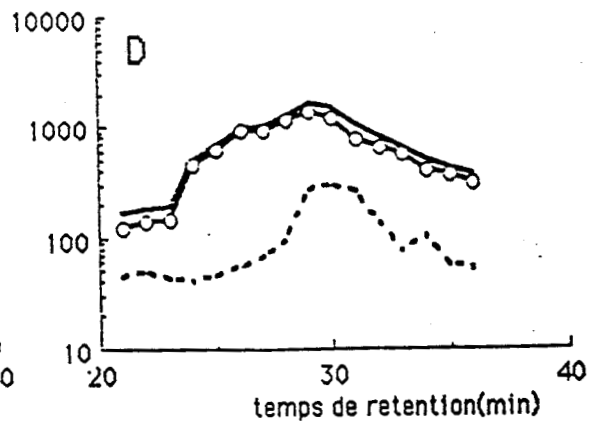
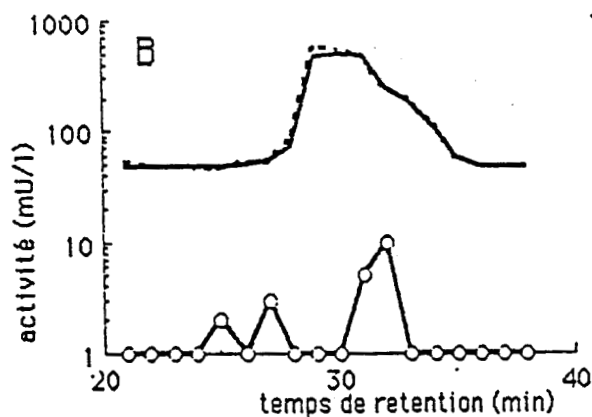
F1  
(Z-ARG-ARG-NMec)



F2  
(Z-PHE-ARG-NMec)



surnageant pH 7,0



— activité  
---- activité en présence de E-64  
—○— activité sensible au E-64

Figure 56

On peut donc dire que le surnageant comprend une activité de type sérine protéase de masse moléculaire environ 60-70 Kd, non affine pour la Concanavaline A, et des activités de type thiol protéase de masse moléculaire de 30 Kd et plus présentant des affinités différentes pour la Concanavaline-A Sépharose.

## CONCLUSION

La libération du manteau par un protocole non destructif, permet l'obtention de molécules d'activité protéolytique qui se divisent en deux "familles" : une famille non glycosylée, de type sérine-protéase, insensible au E-64 ; une famille glycosylée, co-éluee avec les antigènes de surface, de type thiol-protéase, sensible au E-64. Plusieurs questions découlent de ces résultats : quelles relations ont les enzymes glycosylées avec l'AVS ; l'action de ces enzymes se situe-t-elle au niveau du parasite ou sont-elles libérées naturellement ; lorsqu'elles sont libérées lors de la lyse chronique, sont-elles inhibées ? Avant de répondre à ces questions, il faudra envisager des purifications plus poussées de ces enzymes afin de mieux les caractériser, voire les localiser au niveau cellulaire. Leur caractérisation est cependant d'un grand intérêt, ne serait-ce que pour tester leur effet biologique éventuel au regard de l'équipement antiprotéasique de l'hôte infesté.



°00°

## CHAPITRE II

### LE MANTEAU DE SURFACE DANS LE DIALOGUE IMMUNITAIRE

°00°

## INTRODUCTION

Notre approche immunologique de la trypanosomiase africaine a été menée essentiellement sur modèle cellulaire à partir de lymphocytes de rats Sprague Dawley sains ou parasités. Ce choix a été inspiré par souci d'homogénéité, les parasites étant obtenus par multiplication sur cette même variété de rats<sup>3</sup>.

Les résultats que nous présentons se rapportent à l'étude de la réponse de cellules lymphocytaires isolées à leur stimulation par un matériel parasitaire, biochimiquement défini et représenté pour l'essentiel par l'antigène variable de surface du trypanosome.

Avant de réaliser cette étude in vitro, nous avons vérifié que les rats présentaient bien en fin d'infection chronique ou aigue, les troubles de réponse immunitaire déjà décrits par Sileghen et coll. (1987), troubles caractérisés par une baisse de la production d'interleukine-2 et par une diminution de l'expression du récepteur d'Interleukine-2.

### A. ETUDE IN VIVO

Nous avons analysé la capacité des lymphocytes de rats infestés à répondre sur le plan de leur potentiel de prolifération et sur le plan de leur possibilité de production d'Interleukine-2 (IL-2) à une sollicitation mitogénique par la Concanavaline-A (Con-A). Des rats jeunes (200 g) ont aussi été infestés par une souche aigue AnTat 1.1A, ou une souche chronique AnTat 1.1 E de Trypanosoma brucei brucei. Après respectivement 3 jours et 21 jours d'infection, les ganglions de rats parasités, en parallèle avec des ganglions de rats sains<sup>3</sup>, ont été prélevés stérilement et les lymphocytes préparés par broyage et chromatographie sur laine de nylon qui permet un enrichissement en lymphocytes T<sup>22</sup>. Les cellules ont alors été mises en cultures 48 heures à 37°C CO<sub>2</sub> 5% en présence de quantités croissantes de Con-A (0,5 µg/ml, 1 µg/ml et 2 µg/ml) dans deux conditions différentes ayant pour objectif :

a. la détermination de la prolifération lymphocytaire<sup>23</sup> : des cultures de 0,2 ml sont réalisées en microplaques de 96 puits, en situations triplées. Six heures avant la fin de la culture, une solution de thymidine tritiée est ajoutée à chaque puits. En fin de culture, le contenu des puits est récupéré, les cellules sont lavées pour éliminer le métabolite non incorporé, et leur radioactivité, représentative du taux de prolifération cellulaire, est déterminée ;

b. la détermination de la production d'IL-2<sup>24</sup> : des cultures sont réalisées en situation doublées sur des boîtes de 24 puits à raison de 1 ml par puits. En fin de culture, les cellules sont sédimentées par centrifugation douce et les surnageants sont conservés à -20°C avant le test de production. Ce test nécessite la préparation de cellules IL-2 dépendantes, à partir de lymphocytes spléniques de rat, cultivés pendant 72 heures en présence de Con-A. Dans ces conditions, on obtient une population cellulaire qui exprime le récepteur de l'IL-2. Suite à cette culture, de nombreux lavages en présence d' $\alpha$ -méthyl mannoside sont nécessaires pour éliminer la Con-A. Les cellules sont alors placées en cultures de 0,2 ml sur microplaques de 96 puits, en présence de quantités décroissantes de surnageant à tester.

Les résultats sont présentés sur les figures 57 et 58. Concernant la prolifération (Fig. 57), il apparaît clairement sur les lymphocytes de rats sains, un effet dose de la lectine, ce qui authentifie le test. La comparaison de réponse des cellules de rats infestés à celle de rats sains montre un comportement identique pour les lymphocytes de rats infestés par la souche chronique alors que pour la souche aigue, ce parallélisme ne s'observe plus à la plus forte concentration de Con-A. La production d'interleukine-2 a été déterminée pour la concentration intermédiaire de Con-A (1  $\mu$ g/ml). Nous avons représenté sur la figure 58 la réponse proliférative des cellules IL-2 dépendantes, aux différentes quantités de surnageants des cellules stimulées par la Con-A. Cette représentation montre une faible réponse des cellules aux surnageants issus de lymphocytes d'animaux infestés (traits pointillés) comparativement aux lymphocytes de rats sains (traits pleins). Il en découle que, qualitativement ou quantitativement, l'IL-2 contenue dans les surnageants des cellules d'animaux infestés, stimulés par la Con-A, est plus faible par rapport à la normale.

Notre modèle cellulaire étant donc satisfaisant, nous pouvions passer à l'étude in vitro, tout en soulignant un aspect paradoxal du résultat. En effet, on ne retrouve pas le parallèle classique entre prolifération et production, ce qui tendrait à indiquer que les cellules de rats parasités sont sensibles à la Con-A par un mécanisme IL-2 indépendant, ce qui laisserait entendre que durant l'infestation parasitaire, l'effet sur lymphocytes est important, modifiant profondément leur dynamisme de réponse.

REPONSE PROLIFERATIVE DES LYMPHOCYTES DE RATS  
SAINS (CONTROLE) ET PARASITES (INFESTATION) PAR UNE  
SOUCHE AIGUE (A) OU CHRONIQUE (B), A LA STIMULATION  
PAR LA CONCAVALINE-A

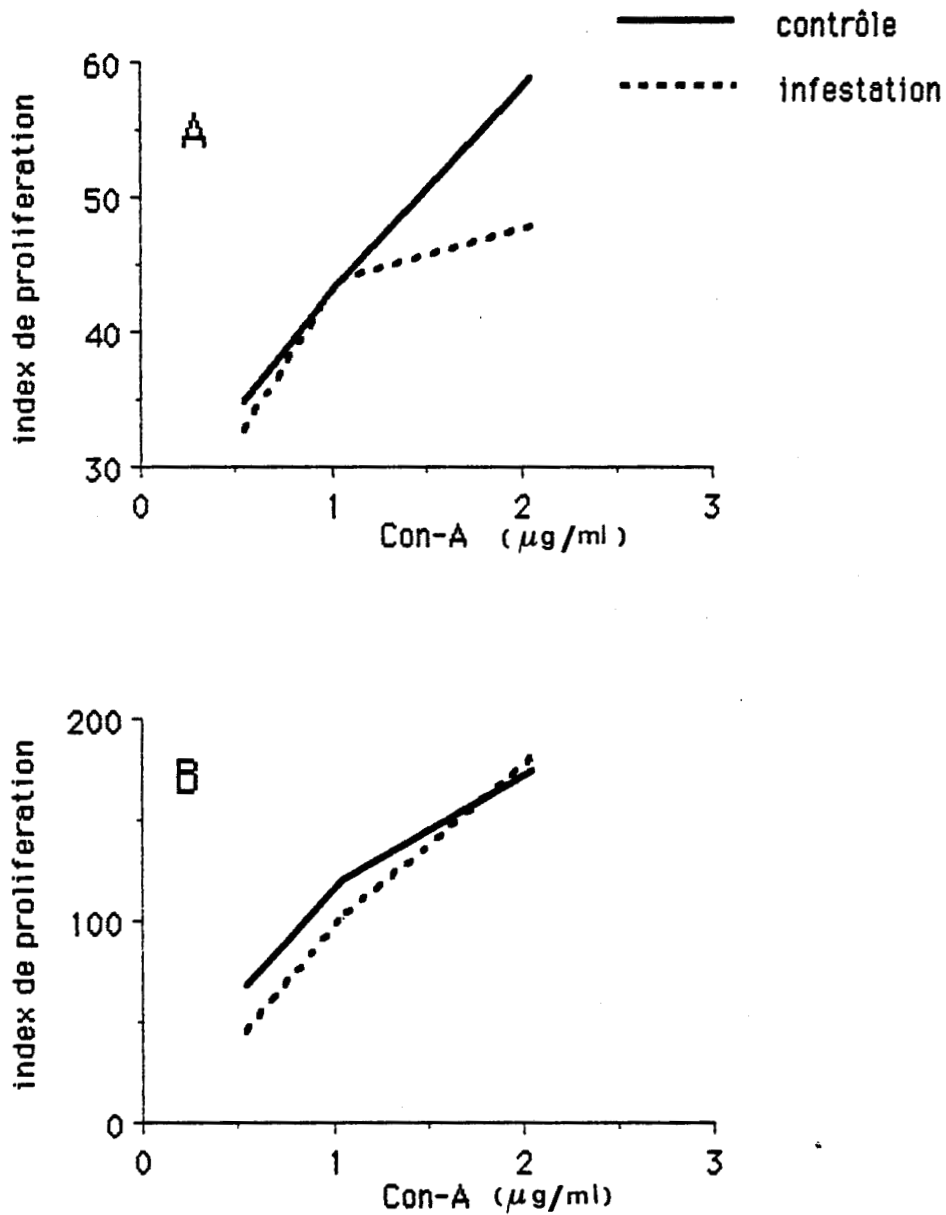


Figure 57

PRODUCTION D'IL-2

REPONSE PROLIFERATIVE DES CELLULES IL-2  
DEPENDANTES AUX SURNAGEANTS DES LYMPHOCYTES  
DE RATS SAINS ET PARASITES STIMULES PAR LA CONCAVALINE-A

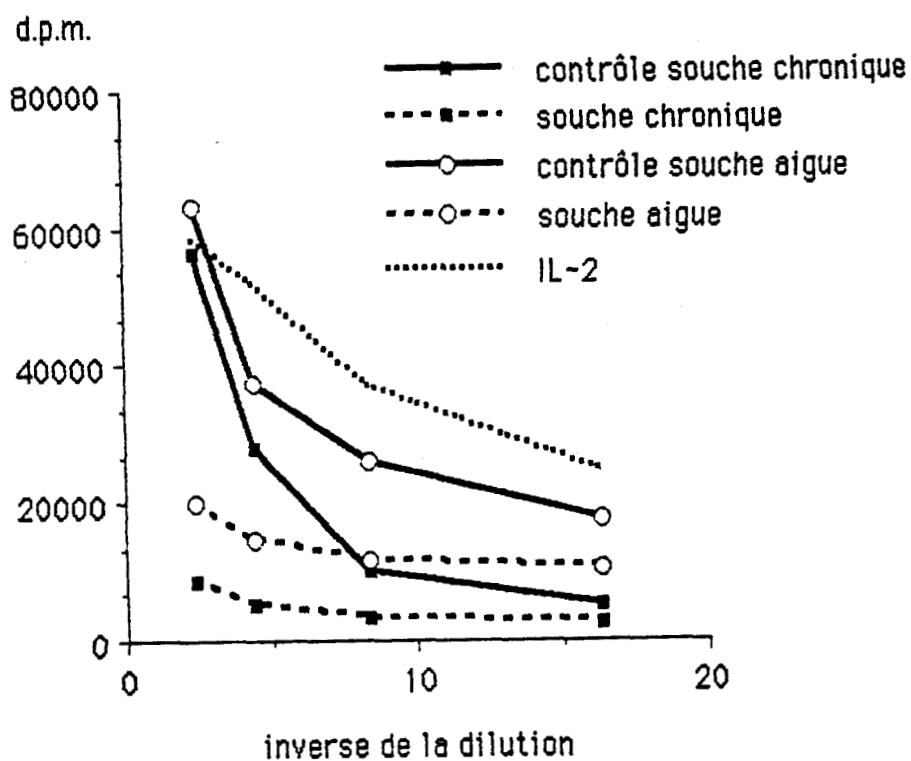


Figure 58

## B. ETUDE IN VITRO

### Introduction

L'étude in vitro de l'interaction antigène de surface parasitaire/cellules lymphocytaires a été menée sur le plan de la prolifération et de la production IL-2 par deux approches complémentaires :

#### a. analyse directe

Cette analyse nécessite l'utilisation de cellules accessoires ou/et présentatrices d'antigènes, préparées à partir de cellules thymiques de rat dont le pouvoir proliférant a été éliminé par irradiation <sup>22</sup>. Les lymphocytes T sont incubés en présence de cellules accessoires avec les différentes préparations testées, durant 48 heures.

#### b. analyse indirecte

Les lymphocytes T sont incubés durant deux heures avec les différentes préparations testées, puis un mitogène (Con-A ou PHA) est ajouté à la culture pour une incubation de 48 heures.

Les préparations utilisées, obtenues après dialyse et lyophilisation, sont reprises dans du milieu de culture contenant des antibiotiques <sup>22</sup> et diluées en cascade dans ce même milieu de manière à avoir des solutions de 2 mg/ml à 0,0312 mg/ml ce qui aboutit à des concentrations finales en culture de 200 µg/ml à 3,125 µg/ml.

### 1. Analyse directe

#### a. Prolifération (Tableau 10)

##### \* surnageants bruts

Nous avons examiné tout d'abord l'effet des surnageants de libération du manteau de surface ne contenant pas d'antiprotéases (pH 5,5 et pH 7,0), puis l'effet du surnageant pH 5,5 contenant des antiprotéases. Les résultats, exprimés en index de prolifération 
$$\left( \frac{\text{DPM des cellules stimulées}}{\text{DPM des cellules témoins}} \right)$$

montrent que les trois surnageants testés ont un effet de prolifération lymphocytaire cinq à sept fois plus élevé que les témoins pour la concentration la plus haute (200 µg/ml). De plus, l'effet stimulateur est dose dépendant pour les trois préparations. Enfin, si cet effet n'est pas dépendant de la présence initiale d'antiprotéases, il est plus important dans le surnageant pH 7,0.

# EFFET DU MATERIEL DE SURFACE PARASITAIRE SUR LA PROLIFERATION DES LYMPHOCYTES T

## 1 SURNAGEANTS

| Conc<br>(µg/ml) | sur. pH 5,5 sans<br>antiprotéases | sur. pH 5,5 avec<br>antiprotéases | sur. pH 7,0 sans<br>antiprotéases |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 200             | 5,4                               | 5                                 | 7,2                               |
| 100             | 3,2                               | 3,2                               | 4,6                               |
| 50              | 2,2                               | 2,2                               | 3,3                               |
| 25              | 2                                 | 1,9                               | 2,3                               |

## 2 FRACTIONS DE CONCAVALINE-A SEPHAROSE ET LEURS SOUS FRACTIONS.

### F<sub>1</sub> ConA :

| Conc.<br>(µg/ml) |      | sous fractions de biogel P-60 |                  |                  |                  | sous fraction d'α méthyl<br>mannoside agarose |
|------------------|------|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------------------------------------|
|                  |      | F <sub>1</sub> a              | F <sub>1</sub> b | F <sub>1</sub> c | F <sub>1</sub> d |                                               |
| 100              | 40,1 | 0,77                          | 19,6             | 3,38             | 2,68             | 3,14                                          |
| 50               | 30,1 | 1,43                          | 12,4             | 1,07             | 2,16             | 2,66                                          |
| 25               | 20,7 | 1,59                          | 3,91             | 1,2              | 1,8              | 2,22                                          |
| 12,5             | 15,5 | 1,54                          | —                | 1,44             | 1,83             | 1,98                                          |

### F<sub>2</sub> ConA :

| Conc.<br>(µg/ml) |      | sous fractions<br>de HPLC G4000 | fragments tryptiques<br>2/3Nt | 1/3Ct | sous fraction d'α méthyl<br>mannoside agarose |
|------------------|------|---------------------------------|-------------------------------|-------|-----------------------------------------------|
| 100              | 5,72 | 3,55                            | 1,72                          | 1,06  | 2,71                                          |
| 50               | 2,38 | 4,65                            | 2,64                          | 0,94  | 1,94                                          |
| 25               | 1,36 | 5,01                            | 1,3                           | 0,98  | 1,18                                          |
| 12,5             | 1,44 | 4,48                            | 1                             | 0,79  | 1,24                                          |

résultats exprimés en index de prolifération

Tableau 10

Partant de cette observation préliminaire, nous avons cherché à localiser l'effet activateur dans les différentes fractions du surnageant pH 5,5 (obtenu en présence d'antiprotéases) purifiées sur colonne de Concanavaline-A Sépharose. Ainsi il nous était possible d'apprécier le rôle éventuel de l'antigène variable dans l'immuno-régulation et ses désordres au cours de l'évolution de la trypanosomiase.

\* Matériel purifié sur Concanavaline-A Sépharose (Tableau 10)

-  $F_1$  de Con-A Sépharose

La fraction exclue de la colonne préparative montre une activité stimulatrice très élevée comparativement au surnageant brut pH 5,5 de départ, avec un index de 40 pour la concentration la plus forte (100  $\mu$ g/ml). Compte-tenu de l'hétérogénéité de cette fraction, nous avons réalisé un fractionnement sur colonne de biogel P60, et le maximum d'activité a été retrouvé dans la fraction  $F_{1b}$  qui correspond à des éléments de taille moléculaire comprise entre 18 Kd et 50 Kd. Une activité faible était caractérisée dans les fractions suivantes  $F_{1c}$  et  $F_{1d}$  (respectivement 3,38 et 2,68).

La concanavaline A, support de la purification, mais aussi agent fortement mitogène, pouvait être présente à l'état monomérique sous forme d'une protéine de masse moléculaire 30 Kd, masse moléculaire qui se situe juste dans la zone correspondant à  $F_{1b}$ . Aussi l'activité de  $F_{1b}$  pouvant être le fait d'une contamination lectinique, nous avons re-purifié la fraction  $F_1$  de Con-A sépharose sur une colonne d' $\alpha$  méthyl mannoside agarose. La fraction ( $F_1$  con-A) exclue du gel ne présente alors plus comme nous le suspicions un niveau d'activité comparable à  $F_{1b}$ . Toutefois l'activité constatée était comparable à celle d'un surnageant pH 5,5 non traité sur colonne d'affinité Con-A, ou à celle des dernières fractions issues de la colonne de biogel P60  $F_{1c}$  et  $F_{1d}$ .

Ceci laisse entendre, qu'il existe bien dans le manteau parasitaire, un ou plusieurs constituants actifs sur la prolifération lymphocytaire de faible taille moléculaire et ne possédant pas d'affinités pour la Concanavaline A. Les faibles quantités de matériel ne nous ont pas permis de les identifier.

-  $F_2$  de Con-A Sépharose

Cette fraction, qui correspond à l'AVS, a été tout particulièrement analysée, sous forme native ou après différents traitements. La  $F_2$  de Con-A native possède une activité prolifératrice, dose-dépendante, du même ordre que celle retrouvée dans le surnageant pH 5,5. Pour éliminer toute arrière pensée en rapport avec une éventuelle contamination par la Concanavaline-A, la  $F_2$



Con-A a été traitée sur colonne d' $\alpha$  méthyl mannoside agarose. Le produit obtenu,  $F'_2$  Con-A, conserve la propriété d'activer la prolifération lymphocytaire. Une analyse plus fine de l'effet biologique de cette fraction est menée par deux approches différentes :

- en sélectionnant la forme dimérique par HPLC de gel perméation.

Cette sous fraction se caractérise par une activité non dose-dépendante, élevée à concentration basse (5,01 à 25  $\mu$ g/ml). Cette réponse indépendante en première analyse de la dose pourrait être expliquée par un effet cytotoxique dû au SDS contaminant, nécessaire à la chromatographie HPLC, l'expression confirme toutefois que c'est bien la forme dimérique qui est biologiquement active ;

- en clivant la molécule par hydrolyse trypsique et en analysant les deux fractions 2/3 N-terminale, 1/3 C-terminale purifiées par chromatographie d'exclusion.

Seul le segment 2/3 N-terminal présente une activité qui est plus faible que celle de la  $F_2$ Con-A native non dose-dépendante. Ce résultat ne permet toutefois pas de tirer de conclusion définitive sur la région de l'AVS responsable de l'activité. En effet, il est possible d'évoquer la cytotoxicité du biogel contaminant mais surtout il est beaucoup plus vraisemblable d'envisager que la région "charnière" de la glycoprotéine soit importante et même indispensable à l'approche lymphocytaire.

Ces premiers résultats montrent donc clairement que dans le surnageant pH 5,5 existe au moins une structure capable de stimuler une prolifération lymphocytaire, l'AVS. Un ou plusieurs autres constituants, en faible quantité, et de faible masse moléculaire ont aussi été retrouvés dans une fraction du manteau de surface parasitaire ne présentant pas, dans notre protocole, d'affinité pour la Concanavalline-A.

#### b. Production d'IL-2

Ce test a été réalisé uniquement avec le surnageant pH 5,5 préparé en présence d'antiprotéases ainsi que sur les fractions correspondant à l'AVS ( $F_2$  Con-A,  $F'_2$  Con-A). Nous avons représenté la production d'IL-2 par les courbes de prolifération des cellules IL-2 dépendantes, production provoquée par les surnageants de lymphocytes stimulés (Fig. 59). Cette représentation permet de constater que les trois fractions testées provoquent, avec une efficacité comparable, une production d'IL-2 faible par rapport à la Con-A. Le taux de

REPONSE PROLIFERATIVE DE CELLULES IL-2  
DEPENDANTES AUX SURNAGEANTS DE LYMPHOCYTES  
DE RATS SAINS STIMULES PAR LES CONSTITUANTS  
DU MANTEAU DE SURFACE DE TRYPANOSOMES (100 $\mu$ g/ml)

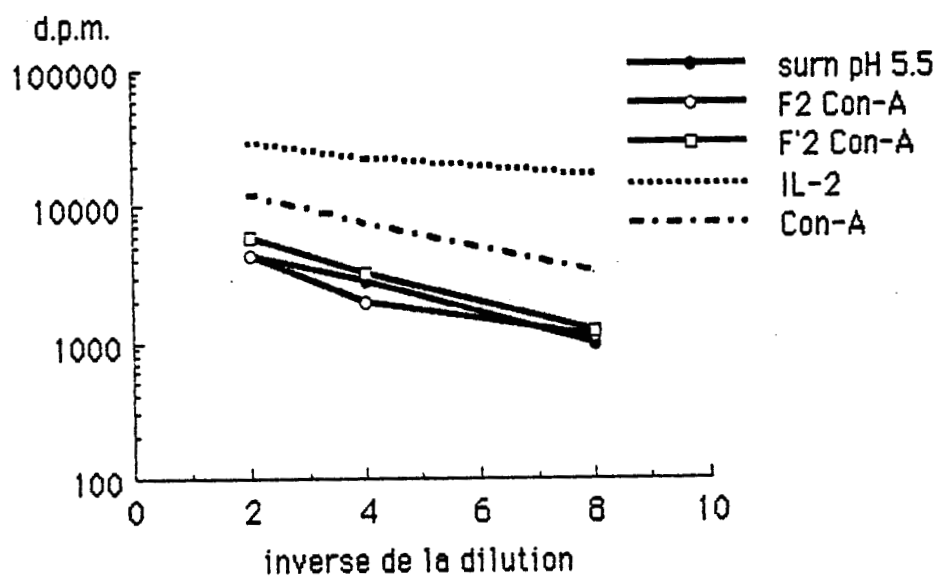


Figure 59

production calculé à partir de la gamme d'IL-2 recombinante est de l'ordre de 3 U/ml pour les trois fractions. Ce résultat confirme le faible effet de stimulation proliférante des constituants du manteau. Cependant, le fait que la production soit identique avec la  $F'_2$  Con-A et la  $F_2$  Con-A alors que cette dernière provoque une prolifération deux fois plus élevée (Tableau 10) évoque la possibilité d'un phénomène d'auto-consommation de la lymphokine par les lymphocytes producteurs. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé en prolifération (expériences réalisées en présence de cellules accessoires) et en production d'IL-2, un suivi en cinétique de 16, 48 et 72 heures (Fig. 60). Sur le plan de la prolifération, l'effet des fractions testées, ainsi que de la Con-A, à 16 heures est négligeable. Ensuite, la prolifération augmente avec le temps d'incubation. Des différences sont enregistrées entre les fractions : l'augmentation d'effet entre 48 et 72 heures est faible avec le surnageant pH 5,5 et la  $F'_2$  Con-A (augmentation d'un facteur inférieur à 2), alors qu'elle est beaucoup plus importante avec la  $F_2$  Con-A comme avec la Con-A (augmentation d'un facteur 3). La différence d'effet de  $F_2$  Con-A comparée au surnageant pH 5,5 et à la  $F'_2$  Con-A est alors amplifiée à 72 heures.

Sur le plan de la production, l'effet dépendant du temps est retrouvé mais, tout comme la Con-A, la  $F_2$  Con-A à 72 heures présente un taux faible de production relatif à la prolifération vérifiant ainsi l'hypothèse de départ. De plus, la cinétique apporte un élément essentiel pour le test IL-2 : le fait que l'on ne retrouve pas de taux d'IL-2 significatif dans les surnageants 16 heures, indique que la prolifération des cellules IL-2 dépendante à 48 et 72 heures n'est pas due à une stimulation directe par le matériel antigénique résiduel.

## 2. Analyse indirecte

Les lymphocytes ont été pré-incubés deux heures dans les conditions standard, en prolifération et en production d'IL-2, avec le matériel parasite à 100 µg/ml et en absence de cellules accessoires. Puis ont été ajoutés directement à la culture la Con-A à 2, 1 et 0,5 µg/ml ou la PHA à 4,2 et 1 µg/ml, pour une incubation de 48 heures. Cette étude a été réalisée avec le surnageant pH 5,5, la  $F_2$  Con-A et la  $F'_2$  Con-A.

### a. Prolifération

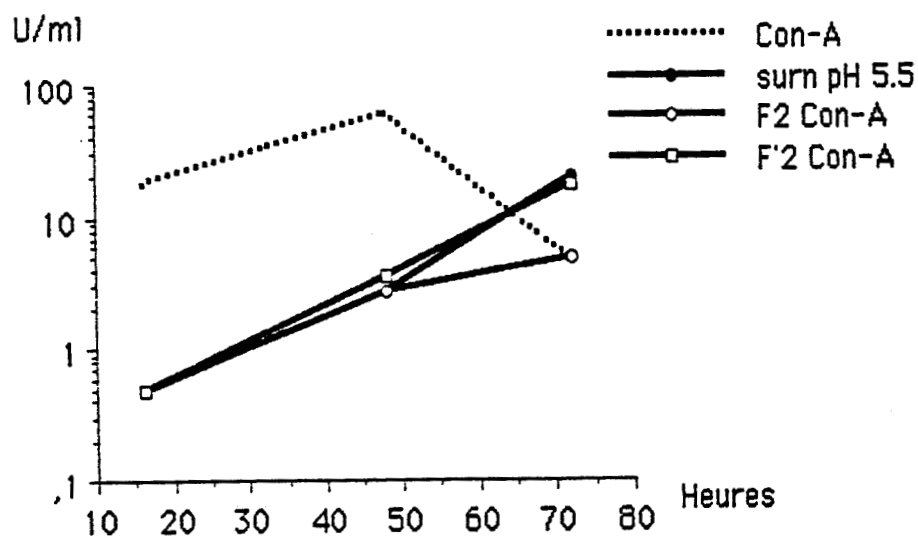
Les résultats sont représentés sous forme d'histogramme d'index de prolifération (Fig. 61 et Fig. 62), où pour chaque concentration de lectine, sont représentées successivement la réponse des cellules non pré-incubées

ETUDE EN CINETIQUE DE LA  
PROLIFERATION ET DE LA PRODUCTION D'IL-2  
PAR LES LYMPHOCYTES DE RATS STIMULES PAR LES  
CONSTITUANTS DU MANTEAU DE SURFACE (100µg/ml)

A

| PROLIFERATION*         | 16 H | 48H  | 72H  |
|------------------------|------|------|------|
| SURN pH 5,5            | 1,1  | 3,2  | 5    |
| F <sub>2</sub> Con-A   | 1,5  | 5,7  | 19,9 |
| F <sub>2</sub> ' Con A | 1,3  | 2,7  | 3,7  |
| Con A 1µg/ml           | 1,2  | 24,3 | 69   |

B PRODUCTION D'IL-2



\* résultats exprimés en index de prolifération

Figure 60

EFFET DU MATERIEL PARASITAIRE  
SUR LA PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE  
INDUITE PAR LA CONCAVALINE-A

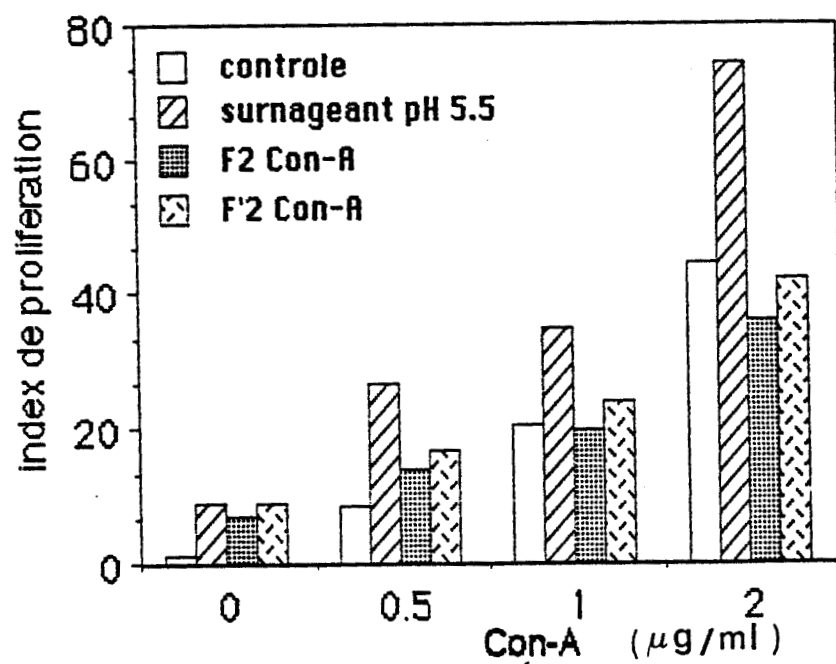


Figure 61

EFFET DU MATERIEL PARASITAIRE  
SUR LA PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE  
INDUITE PAR LA PHA

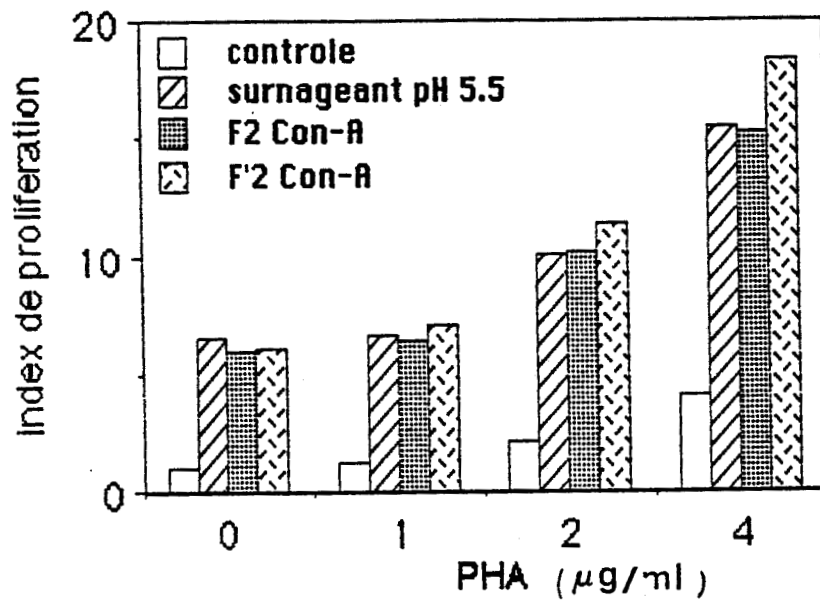


Figure 62

(contrôle), la réponse des cellules pré-incubées avec le surnageant pH 5,5, la  $F_2$  Con-A et la  $F'_2$  Con-A. Concernant la Con-A, la figure 61 montre que la réponse des cellules pré-incubées avec la  $F_2$  Con-A ou la  $F'_2$  Con-A est sensiblement au même niveau, voire plus faible ( $F_2$  Con-A) que la réponse des cellules non-préincubées. Ceci indique qu'il n'y a pas d'effet cumulatif entre la Con-A et les fractions testées. En revanche, la pré-incubation avec le surnageant pH 5,5 se traduit par une réponse supérieure à l'addition des réponses individuelles, surtout à la concentration de Con-A la plus élevée. Il en résulte donc un effet synergique du surnageant pH 5,5 sur la mitogénicité Con-A.

Concernant la PHA (Fig. 62), les trois fractions se comportent de manière identique et l'on constate que la réponse aux plus hautes concentrations de lectine des cellules pré-incubées est elle aussi augmentée par rapport aux réponses individuelles indiquant un effet synergique identique aux trois préparations sur la PHA.

#### b. Production d'IL-2

Sur le modèle lymphocyte de rats, la production d'IL-2 stimulée par la PHA est négligeable. De plus, l'étude par effet indirect étant réalisée en absence des cellules accessoires, la production d'interleukine à 48 heures stimulée par la Con-A 0,5 µg/ml ou par les fractions testées 100 µg/ml n'est pas significative. Le tableau 11 représente donc la production d'IL-2 en U/L des lymphocytes pré-incubés avec les trois fractions et stimulés par la Con-A 1 µg/ml ou 2 µg/ml. Les trois fractions ont un effet différent sur la production :

- le surnageant pH 5,5 amplifie la réponse à la Con-A (1,5 U/L à 19 U/L pour la Con-A 1 µg/ml, 22,5 à 65,5 U/L pour la Con-A 2 µg/ml) ;
- la  $F'_2$  Con-A ne modifie pas significativement la réponse ;
- la  $F_2$  Con-A inhibe la réponse à la Con-A 2 µg/ml (22,2 à 6,1 U/L).

Ce résultat est en accord avec celui de la prolifération où seul le surnageant pH 5,5 présentait un effet synergique sur les lymphocytes.

Les résultats d'effet indirect des constituants du manteau de surface parasitaire confirment que le manteau contient plusieurs éléments actifs dont l'antigène lui-même. De plus, la capacité de ces éléments à activer une stimulation (surnageant pH 5,5 par rapport à la Con-A, AVS par rapport à la PHA) ou au contraire la bloquer (AVS par rapport à la Con-A) est en faveur de l'existence de récepteurs spécifiques en surface lymphocytaire.

EFFET DU MATERIEL PARASITAIRE APRES UNE PRE-INCUBATION DES CELLULES  
SUR LA PRODUCTION D'IL-2 INDUITE PAR LA CONCAVALINE-A

|                     | ConA 1 $\mu$ g | ConA 2 $\mu$ g |
|---------------------|----------------|----------------|
| Témoin              | 1,5            | 22,2           |
| surageant pH 5,5    | 19,0           | 65,5           |
| F <sub>2</sub> ConA | 1,6            | 6,1            |
| F'2 ConA            | 2,6            | 18,7           |

- expérience réalisée en absence de cellules accessoires
- production IL-2 exprimée en U/L

Tableau 11



### c. Expression du récepteur d'IL-2

Pour compléter cette étude, une détermination de l'expression du récepteur d'IL-2 sous l'effet direct ou indirect des trois préparations parasitaires a été entreprise. En raison de l'absence de marqueur chez le rat, nous avons choisi le modèle humain en utilisant des lymphocytes périphériques mononucléés purifiés sur gradient de Ficoll <sup>25</sup>. Les cellules ont été soumises aux mêmes types de culture que celles entreprises pour la production d'IL-2, puis elles ont été incubées avec des anticorps anti CD25 marqués à la phycoerythrine (Becton Dickinson). Le tableau 12 donne le pourcentage de fluorescence spécifique déterminé sur un appareil de type EPICS. La colonne A montre que les trois préparations testées induisent avec une efficacité comparable à celle de la Con-A 2 µg l'expression du CD25. D'autre part, on voit sur la colonne B que la pré-incubation par ces préparations se traduit par des pourcentages de fluorescence du même ordre de grandeur que ceux observés avec les préparations parasitaires seules. Bien que ces résultats ne puissent être comparés aux précédents, compte-tenu de la différence du modèle, des cellules et de leur préparation, on retrouve un comportement identique de l'AVS sur les lymphocytes, AVS qui n'augmente pas l'effet stimulateur de la Con-A. Nous pouvons conclure de cette expérience que l'AVS de Trypanosoma brucei brucei AnTat 1.1, souche inoffensive pour l'homme, est capable d'induire l'expression du récepteur d'IL-2 sur les cellules lymphocytaires circulantes humaines, cette induction pouvant faire intervenir des récepteurs de la Con-A.

Nos premiers résultats mettent en évidence la propriété de stimulation de prolifération des lymphocytes T associée à l'AVS et probablement à un autre constituant du manteau de surface. En effet, nous avons calculé à partir des fractions de Concanavalline-A Sépharose, que la glycoprotéine représente environ 60% du surnageant pH 5,5. Or l'activité retrouvée dans le surnageant est dans certains cas supérieure à celle de la glycoprotéine purifiée. De plus, nous avons vu que lors des tests indirects, le surnageant pH 5,5 se singularisait dans son action vis à vis de la Con-A. Enfin, la F<sub>1</sub> Con-A, débarrassée de contamination lectinique, présente une activité résiduelle non négligeable retrouvée en fin de fractionnement sur biogel P60.

Concernant l'AVS, en dehors de son effet direct, il apparait que cette molécule est capable de modifier l'effet mitogène de la Con-A en l'atténuant, et de la PHA, en l'amplifiant. De plus, les premières approches moléculaires soulignent l'importance de la structure dimérique de la région 2/3 N-terminale de la molécule et aussi de la zone "charnière" interdomaines N- et C-terminaux.

EFFET DIRECT ET INDIRECT DU MATERIEL  
PARASITAIRE SUR L'EXPRESSION DU RECEPTEUR  
D'INTERLEUKINE-2 HUMAIN.

|                                 | A    | B    |
|---------------------------------|------|------|
| Cellules non stimulées          | 13,3 | /    |
| ConA 2 µg/ml                    | 20,0 | /    |
| Surnageant pH 5,5 100 µg/ml     | 22,9 | 21,8 |
| F <sub>2</sub> Con-A 100 µg/ml  | 21,5 | 21,8 |
| F' <sub>2</sub> Con-A 100 µg/ml | 25,9 | 25,3 |

A : Cellules stimulées directement 48 heures

B : Cellules pré-incubées 2 heures avec les préparations parasitaires, puis  
stimulées 48 heures avec la Con-A 2 µg/ml

- résultats exprimés en pourcentage de fluorescence spécifique

Tableau 12

Partant de ces observations, nous avons tenté d'illustrer les mécanismes d'interaction matériel parasitaire/ lymphocytes. Nous avons analysé l'influence des cellules accessoires et le rôle des inhibiteurs de protéases dans l'activation.

### 3. Rôle des cellules accessoires

Ont été menés en parallèle un test de prolifération et un test de production d'IL-2 par effet direct en 48 et 72 heures avec et sans cellules accessoires.

#### a. Prolifération

Les résultats présentés dans le tableau 13, sont exprimés par la moyenne et l'écart-type des index de prolifération des triplets. Les deux conditions (+ cellules accessoires) sont comparées par le test de différence couplée statistique (test t de Student) <sup>26</sup>. A 48 heures d'incubation, la présence de cellules accessoires provoque une diminution significative de réponse des lymphocytes T du surnageant pH 5,5 ( $5,4 \pm 0,598$  au lieu de  $9,45 \pm 0,792$ ) et à la  $F'_2$  Con-A ( $2,71 \pm 0,228$  au lieu de  $4,45 \pm 0,650$ ) alors que la réponse à la  $F_2$  Con-A n'est pas modifiée. A 72 heures d'incubation, on retrouve un comportement original de la  $F_2$  Con-A qui est la seule préparation à avoir son effet modifié par la présence de cellules accessoires, effet qui est amplifié ( $19,91 \pm 3,216$  au lieu de  $6,43 \pm 1,134$ ). La comparaison avec l'effet de la Con-A montre que la lectine est plus activée en présence de cellules accessoires à 48 heures ( $24,33 \pm 0,995$  au lieu de  $15,48 \pm 2,1$ ) et à 72 heures ( $69,34 \pm 2,004$  au lieu de  $24,99 \pm 3,999$ ). On voit donc que pour un composé très actif comme la Con-A, les cellules accessoires amplifient la réponse même à 48 heures. Pour des composés moins actifs ( $F_2$ Con-A) cette amplification visible à 72 heures, se traduit à 48 heures, comparativement aux deux autres fractions, par un rétablissement de la réponse sans cellules accessoires. Ce résultat est un argument en faveur de la contamination lectinique dans la fraction  $F_2$  Con-A qui masque à 48 heures l'effet atténuant des cellules accessoires. Cette notion nous était déjà acquise par une approche expérimentale précédente.

#### b. Production d'IL-2

En production d'IL-2, nous avons représenté sur la figure 60 la production en présence de cellules accessoires. En leur absence, la production n'est quantifiable qu'à 72 heures et uniquement avec le surnageant pH 5,5 (5 U/ml) et la fraction  $F'_2$ Con-A (3,2 U/ml), l'absence de production avec la fraction  $F_2$  Con-A confirmant la baisse observée en présence de cellules accessoires.

INFLUENCE DES CELLULES ACCESSOIRES  
SUR L'EFFET ACTIVATEUR DE LA PROLIFERATION  
LYMPHOCYTAIRE DES PREPARATIONS PARASITAIRES

|                       |        | sans cellules<br>accessoires |   |       | avec cellules<br>accessoires |   |       |         |
|-----------------------|--------|------------------------------|---|-------|------------------------------|---|-------|---------|
| Con-A                 | 0.2 µg | 15.48                        | + | 2.1   | 24.33                        | + | 0.995 | S       |
| surnageant<br>pH 5,5  | 40 µg  | 9.45                         | + | 0.792 | 5.4                          | + | 0.598 | S       |
|                       | 20 µg  | 6.13                         | + | 0.934 | 3.21                         | + | 0.362 | S       |
|                       | 10 µg  | 3.55                         | + | 0.229 | 2.17                         | + | 0.183 | S       |
|                       | 5 µg   | 2.72                         | - | 0.258 | 1.97                         | - | 0.188 | S       |
| F <sub>2</sub> Con-A  | 20 µg  | 5.88                         | + | 1.261 | 5.72                         | + | 0.685 | NS      |
|                       | 10 µg  | 2.63                         | + | 0.395 | 2.98                         | + | 0.227 | NS 48 H |
|                       | 5 µg   | 1.3                          | + | 0.081 | 1.36                         | + | 0.030 | NS      |
|                       | 2.5 µg | 1.33                         | - | 0.290 | 1.44                         | - | 0.170 | NS      |
| F' <sub>2</sub> Con-A | 20 µg  | 4.45                         | + | 0.650 | 2.71                         | + | 0.228 | S       |
|                       | 10 µg  | 2.66                         | + | 0.142 | 1.94                         | + | 0.336 | S       |
|                       | 5 µg   | 1.09                         | + | 0.221 | 1.18                         | + | 0.185 | S       |
|                       | 2.5 µg | 1.25                         | - | 0.295 | 1.24                         | - | 0.147 | NS      |
| Con-A                 | 0.2 µg | 24.99                        | + | 3.999 | 69.34                        | + | 2.004 | S       |
| Surnageant<br>pH 5,5  | 40 µg  | 8.05                         | + | 2.478 | 8.63                         | + | 0.754 | NS      |
|                       | 20 µg  | 4.77                         | + | 1.825 | 5.03                         | + | 0.057 | NS      |
|                       | 10 µg  | 3.16                         | + | 1.217 | 3.85                         | + | 0.305 | NS      |
|                       | 5 µg   | 2.69                         | - | 0.280 | 2.68                         | - | 0.205 | NS      |
| F <sub>2</sub> Con-A  | 20 µg  | 6.43                         | + | 1.134 | 19.91                        | + | 3.216 | S       |
|                       | 10 µg  | 2.8                          | + | 1.084 | 5.3                          | + | 0.704 | S       |
|                       | 5 µg   | 1.38                         | + | 0.202 | 2.56                         | + | 0.302 | S 72 H  |
|                       | 2.5 µg | 0.91                         | - | 0.2   | 1.99                         | - | 0.221 | S       |
| F' <sub>2</sub> Con-A | 20 µg  | 3.72                         | + | 1.198 | 3.69                         | + | 0.290 | NS      |
|                       | 10 µg  | 2.41                         | + | 0.577 | 2.94                         | + | 0.177 | NS      |
|                       | 5 µg   | 1.61                         | + | 0.140 | 1.83                         | + | 0.135 | NS      |
|                       | 2.5 µg | 1.1                          | - | 0.282 | 2                            | - | 0.14  | S       |

- résultats exprimés en moyenne d'index de prolifération de triplets  $\pm$  l'écart-type

S : différence significative P<0,05  
NS : différence non significative

Tableau 13

Il apparait de cette étude comparative, que les fractions testées ont un effet mitogénique différent de l'effet produit par un mitogène usuel comme la Con-A. De plus, on retrouve une absence de corrélation entre production d'IL-2 (cellules accessoires-dépendantes) et prolifération (cellules accessoires indépendantes) confortant notre hypothèse déjà exprimée d'un mécanisme stimulateur IL-2 indépendant.

#### 4. Inhibiteurs de protéases

Nous avons vu dans le tableau 10 que l'activité sur lymphocytes du surnageant pH 5,5 ne dépend pas du fait que la préparation soit préparée en présence ou non d'antiprotéases. Ceci indique que ces antiprotéases n'interviennent pas au niveau cellulaire et que l'intégrité structurale n'est pas un critère essentiel.

Nous avons vu aussi dans ce même tableau, que l'AVS dimérique purifié était très actif alors que les fragments tryptiques perdaient en activité.

Partant de ces résultats contradictoires, et sachant que le surnageant pH 5,5 présentait un certain degré de dégradation par protéolyse, nous avons comparé l'effet de stimulation de la fraction  $F'_2$  Con-A préparée en présence ou sans antiprotéases. Le tableau 14 présente la comparaison des index de prolifération des lymphocytes T stimulés par les deux types de préparation en présence ou non de cellules accessoires. En absence de cellules accessoires, les deux fractions ont un comportement comparable bien que l'absence d'antiprotéases donne des résultats un peu plus faibles. En présence de cellules accessoires le résultat est différent : la fraction préparée sans inhibiteur de protéases est beaucoup plus active que la fraction classique, surtout à forte concentration. Ce résultat est assez contradictoire avec les précédents et on peut se demander s'il n'existe pas dans la préparation une entité enzymatique associée à l'AVS, susceptible d'agir directement, ou si on est en présence de fragments issus de la protéolyse et très actifs.

INFLUENCE DES ANTIPROTEASES  
SUR L'EFFET MITOGENE DE  
LA FRACTION F'2 Con-A.

|            | sans cellules accessoires |                 | avec cellules accessoires |                  |
|------------|---------------------------|-----------------|---------------------------|------------------|
|            | +                         | -               | +                         | -                |
| 100 µg/ml  | 3,88 $\pm$ 0,77           | 3,26 $\pm$ 0,47 | 3,14 $\pm$ 0,65           | 12,00 $\pm$ 0,56 |
| 50 µg/ml   | 3,04 $\pm$ 0,11           | 1,34 $\pm$ 0,22 | 2,45 $\pm$ 0,01           | 4,96 $\pm$ 0,47  |
| 25 µg/ml   | 2,27 $\pm$ 1,5            | 1,15 $\pm$ 0,19 | 2,12 $\pm$ 1,45           | 1,85 $\pm$ 0,22  |
| 12,5 µg/ml | 1,86 $\pm$ 0,28           | 1,26 $\pm$ 0,35 | 1,69 $\pm$ 0,07           | 1,10 $\pm$ 0,15  |

résultats exprimés en moyenne des index de prolifération  $\pm$  l'écart type  
+ préparation en présence d'antiprotéases  
- préparation en absence d'antiprotéases

Tableau 14

## CONCLUSION

De l'ensemble de ces résultats, il faut retenir que l'activation du système lymphocytaire par le manteau de surface du trypanosome fait intervenir des mécanismes IL-2 dépendants et IL-2 indépendants, IL-1 dépendants et IL-1 indépendants où l'AVS serait l'élément essentiel, et utiliserait des récepteurs spécifiques.

D'un point de vue structural, il semblerait que plusieurs parties de la molécule soient impliquées dans cette activité biologique car si la structure dimérique est active, la région 2/3 N-terminale préparée par coupure trypsique l'est mais plus faiblement, alors que les fractions protéolysées par les enzymes parasitaires le sont davantage. On a vu dans le chapitre 1 que les fragments d'AVS préparés en absence d'antiprotéases se caractérisent par des masses moléculaires plus élevées que celles des produits trypsiques "artificiels". Il semblerait donc que des coupures ou des remaniements moléculaires fassent apparaître ou permettent une meilleure présentation des sites actifs de l'antigène variable.

°00°

### CHAPITRE III

ROLE DU MATERIEL DE SURFACE PARASITAIRE

DANS LES DESEQUILIBRES ENDOCRINIENS

°00°



## INTRODUCTION

Les déséquilibres endocriniens et en particulier les états d'hypogonadisme chez le sujet trypanosomé sont maintenant parfaitement établis tant chez l'homme que chez le modèle animal (Hublart, Thèse 1989). Parmi les mécanismes évoqués pour expliquer l'apparition de ces anomalies sont actuellement retenus

1) la dégradation possible par attaque enzymatique des stimulines hypophysaires,

2) le rôle direct ou indirect de constituants protéiques ou glycoprotéiques de surface du trypanosome sur l'axe hypothalamo-hypophysogonadotrope.

Au même titre que les désordres immunitaires, les hypogonadismes seraient donc la traduction classique du dialogue hôte-parasite.

Par des approches expérimentales chez le rat menées in vivo et in vitro à l'aide de souches de Trypanosoma brucei brucei nous avons tenté de démontrer l'intérêt de ces hypothèses.

### A. ETUDE IN VIVO

Chez le rat ont été injectés des préparations de surnageant pH 5,5 des culots parasitaires résiduels obtenus sans addition d'antiprotéases au cours du protocole préparatif, ainsi que des fractions d'antigène variable purifiées sur Concanavalline-A Sépharose à partir de surnageant pH 5,5 cette fois préparé en présence d'antiprotéases. Pour juger et suivre l'effet biologique, la testostérone, la LH sérique et la LH hypophysaire ont été dosées par dosage radioimmunologique<sup>27</sup>.

#### 1. Etude des dysfonctions endocriniennes provoquées par l'injection in vivo de matériel trypanosomal obtenu sans antiprotéases

##### a. Protocole expérimental

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

Le culot parasitaire (culot pH 5,5) est inoculé à 6 autres rats sous un même volume.

Ainsi, chaque rat reçoit un matériel équivalent à une parasitémie maximale 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 5 ml de tampon phosphate PBS<sup>3</sup> pH 7,2.

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

#### 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 le tampon PBS (tableau 15).

##### b-1. Testostérone

L'effet du culot parasitaire conduit à une diminution nette de la testostéronémie. La valeur moyenne de  $2,10 \pm 0,57$  µg/ml pour les animaux témoins passe à  $0,56 \pm 0,21$  µg/ml pour les animaux tests.

La baisse de la testostéronémie est significative à  $p < 0,05$ .

##### b-2. 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 de  $23 \pm 4,3$  ng/ml.

Parmi les 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 de 2 observations, les résultats laissent apparaître des différences significatives entre animaux testés et animaux témoins (respectivement  $9,4 \pm 4,2$  ng/ml contre  $23 \pm 4,3$  ng/ml).

Cette diminution de la 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 proportionnalité entre la valeur de LH sérique et celle de la testostérone. Si l'on

- 148 -  
 DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DES HORMONES GONADOTROPES  
 (TESTOSTERONE, LH SERIQUE, LH HYPOPHYSAIRE) CHEZ  
 LES ANIMAUX TEMOINS (PBS pH 7,25) ET CHEZ LES  
 ANIMAUX INOCULES AVEC LE CULOT pH 5,5 SANS  
 ANTIPROTEASES

| Rats témoins inoculés avec le tampon PBS              |                                      |                                                |                                  |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------|
| Rats                                                  | TESTOSTERONE<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | LH HYPOPHYSAIRE<br>( $\mu\text{g/hypophyse}$ ) | LH SERIQUE<br>( $\text{ng/ml}$ ) |
| 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<br>$\pm 0,57$                   | 149,30<br>$\pm 19,7$                           | 23,0<br>$\pm 4,3$                |
| Rats inoculés avec le culot pH 5,5 sans antiprotéases |                                      |                                                |                                  |
| Rats                                                  | TESTOSTERONE<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | LH HYPOPHYSAIRE<br>( $\mu\text{g/hypophyse}$ ) | LH SERIQUE<br>( $\text{ng/ml}$ ) |
| 1                                                     | 0,38                                 |                                                | 24                               |
| 2                                                     | 2,6                                  | 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<br>$\pm 0,21$                   | 248,80<br>$\pm 48,8$                           | 9,42<br>$\pm 4,2$                |
| PROBA-<br>BILITE                                      | $p < 0,05$<br>signif,                | $p < 0,05$<br>signif,                          | $p < 0,05$<br>signif,            |

Tableau 15

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

#### \* LH hypophysaire

Chez les animaux infestés témoins le taux moyen de LH hypophysaire est de  $149,3 \pm 19,7$   $\mu\text{g/hypophyse}$ . Après action du culot parasite pH 5,5, cette valeur s'élève à  $248,8 \pm 48,8$   $\mu\text{g/hypophyse}$ , cette augmentation est significative ( $p < 0,05$ ).

Ainsi après 5 heures de stimulation par le culot parasite 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 antéhypophysaire.

L'effet du 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 16.

##### c-1. 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  $1,20 \pm 0,36$   $\mu\text{g/ml}$  contre  $0,74 \pm 0,13$   $\mu\text{g/ml}$  pour la série témoin.

##### c-2. Hormone luteinisante

#### \* LH sérique

Le taux moyen de LH circulante passe de  $21,8 \pm 2,3$   $\text{ng/ml}$  pour la série témoin à  $18,5 \pm 5,9$   $\text{ng/ml}$  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  $\text{ng/ml}$  qui comparativement à la série témoin se situent au delà de la limite supérieure normale dosée à 28  $\text{ng/ml}$ .

DOSAGES RADIOIMMUNOLOGIQUES DES HORMONES GONADOTROPES  
(TESTOSTERONE, LH SERIQUE, LH HYPOPHYSAIRE) CHEZ  
LES ANIMAUX TEMOINS (TAMPON pH 5,5) ET CHEZ LES  
ANIMAUX INOCULES AVEC L'EXTRAIT ANTIGENIQUE pH 5,5 SANS  
ANTIPROTEASES

| Rats témoins inoculés avec le tampon pH 5,5         |                                      |                                                |                                  |                      |                   |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------|-------------------|
| Rats                                                | TESTOSTERONE<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | LH HYPOPHYSAIRE<br>( $\mu\text{g/hypophyse}$ ) | LH SERIQUE<br>( $\text{ng/ml}$ ) |                      |                   |
| 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<br>$\pm 0,13$                   | 189,8<br>$\pm 20,1$                            | 21,83<br>$\pm 2,3$               |                      |                   |
| Rats inoculés avec le surnageant antigénique pH 5,5 |                                      |                                                |                                  |                      |                   |
| Rats                                                | TESTOSTERONE<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | LH HYPOPHYSAIRE<br>( $\mu\text{g/hypophyse}$ ) | LH SERIQUE<br>( $\text{ng/ml}$ ) |                      |                   |
| 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<br>$\pm 0,36$                   | 229,33<br>$\pm 22,44$                          | 210,5<br>$\pm 28,7$              | 18,58<br>$\pm 5,9$   | 9,8<br>$\pm 3,6$  |
| PROBA-<br>BILITE                                    | p<0,1<br>non signif,                 | p<0,05<br>signif,                              | p<0,05<br>signif,                | p>0,1<br>non signif, | p<0,05<br>signif, |

Tableau 16

- 4 animaux ont des taux beaucoup plus faibles passant de 17 ng/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  $9,8 \pm 3,6$  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.

#### \* LH hypophysaire

Les taux de LH 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  $210,5 \pm 28,7$  µg/hypophyse par rapport à  $189,8 \pm 20,1$  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 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 dont l'essentiel se résume au fait que le culot parasite entraîne rapidement une altération de la fonction gonadique alors que l'effet du surnageant antigénique a un effet du même ordre mais plus nuancé.

Nous avons recherché si l'antigène variable de surface, élément constitutif majeur du manteau préparé en présence d'antiprotéase pouvait jouer un rôle.

## 2. Etude de la fonction gonadique après injection de fractions antigéniques purifiées

### a. Protocole expérimental

Six rats mâles âgés de 10 mois ont été inoculés par un mélange des 3 fractions ( $F_2$ ,  $F_3$ ,  $F_4$ ), en respectant le mieux possible les proportions de chaque fraction.

Ainsi une solution de :

- 30 mg de  $F_2$
- 30 mg de  $F_3$
- 50 mg de  $F_4$

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, de 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. L'hypophyse également prélevée est utilisée pour le dosage de la LH hypophysaire.

### b. 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 17.

#### b-1. 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  $\mu\text{g/ml}$  alors que l'intervalle normal de testostérone relevé dans la série d'animaux témoins se situe entre 1,02 et 2,35  $\mu\text{g/ml}$ .

La valeur moyenne chute de  $1,52 \pm 0,24 \mu\text{g/ml}$  pour les animaux témoins à  $0,31 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$  pour les animaux infestés. Cette diminution importante de la testostérone 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.

DOSAGES RADIOIMMUNOLOGIQUES DES HORMONES  
GONADOTROPES DES RATS TEMOINS (TAMPON pH 5,5)  
ET DES RATS INOCULES AVEC LES FRACTIONS  
ANTIGENIQUES PURIFIEES

| Rats témoins                                  |                                      |                                                |                                  |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------|
| Rats                                          | TESTOSTERONE<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | LH HYPOPHYSAIRE<br>( $\mu\text{g/hypophyse}$ ) | LH SERIQUE<br>( $\text{ng/ml}$ ) |
| 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<br>$\pm 0,24$                   | 224,3<br>$\pm 24,2$                            | 25,8<br>$\pm 1,8$                |
| Rats inoculés avec avec $F_2$ , $F_3$ , $F_4$ |                                      |                                                |                                  |
| Rats                                          | TESTOSTERONE<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | LH HYPOPHYSAIRE<br>( $\mu\text{g/hypophyse}$ ) | LH SERIQUE<br>( $\text{ng/ml}$ ) |
| 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                                 | 121,6                                          | 11,6                             |
| 6                                             | 0,34                                 | 161,2                                          | -                                |
| MOYENNE                                       | 0,31<br>$\pm 0,08$                   | 148,3<br>$\pm 9,5$                             | 19,3<br>$\pm 5,5$                |
| PROBA-<br>BILITE                              | $p < 0,01$<br>signif,                | $p < 0,05$<br>signif,                          | $p > 0,05$<br>non signif,        |

Tableau 17



## b-2. Hormone lutéinisante

### \* LH sérique

Les taux de LH sérique de référence dosés chez les animaux témoins sont de l'ordre de 20 à 30 ng/ml (moyenne =  $25,8 \pm 1,8$  ng/ml). Après injection des fractions purifiées d'antigène variable, une diminution (significative,  $p < 0,01$ , pour 3 animaux de la série expérimentale) de la LH sérique ( $10,4 \pm 1,9$  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 :

- une reconnaissance directe de l'antigène de surface du trypanosome par les récepteurs testiculaires de gonadostimulines ;
- une reconnaissance directe de l'antigène de surface par d'autres récepteurs à l'origine d'un système de contrôle négatif testiculaire.

### \* LH 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  $224,3 \pm 24,2$  µg chez les animaux témoins à  $148,3 \pm 9,5$  µg 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 Concanavalline-A Sépharose en quantité correspondant à 4 fois la parasitémie d'un rat provoque un déficit hormonal qui se traduit principalement par une baisse nette des taux de testostérone sérique et de LH hypophysaire avec une LH circulante apparemment conservée.

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 synthèse antéhypophysaire de LH, sans modification sensible des taux de LH sérique qui demeurent en valeur limite normale,

- une action directe de l'extrait antigénique brut (surnageant pH 5,5) et du culot parasite (culot pH 5,5) préparés en l'absence d'inhibiteurs de protéases sur l'hormone lutéinisante circulante, mettant en évidence l'intervention probable de protéases parasitaires.

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.

## B. ETUDE IN VITRO

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

### 1. Protocole expérimental

Le marquage de la stimuline hypophysaire (NIDDK - LH17) à l'iode <sup>125</sup>I (IMS-30 Amersham) (fournie par le laboratoire du Pr JUTISZ, Laboratoire CNRS des hormones polypeptidiques 91198 Gif sur Yvette) a été effectué selon la technique décrite par Greenwood et coll (1963).

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 de l'AVS 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 <sup>125</sup>I est suivi en SDS PAGE puis révélé par autoradiographie.

## 2. Etude électrophorétique de l'hormone lutéinisante de rat marquée à $^{125}\text{I}$

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

Le comportement électrophorétique de l'hormone marquée montre après autoradiographie du gel, 2 bandes radioactives :

- une bande représentative de la LH native de taille moléculaire apparente (Mr) 30 Kd
- une bande de plus faible taille (Mr = 14 Kd) correspondant à la sous unité  $\alpha$  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  $\alpha$ , (Fig. 63).

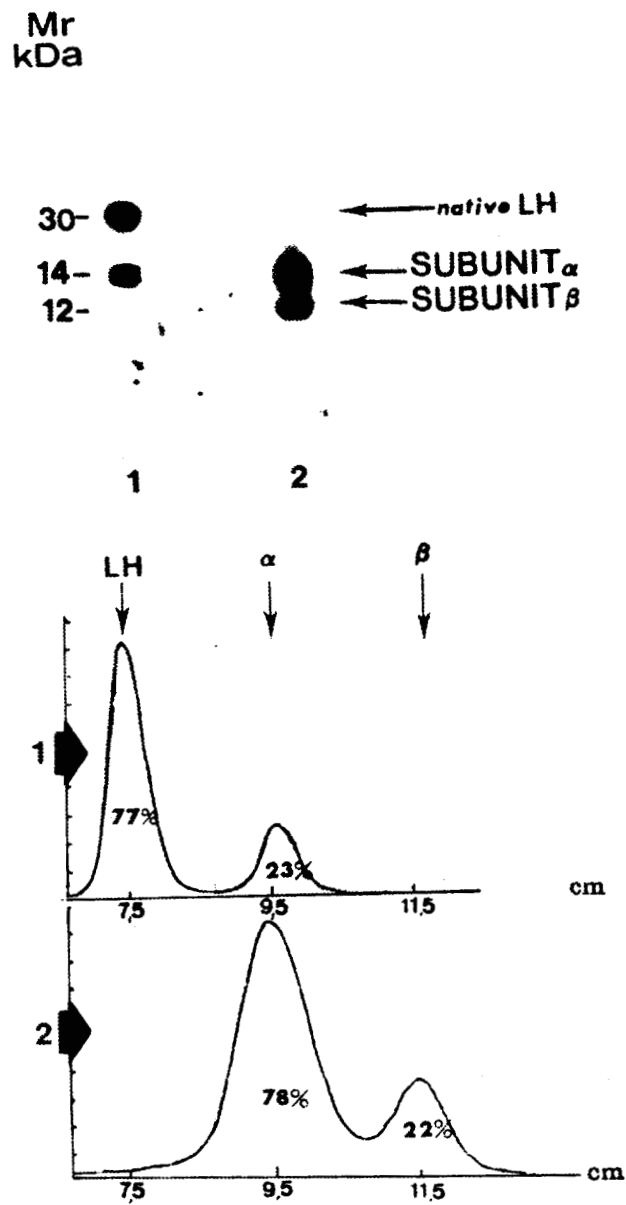
Rappelons que la LH est une association de sous-unités élémentaires  $\alpha$  et  $\beta$  par interactions non covalentes. Le traitement de l'hormone : 5 minutes à 100°C en milieu réducteur et en conditions dissociantes selon Krummen et Baldwin (1988) (tampon Tris HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 6%,  $\beta$  mercaptoéthanol 10%) la sépare en effet en ses deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  qui en masse moléculaires apparentes se situent respectivement à 18 kd et 13 kd daltons. L'intégration densitométrique du profil électrophorétique de l'hormone totalement dissociée fait apparaître un marquage nettement prédominant au niveau de la sous unité  $\alpha$  78% contre 22% au niveau de la sous-unité  $\beta$ .

On comprend donc que la préparation de LH que nous avons pu utiliser était en partie dissociée et que le rapport relatif d'iode  $^{125}\text{I}$  au niveau des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  ne permet pas la caractérisation de la sous-unité  $\beta$  sur une étude directe (Fig. 63).

Ainsi, la préparation de LH  $^{125}\text{I}$  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 de préparations trypanosomales préparées en l'absence ou en 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  $80 \text{ à } 130 \cdot 10^6$  cellules soumises au choc isoosmotique (tampon phosphate pH 5,5).

PROFIL ELECTROPHORETIQUE DE LA LH MARQUEE



A - Autoradiographie

B - enregistrement densitométrique des profils

1 LH reprise dans le tampon -βME

2 LH reprise dans le tampon +βME

Figure 63

La cinétique était réalisée à 37°C sur un échantillon de LH <sup>125</sup>I correspondant à 440 000 cpm. Les prélèvements ont été effectués après 30 minutes, 2 heures et 6 heures. Sur chaque aliquot, 20 000 cpm ont été prélevés et analysés en SDS-PAGE.

### 3. 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 un choc isoosmotique à pH 5,5 en présence ou en absence d'antiprotéases. Aucune modification de la répartition de radioactivité (forme native, sous-unité  $\alpha$ ) n'est observée au cours de la cinétique, 30 minutes, 2 heures et 6 heures (Fig. 64).

#### a. Effet d'un culot parasitaire pH 5,5 préparé en présence d'antiprotéases

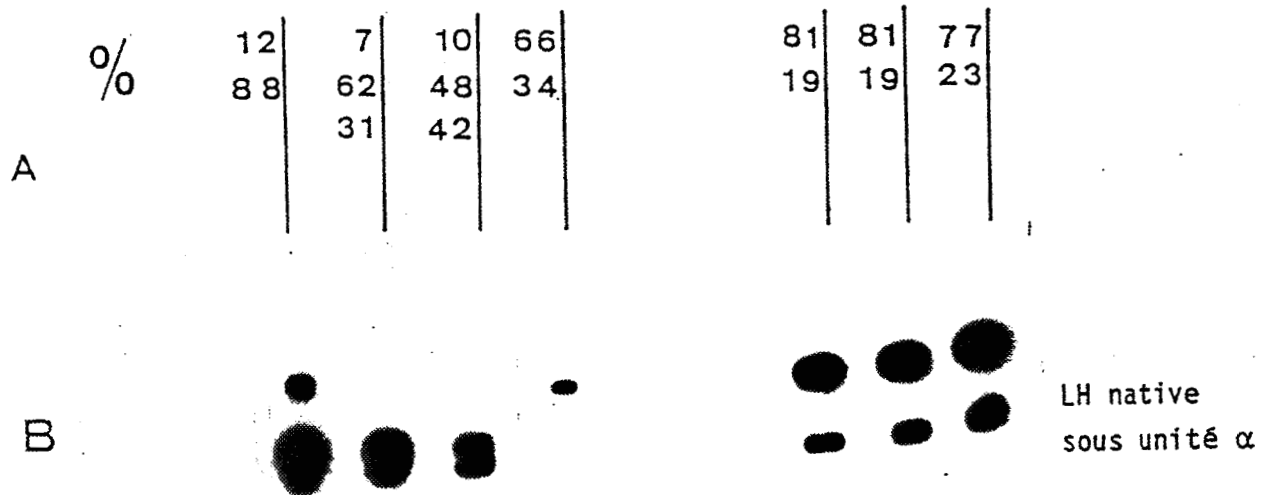
Dès 30 minutes d'incubation, on observe (Fig. 64), une diminution de la radioactivité de l'hormone native (12%) au profit des deux sous-unités libres  $\alpha$  et  $\beta$  qui totalisent près de 88% de la radioactivité du matériel déposé. Après 2 heures de cinétique, la forme dimère de la LH tend à disparaître (7%) alors que s'intensifie le marquage de la sous-unité  $\alpha$  (62%) et de la sous-unité  $\beta$  (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  $\alpha$  (48%) alors que la bande radioactive correspondant à la sous-unité  $\beta$  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  $\alpha$  qui met en évidence un processus de dégradation alors que la sous-unité  $\beta$  n'est pratiquement pas affectée.

#### b. Effet d'un culot parasitaire pH 5,5 préparé en absence d'antiprotéases

La protéolyse du matériel hormonal radioactif illustré par la figure 64 est très rapide. Après 30 minutes, l'hormone native ainsi que la sous-unité  $\alpha$  sont à peine visibles en électrophorèse. Avec des incubations prolongées (2 heures puis 6 heures), tout le matériel hormonal radioactif est dégradé.

PROFIL ELECTROPHORETIQUE DE LA LH MARQUEE AU  
COURS DE LA CINETIQUE D'INCUBATION EN PRESENCE D'UN  
CULOT RESIDUEL pH 5,5 AVEC OU SANS ANTIPROTEASES ( +AP )



A répartition de la radioactivité  
B autoradiographie

tampon de reprise d'échantillons - $\beta$ ME

+ AP : avec antiprotéases

- AP : sans antiprotéases

T : Témoin

1 : 30 minutes

2 : 2 heures

3 : 6 heures

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  $\alpha$  et  $\beta$ .

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  $\alpha$ . Sans préjugé 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.

#### 4. 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 (Fig. 65).

##### a. Effet d'un surnageant pH 5,5 préparé en présence d'antiprotéases

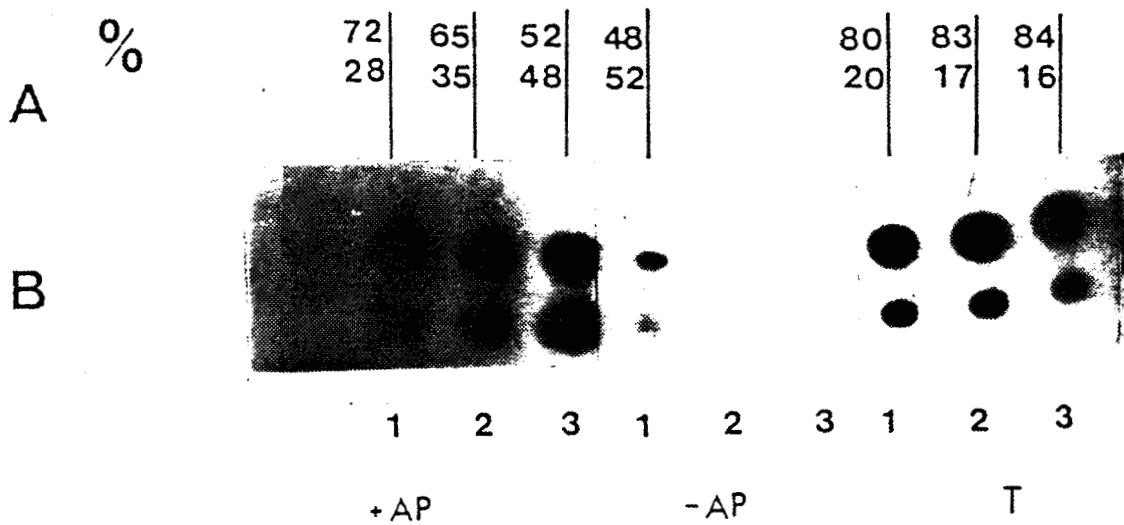
Si l'analyse électrophorétique du matériel radioactif montre un profil analogue à celui de l'échantillon témoin correspondant, en revanche, les enregistrements densitométriques des différents temps d'incubation (30 minutes, 2 heures, 6 heures), révèlent l'effet du surnageant pH 5,5 sur la LH, avec une 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  $\alpha$  (28% à 30 minutes et 48% à 6 heures).

Le surnageant pH 5,5 avec antiprotéases provoque donc une dissociation de l'hormone marquée.

##### b. Effet d'un surnageant pH 5,5 préparé en absence d'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 la

PROFIL ELECTROPHORETIQUE DE LA LH MARQUEE AU  
COURS DE LA CINETIQUE D'INCUBATION EN PRESENCE  
D'UN SURNAGEANT pH 5,5 AVEC OU SANS ANTIPROTEASES (  $\pm$  AP)



A répartition de la radioactivité  
B autoradiographie  
tampon de reprise d'échantillons -  $\beta$ ME

+ AP : avec antiprotéases  
- AP : sans antiprotéases  
T : témoin  
1 : 30 minutes  
2 : 2 heures  
3 : 6 heures

Figure 65



sous-unité  $\alpha$  . Après 2 et 6 heures de réaction, le marquage devient totalement absent du profil électrophorétique. La sous-unité  $\beta$  est aussi très rapidement détruite (Fig. 65).

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  $\alpha$  et  $\beta$  libres, dissociation qui s'accompagne d'une dégradation préférentielle de la sous-unité  $\alpha$  . L'effet du surnageant pH 5,5 est lui, plus faiblement dissociant avec un effet protéolytique plus marqué vers la sous-unité  $\beta$  .

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 en pH physiologique.

c. Effet du pH sur l'activité protéolytique d'un surnageant pH 5,5 préparé en présence ou absence d'antiprotéases

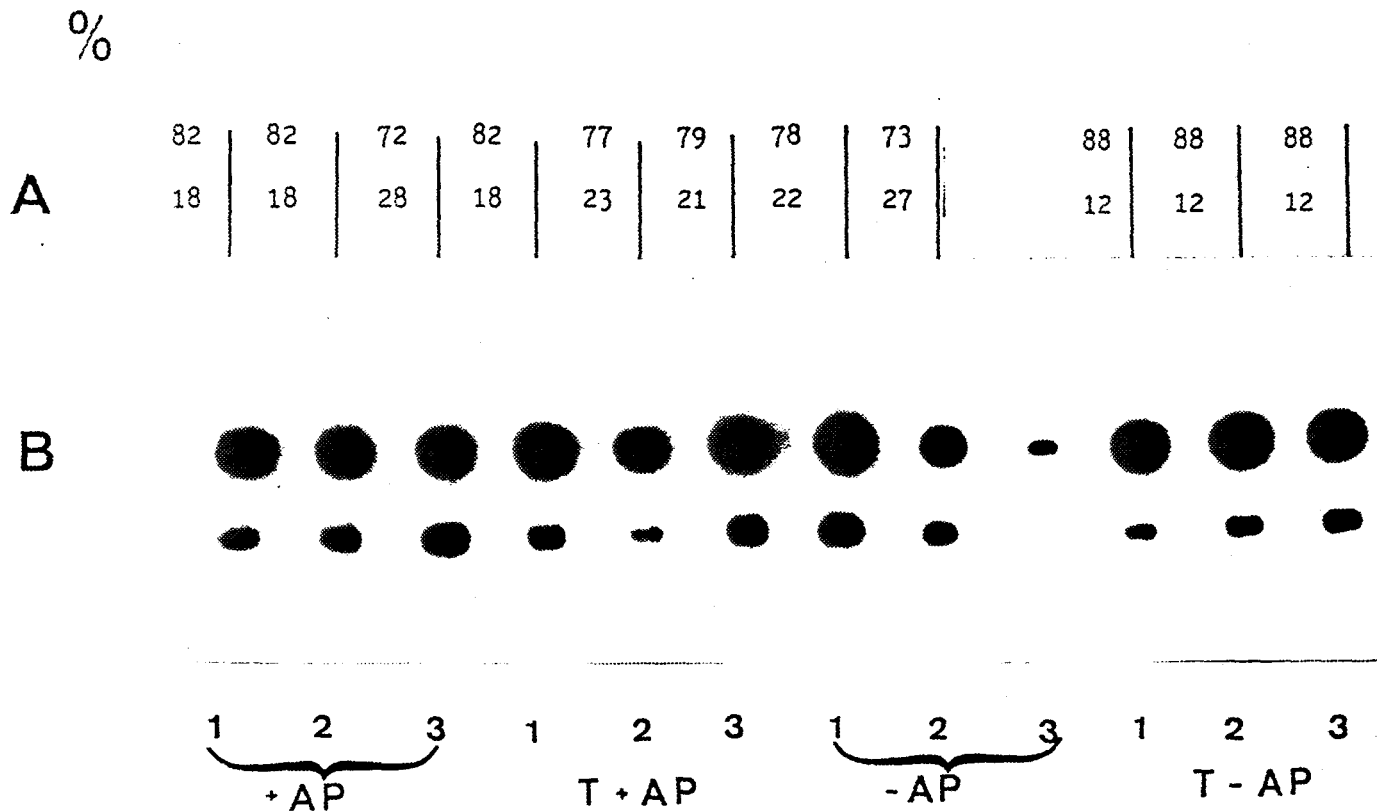
Les témoins ainsi que les extraits antigéniques préparés avec ou sans antiprotéases à pH 5,5 sont ramenés et stabilisés à pH 7,0 par addition de soude 1N. Les mêmes concentrations d'hormone marquée, les mêmes conditions de temps et de température d'incubation ont été conservées de même que le protocole analytique électrophorétique.

Les témoins correspondants à la cinétique de réaction de la LH  $^{125}\text{I}$  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  $\alpha$  libre en présence ou en l'absence d'antiprotéases (Fig. 66).

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 de la sous-unité  $\alpha$  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 absence d'inhibiteurs protéasiques, le pourcentage relatif de la

PROFIL ELECTROPHORETIQUE DE LA LH MARQUEE  
AU COURS DE LA CINETIQUE D'INCUBATION EN PRESENCE  
D'UN SURNAGEANT pH 7,0 AVEC OU SANS ANTIPROTEASES (  $\pm$  AP)



A répartition de la radioactivité  
B autoradiographie  
tampon de reprise d'échantillons - $\beta$ ME

+ AP : avec antiprotéases  
- AP : sans antiprotéases  
T + AP : témoin avec antiprotéases  
T - AP : témoin sans antiprotéases  
1 : 30 minutes  
2 : 2 heures  
3 : 6 heures

Figure 66

radioactivité représentative de l'hormone native passe de 78% à 30 minutes à 69% après 6 heures. Celui de la sous-unité  $\alpha$  étant de 22% à 30 minutes à 18% 6 heures plus tard.

L'action du surnageant antigénique à pH 7,0 entraîne une protéolyse particulièrement marquée de la sous-unité  $\alpha$  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.

Cette étude de l'effet du matériel parasitaire de surface in vivo et in vitro permet de distinguer deux effets sur la fonction gonadique :

- l'AVS agit directement sur la sécrétion testiculaire et sur la fonction antéhypophysaire de la LH sans modification sensible de la LH sérique

- le surnageant brut, et plus encore le matériel contenu dans le culot parasitaire modifie la fonction gonadique en agissant sur la LH sérique par dissociation des sous unités et par dégradation protéolytique, ce qui conduit à une stimulation rétroactive de la LH hypophysaire.

O O

## CONCLUSION GENERALE

O O

Dans le dialogue permanent hôte-parasite, il est d'un grand intérêt de pouvoir caractériser les éléments moléculaires d'origine parasitaire biologiquement interactifs avec le sujet parasité. Deux domaines d'investigation, en rapport avec la séméiologie de la Trypanosomiase africaine ont été retenus : l'immunosuppression et le dysfonctionnement endocrinien.

Dans les deux cas, nous avons développé des protocoles de recherche utilisant l'animal : le rat, et un parasite : Trypanosoma brucei brucei, à l'aide de souches adaptées sur rongeur.

La purification de l'antigène variable de surface après libération iso-osmotique du manteau parasitaire a conduit à des préparations dont l'homogénéité, la composition chimique (acides aminés, sucres) et la réaction immunologique ont été contrôlées. Au cours des étapes de purification, la nécessité d'ajouter un mélange d'antiprotéases s'est imposée pour obtenir des préparations reproductibles et présentant une intégrité structurale.

Des activités enzymatiques parasitaire ont été caractérisées aussi bien dans le matériel de surface que dans les cellules parasitaires elles-mêmes. Il a aussi été possible de définir en dehors de sérine-protéases, de thiol-protéases, une activité originale de thiol-réductase qui contrôle le passage de l'état dimère à l'état monomère de l'antigène variable.

Ainsi ont été testés tant au plan immunitaire (sur lymphocytes) qu'au plan endocrinien (in vivo et in vitro), l'effet d'éléments moléculaires parasitaires de surface non purifiés (surnageant pH 5,5 ; surnageant pH 7,0) ou purifié (l'antigène variable). Les protocoles ont tenu compte du fait que les produits testés étaient obtenus en présence ou en absence d'antiprotéases.

Sur le plan immunitaire, on retiendra que l'activation lymphocytaire par matériel trypanosomal fait intervenir des mécanismes IL-1 et IL-2 dépendants ou indépendants, l'antigène variable de surface étant l'interlocuteur privilégié de la relation parasite/système immunocompétent de l'hôte. Les récepteurs lymphocytaires spécifiques demandent à être caractérisés. Certains pourraient être communs à ceux reconnus par la concanavaline-A. Ainsi l'antigène variable de trypanosome jouerait un rôle déterminant dans les perturbations de la messagerie intercellulaire.

Sur le plan endocrinien, l'influence du parasite s'exprime à travers un hypogonadisme que nous avons pu vérifier par des épreuves de provocation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique chez le rat. Ainsi chez le rat mâle l'antigène variable agit directement sur la synthèse et la sécrétion de testostérone, la chute de testostérone étant parfaitement significative après injection d'une dose test d'antigène.

Au niveau hypophysaire, la biosynthèse antéhypophysaire de la stimuline gonadotrope LH apparaît normale, la LH circulante étant peu ou pas influencée, ce qui amène à évoquer une anomalie de sécrétion ou plutôt une possibilité de dégradation de l'hormone. En l'absence d'antiprotéases, le matériel de surface parasite est en effet capable in vitro de provoquer une dégradation rapide par protéolyse. En présence d'antiprotéases l'hormone est également remaniée, une incubation de 30 minutes laissant déjà apparaître une dissociation de la LH en ses deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ .

Cet effet dissociant peut être une explication à la perte de fonctionnalité d'une LH circulante qui au regard du "dosage radioimmunologique" demeure cependant en limite valeur normale mais qui du fait

- d'une dissociation
- d'une protéolyse

aurait perdu ses propriétés.

En dehors du modèle parasite un tel mécanisme physio-pathologique pourrait aussi être invoqué dans certains tableaux d'hypogonadisme non explicités par le seul bilan endocrinien hypophyso-gonadique.

Autre hypothèse pour la chute de testostérone, la reconnaissance possible de récepteurs tissulaires à LH par des fragments d'antigène variable, cette approche explicative demande à être confirmée.

Au total, ce travail permet par les résultats enregistrés de montrer, sans conteste, l'implication de composants parasites dans deux grands systèmes de régulation générale : le système immunitaire, le système endocrinien.

Les hypothèses soulevées devront permettre de mieux comprendre ces implications

- \* en précisant la nature des enzymes parasites
- \* en étudiant leur sensibilité aux antiprotéases naturelles et de synthèse
- \* en identifiant les domaines moléculaires de l'antigène variable biologiquement actifs
- \* en purifiant et en étudiant les effets biologiques des fragments libérés par intervention des enzymes parasites sur la glycoprotéine antigénique, de mieux comprendre l'interface hôte-parasite.

°00°

## INDEX TECHNIQUE

°00°

1 Stabilats : 2 volumes de sang parasité sont repris dans un volume de PSG<sup>3</sup>

Glycerol 1:1 v/v. L'ensemble est distribué par aliquotes de 0,7 ml et congelé à -80°C par palier.

2 Injections : a. souche aigüe (AnTat 1.1 A)

Le stabilat est repris par 0,5 ml de PSG<sup>3</sup>. 0,3 ml sont injectés par voie intrapéritonéale à une souris Swiss mâle. Le sang des souris, endormies à l'éther est récupéré par ponction cardiaque sous héparine et dilué dans du PSG<sup>3</sup> pour avoir une solution de 15-20  $10^6$  trypanosomes/ml. Pour les préparatifs, 5 ml de cette solution sont injectés par deux injections intrapéritonéales de 2,5 ml à des rats Sprague Dawley mâles de 600 g. Pour les études immunologiques, deux fois 1 ml sont injectés à des rats jeunes de quatre semaines (200 g).

b. souche chronique (AnTat 1.1 E)

Le stabilat est utilisé directement et dilué dans le PSG pour injecter en sous cutané dans 1 ml, 100 trypanosomes.

c. contrôles

Les études immunologiques sont menées en parallèle avec des rats sains auxquels ont été injectés les volumes identiques de sang de souris dilué, par rapport à la souche aigüe, ou de PSG par rapport à la souche chronique.

3 PSG :

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  38 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2mM, NaCl 30 mM, glucose 83,3 mM, pH 8,0.

PBS :

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  13mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3mM, NaCl 123 mM pH 7,2

4 Recueil du sang

Les rats sont endormis par injection i.p. d'une solution contenant 0,5 ml d'héparine et 0,6 ml de pentobarbital par animal. Le sang, est récupéré par ponction cardiaque dans une solution de PSG<sup>3</sup> 7,5 ml, héparine 0,3 ml et antiprotéases 0,25 ml pour un rat. Cette opération est effectuée à 4°C.

5 Antiprotéases :

Chaque antiprotéase est reprise, à une concentration de 20 mM à savoir : TLCK dans le dioxane, PMSF dans l'isopropanol, NEM dans l'eau.

6 Chromatographie sur DEAE-cellulose (Lanham et Godfrey, 1970)

La DEAE-cellulose (DEAE-52 Watman Preswollen) est équilibrée en tampon



PSG<sup>3</sup>.

Le mélange sang-solution de recueil est repris dans deux volumes de DEAE-cellulose et déposé sur une colonne contenant de la DEAE-cellulose. La DEAE-cellulose est éluée par du tampon PSG. La chromatographie est contrôlée par observation directe au microscope de l'éluat. L'éluat, contenant les trypanosomes, est centrifugé et le culot lavé deux fois par le PSG<sup>3</sup> à 4°C (1500 g, 15 min).

7 Tampon de libération (Baltz et coll, 1976)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,125 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,125 M. Les deux solutions sont mélangées pour obtenir le pH voulu. La solution finale est complétée par du glucose à 1% (p/v) et des antiprotéases 1% (v/v). 10 ml de tampon sont utilisés par gramme de culot parasite. Les parasites sont laissés une nuit à 4°C sur agitateur de Kline.

8 Centrifugation postérieure à la libération du manteau de surface :

La suspension de parasites dans le tampon de libération est centrifugée à 3500 g, 15 minutes à 4°C,. Le surnageant est alors ultracentrifugé 1h à 165 000 g à 4°C.

9 Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (Laemmli, 1970)

a) Solutions

- . Solution mère d'acrylamide : A
  - acrylamide 48 g
  - N-N' méthylène bisacrylamide 1,28 g
  - H<sub>2</sub>O desionisée q.s.p. 100 ml
- . Solution tampon du gel à gradient : B
  - 3 M tris-HCl pH 8,8
- . solution tampon du gel supérieur : C
  - 1 M tris-HCl pH 6,8
- . tampon d'électrophorèse
  - Tris 0,025 M, glycolle 0,192 M, SDS 0,1 %
- . tampon de reprise d'échantillon
  - Tris HCl 0,0625 M, SDS 2%, glycérol 10%, pH 6,8
  - Tris HCl 0,0625 M, SDS 2%, glycérol 10%, β mercaptoéthanol 5%, pH 6,8.

b) composition des gels

|                       | solution 5% | solution 30% | gel supérieur 5% |
|-----------------------|-------------|--------------|------------------|
| A (ml)                | 1,4         | 8,4          | 1                |
| B (ml)                | 1,75        | 1,75         | -                |
| C (ml)                | -           | -            | 1,25             |
| SDS 2% p/v (ml)       | 0,7         | 0,7          | 0,5              |
| H <sub>2</sub> O (ml) | 10          | 3            | 7,1              |
| Saccharose (g)        | -           | 2,8          | -                |
| Riboflavine           |             |              |                  |
| 0,004% (v/v) (ml)     | 0,1         | 0,1          | 0,1              |
| TEMED (ml)            | 0,015       | 0,01         | 0,04             |
| Persulfate d'ammonium |             |              |                  |
| 10% (p/v) (ml)        | 0,025       | 0,01         | 0,06             |

c) préparation

Un gel de polyacrylamide (5 à 30%) de 1,5 mm d'épaisseur est coulé entre deux plaques de verre. Un gel supérieur d'acrylamide à 5% dans lequel sont réalisés des puits, est ensuite coulé. Pour les gels d'activité protéolytique, chaque solution est additionnée de gelatine à 0,1% (p/v) (Hensen et Dowdle, 1980). La migration est réalisée dans une cuve d'électrophorèse verticale (LKB 2001) sous une intensité constante réglée. La migration est suivie par un témoin bleu de bromophénol.

Après migration, le gel est démoulé, et soumis à divers types de révélation.

d) révélations

\* Bleu Coomassie

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| colorant : Bleu Coomassie R 250 | 1,25 g |
| Ethanol                         | 122 ml |
| Acide acétique                  | 25 ml  |
| H <sub>2</sub> O                | 122 ml |
| décolorant : Méthanol           | 350 ml |
| Acide acétique                  | 70 ml  |
| H <sub>2</sub> O                | 500 ml |

Après migration, le gel est lavé à l'eau puis coloré 1 heure sous agitation. Après rinçage à l'eau, il est décoloré sous agitation par bain successifs de 30 minutes.

**\* PAS (Periodic Acid Schiff)**

Après migration le gel est lavé à l'eau puis soumis à des bains successifs :

- acide trichloroacétique 12,5 % (p/v) 30 minutes
- rinçage par H<sub>2</sub>O désionisée quelques instants
- acide periodique 1% (v/v) dans l'acide acétique 3% (v/v) 50 minutes
- rinçage par H<sub>2</sub>O désionisés quelques instants
- réactif de Schiff 50 minutes à l'obscurité
- HCl 0,001 M, 2 fois 30 minutes.

**\* Immunotransfert (Vaessen et coll, 1981)**

Après migration électrophorétique des échantillons, le gel est rincé en tampon Tris 0,025 M-glycocolle 0,192 M afin d'éliminer le SDS.

Les bandes sont transférées sur nitrocellulose pendant 1 nuit en tampon Tris-glycocolle enrichi en méthanol à 20%, sous un ampérage de 250 mA.

Après transfert, la membrane est rincée en tampon Tris 10 mM, pH 7,4 - NaCl 0,9% pendant 15 minutes puis incubée dans ce même tampon enrichi en sérum albumine bovine à 3% (fraction V pH 5,2) pendant 1 heure à 45°C afin de saturer les sites aspécifiques et d'inhiber les peroxydases de la préparation.

Après rinçage, l'immunotraitement s'effectue par incubation de la membrane de nitrocellulose avec l'immunsérum spécifique dilué au 1/500e en tampon Tris 10 mM pH 7,4 - NaCl 0,9% - sérumalbumine bovine 3% - sérum de veau, 10%.

Après contact une nuit à 20°C sous agitation, plusieurs rinçages sont réalisés en tampon Tris 10 mM pH 7,4 - NaCl 0,9% puis dans un tampon enrichi en Tween 20 à 0,1% (v/v).

Le traitement à la peroxidase s'effectue par incubation de la membrane de nitrocellulose 2 heures à 37°C en Tampon Tris 10 mM pH 7,4 - NaCl 0,9% - BSA 3% contenant l'anticorps anti-IgG marqué à la peroxydase en dilution finale 1/500.

Après une nouvelle série de rinçages, la révélation est effectuée par une incubation de 1 minute dans la solution suivante :

- Tris 50 mM pH 7,6 (200 ml)
- 4-chloro-1-naphthol (100 mg)
- $H_2O_2$  (240  $\mu$ l)

La réaction est arrêtée par lavage abondant en eau.

\* Activité protéolytique (Hensen et Dawdle, 1980)

Les gels préparés en présence de gélatine 0,1%, sont, après migration, lavés dans du triton X-100 2,5% (v/v), puis incubés à 37°C 4 heures dans deux tampons différents :

- phosphate de sodium 0,1 M de pH 6,0  $\pm$  DTT 1mM
- Tris glycolle 0,1 M de pH 8,3  $\pm$  DTT 1mM.

Les gels sont ensuite révélés à l'aide du bleu Coomassie.

\* Autoradiographies des gels de polyacrylamide

Après coloration/décoloration au bleu Coomassie, les gels dont les échantillons contiennent du  $^3H$  ou du  $^{14}C$  sont traités par un bain d'acide acétique à 7% (v/v) afin de préparer l'amplification réalisée par un bain de 30 minutes sous agitation dans une solution commerciale d'"Amplify" (Amersham). Les gels sont séchés sous vide puis mis en contact avec des films de radiographie (X-OMAT Kodak) dans des cassettes hermétiques (Philips) placées à -80°C pour un temps défini. Les radiographies sont ensuite révélées par bains successifs de 3 minutes : révélateur/eau/fixateur/eau suivis d'un séchage à chaud.

10. Chromatographie d'affinité sur Concanavalline-A Sépharose (Baltz et coll, 1976)

. Tampon d'équilibre : phosphate de sodium 0,01 M ; NaCl 0,5 M ;  $MgCl_2$  1 mM ;  $CaCl_2$  1mM ; pH 8,0.

. montage : colonne de verre de 15 cm x 1 cm, débit 10 ml/H, détection à 220 nm en continu (cellule LKB 2138 UVICORD).

. dépôt : le surnageant de libération du manteau, ultracentrifugé à 165 000 g 1 heure à 4°C pour éliminer les débris cellulaires, est dialysé deux fois 30 minutes contre le tampon d'équilibre dans un rapport 1V/10V, est déposé sur une colonne de Concanavaleine A-Sépharose.

La chromatographie est réalisée à 4°C.

Ce tampon d'équilibre permet d'obtenir une fraction non retenue sur la colonne d'affinité ( $F_1$ ).

Le gel de Sépharose est ensuite successivement soumis en gradient discontinu :

- à une élution par le tampon enrichi en méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10% ( $F_2$ ),
- à une élution par le tampon enrichi en méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10% et en  $\beta$ -mercaptoéthanol à 1% ( $F_3$ )
- à une élution par le tampon enrichi en méthyl- $\alpha$ -D-mannoside à 10%,  $\beta$ -mercaptoéthanol à 1%, et en SDS 0,01% ( $F_4$ ).

Les différents éluats sont dialysés 1 semaine à 4°C contre de l'eau distillée et lyophilisés.

## 11. Composition amino-acide

### a. Hydrolyse

L'échantillon (soit 60 à 100 nanomoles) est hydrolysé pendant 24 heures par l'acide chlorhydrique 5,6 N à 110 °C en tube scellé sous vide. L'hydrolysat est ensuite évaporé sous vide à basse température (Evapo Mix Buchler).

### b. Analyse des acides aminés sur autoanalyseur

La composition en acides aminés est réalisée sur autoanalyseur Beckman de type 119 CL. Les tampons et le programme retenus (Fauconnet et Rochemont, 1978) permettent en une seule étape et sur une seule colonne la séparation des acides aminés et osamines, sur une résine Durrum DC 6A dans une colonne de 6 mm de diamètre et de 220 mm de hauteur.

La composition du réactif à la ninhydrine est la suivante : ninhydrine 75 g, chlorure stanneux 1,5 g, tampon acétate de sodium pH 5,5 1250 ml, méthylcellosolve 3750 ml. Le réactif est maintenu sous atmosphère d'azote.

Le tryptophane détruit par l'hydrolyse acide HCl 5,6 N est dosé par la méthode de Penke et coll. (1974) :

1 mg d'échantillon est hydrolysé 24 heures sous vide à 110°C par 1 ml d'acide  $\beta$  -mercapto-sulfonique en présence de 500 nanomoles de norleucine. Le pH de l'hydrolysate est ensuite ajusté à pH 2,2 par de la soude 2N et le volume est ajusté à 5 ml avec un tampon pH 2,2 utilisé habituellement pour le dépôt des échantillons sur l'autoanalyseur. L'analyse s'effectue ensuite selon les conditions précédemment décrites.

## 12. Composition glucidique

La composition en oses neutres et en osamines est déterminée, après méthanolyse, par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode de Kamerling (1975) modifiée par Montreuil et coll (1986).

### a. Méthanolyse

La méthanolyse est effectuée dans une solution de méthanol-HCl 0,5 M à 80°C pendant 24 heures. La réaction est neutralisée par addition de carbonate d'argent et la solution est ensuite séchée sous courant d'azote.

### b. N-acétylation et dé-O-acétylation

#### \* N-acétylation

Les échantillons sont N-acétylés par addition de 20  $\mu$ l d'anhydride acétique et laissés en contact une nuit à l'obscurité. Puis 0,7 ml d'heptane sont ajoutés afin d'obtenir un déphasage. La phase heptanique supérieure est alors évaporée sous azote puis addition de 30  $\mu$ l de pyridine.

Après 3 minutes à température ambiante, les échantillons sont séchés sous azote dans un bain marie à 37°C.

#### \* Dé-O-acétylation

Les échantillons sont alors dé-O-acétylés dans 500  $\mu$ l de méthanol-HCl 1,5 M pendant 1 heure à 65°C. Le méthanol est ensuite évaporé sous courant d'azote.

### c. Triméthysilylation

La silylation est effectuée par addition de 30  $\mu$ l de pyridine et de 30  $\mu$ l de BSTFA (bis-triméthylsilyl) trifluoroacétamide catalisé avec 1% de triméthylchlorosilane) pendant 2 heures à température ambiante et à l'obscurité. Après séchage sous azote, 100  $\mu$ l d'heptane sont ajoutés. Un délai de 30 minutes est fixé avant l'injection de 1 à 2  $\mu$ l de la phase heptanique.

#### d. Chromatographie en phase gazeuse

L'analyse est effectuée sur appareil Girdel équipé d'un détecteur à ionisation de flamme sur colonne capillaire.

La température initiale du four est de 120°C, elle augmente de 8°C par minute jusqu'à 240°C. La surface des pics et le temps de rétention sont déterminés au moyen de l'intégrateur digital couplé à l'appareil.

#### 13. Dosage de phosphore

Les échantillons ont été dissous dans de l'eau distillée à une concentration de l'ordre de 0,1 mg/ml.

##### \* Elimination des groupements phosphate libres

Des aliquots de solution correspondant à 5 nmoles et 10 nmoles de glycoprotéine ont été de façon répétée précipités par de l'acide trichloracétique (16%, p/v), avec une redissolution des précipités dans de la soude 0,1 N à 0°C, respectivement avec ou sans une étape de chauffage du précipité à 80°C pendant 20 minutes.

##### \* Minéralisation (Ames, 1966)

On ajoute aux précipités précédents, et à une gamme étalon préparée à partir d'une solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 M, 62,5 µl de nitrate de magnésium à 10% dans l'éthanol absolu. Les échantillons sont séchés en étuve à 105°C puis minéralisés à la flamme d'un bec bunsen.

##### \* Dosage du phosphore inorganique (Itaya et Michio, 1966)

. Préparation du réactif : 1 g d'heptamolybdate d'ammonium ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) est dissous dans 10 ml d'HCl 4N, et 60 mg de vert Malachite dans 30 ml d'eau. Les deux solutions sont ensuite mélangées et laissées sous agitation 30 minutes. Le mélange est centrifugé juste avant l'emploi.

. Les cendres sont dissoutes dans 375 µl d'HCl 1,2 N et l'on ajoute 125 µl de réactif, après 5 minutes, sont ajoutés 12,5 µl de Tween 20 à 1,5%. La lecture se fait à 660 nm.

14. Chromatographie d'exclusion sur biogel P60

- tampon : acide acétique 0,1N
- gel : biogel P60 100-200 mesh
- montage : colonne de verre de 50 x 2 cm ; collection de 3 ml/min/tube ;  
lecture spectrophotomètre à 210 nm
- dépôt : 50 mg de fraction F<sub>1</sub> Con-A sont repris dans 4 ml de tampon,  
l'insoluble est centrifugé 4 000 g, 10 min.

15. Chromatographie d'affinité sur  $\alpha$  méthylmannoside agarose

- tampon : phosphate de sodium 0,01 M ; NaCl 0,5 M ; MgCl<sub>2</sub> 1 mM,  
CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 8,0
- montage : colonne de verre de 15 cm x 1 cm, débit 10 ml/h, détection  
en continu à 210 nm (Cellule LKB 2138 UVICORD).
- dépôt : les échantillons lyophilisés sont repris par un volume minimum  
de tampon et déposés directement sur une colonne de 1 ml  
pour 1 mg de dépôt.  
La chromatographie est effectuée à 4°C.

16. Chromatographie HPLC de gel permeation

- tampon : phosphate de sodium 0,1 M pH 7,0 additoné ou non de SDS  
0,1% (P/V)
- montage : colonne de type TSK SW G 4000 (7,5 x 600 mm) munie ou  
non d'une précolonne TSK SWP (7,5 x 75 mm) sur un  
appareil Varian 5000. Débit 0,7 ml/min et détection en continu  
à 214 nm (cellule LKB)
- calibration : thyroglobuline (670 000), ferritine (440 000), catalase  
(232 000), lactate deshydrogénase (140 000), sérum albumine  
(67 000) et ovalbumine (44 000).

17. Préparation des fragments tryptiques de l'AVS

\* Hydrolyse tryptique

- trypsine : (Sigma type XI) débarrassée de l'activité chymotrypsine  
par le chlorure de diphenylcarbamy.
- tampon : bicarbonate d'ammonium 0,01 M pH 8,0



- protocole : l'échantillon est utilisé à 1 mg/ml, l'hydrolyse se déroule à 37°C pendant 24 heures avec un rapport E/S de 1/100.

\* Séparation des fragments

- tampon : bicarbonate d'ammonium 0,1 M
- gel : biogel P30
- montage : colonne de verre de 170 x 1 cm, collection de 2,6 ml/tube en débit libre. Lecture à 210 nm au spectrophotomètre.

18. RMN  $^{31}\text{P}$

Les spectres découplés sont enregistrés à 32,44 MHz avec un spectromètre Bruker WP 80 WG. Le champ est réglé sur la résonance du deutérium contenu dans le solvant ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ). La température est de 30°C, le balayage de champ 5000 Hz avec un temps d'acquisition de 0,8 s, une impulsion de 8  $\mu\text{s}$  et un temps de répétition de 1s. Les glissements chimiques sont en partie pour million (ppm) relatifs à la résonance du  $^{31}\text{P}$  d'un standard externe (85% d'acide orthophosphorique).

19. Incorporation d'acide myristique in vitro

Les parasites sont incubés 30 minutes à 30°C à la concentration de  $75 \cdot 10^6$  cellules/ml dans du RPMI 1640 dépourvu de glutathion et additionné de proline à 0,1% et de thréonine à 0,015%. L'acide ( $9,10^3\text{H}$ ) myristique (NEM 828,8 GBq/mmol) est complexé à la sérulalbumine délipidée puis ajouté à la culture à 1850 KBq/ml. Les trypanosomes sont ensuite sédimentés puis lavés avant le traitement (1500 g).

20. Marquage à l'acide iodoacétique  $^{14}\text{C}$

La préparation est réalisée à l'aide du tampon phosphate glucosé pH 7,0<sup>7</sup>. Une ampoule de 1,85 MBq d'acide iodoacétique (Amersham 2,07 GBq/mmol) est reprise par 0,3 ml de tampon. Une solution d'acide iodoacétique froid à 5 mM/L est également préparée. 0,4 ml de cette solution sont ajoutés à 0,3 ml de la solution radiomarkée. La solution finale (4,3 mM/L) est ajoutée à 10% de la solution protéique à traiter (v:v) et la préparation placée à l'obscurité 1 heure sous agitation à température ambiante.

## 21. Dosages fluorométriques

Les activités peptidasiques sont déterminées avec les substrats Z-Phe-Arg-NMec (benzyloxycarbonyl-L-phénylalaninyl-L-arginine-(4-méthyl-7-coumaryl)-amide-HCL), et Z-ARG-ARG-NMec (benzyloxycarbonyl-L arginyl-L-arginine(4-méthyl-7-coumaryl) amide diacétate. L'échantillon est dilué à un volume de 750 µl par un tampon phosphate de sodium 0,25 M de pH 6,0 ou pH 8,3 contenant 2,5 mM de EDTA, puis 125 µl de Brij 35 à 0,1% (p/v) complètent cette solution qui est incubée 5 minutes à 37°C. 125 µl de substrat à 100 µM dans 0,1% de Brij 35 sont ajoutés pour une incubation de 10 minutes à 37°C. Les essais sont aussi réalisés en présence de E-64 (1-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamino(4-guanidino)butane) à 2 µM ou en présence de DTT (concentration finale 1,25 mM). Les réactions sont stoppées par addition d'un volume d'une solution d'acide iodoacétique 0,1 M et d'acétate de sodium 0,1 M. La fluorescence est mesurée par excitation à 380 nm et émission à 480 nm avec un spectrofluorimètre, utilisant pour la calibration une solution de 7-amido-4-méthylcoumarine. L'activité est exprimée en U/L (1 U correspond à la libération de 1 µmole d'aminoéthylcoumarine/mn).

## 22. Préparation des cellules lymphocytaires et accessoires

### a- Préparation des cellules lymphocytaires

Elle est réalisée en conditions stériles sous hotte à flux laminaire, prélèvement de ganglions inguinaux, périaortiques et mésentériques sur rats mâles Sprague Dawley de 200 g.

Fait suite un broyage des ganglions en milieu RPMI 1640 et une filtration de la solution sur filtre de nylon (Bultex). On réalise 2 lavages successifs dans 50 ml de RPMI 1640 (1500 rpm 10 minutes). Le dernier culot cellulaire est repris en milieu minimum : RPMI + Sérum de veau foetal à 10%.

-La préparation cellulaire est purifiée en utilisant une laine de nylon préalablement incubée 30 minutes en milieu minimum (RPMI 1640 + 10% de sérum de veau foetal (SVF)) à l'étuve à 37°C, CO<sub>2</sub> 4%, hydrométrie contrôlée à 90% (conditions standardisées) (Julius, 1973). la suspension est déposée sur une colonne de 5 ml contenant la laine de nylon. Après pénétration du dépôt, la colonne est recouverte de milieu minimum et laissée 2 heures en incubation en

conditions standardisées. Après ce temps de contact, la colonne est éluée par 30 ml de milieu RPMI HEPES à un débit de 1 ml par minute. Le culot de cellules obtenu après centrifugation de l'éluat (1500 rpm, 10 minutes) est lavé en milieu RPMI HEPES puis ajusté en milieu "lignée" (RPMI HEPES + sérum de veau foetal à 10% v/v décomplémenté + 2 mM L Glutamine + 10 mM pyruvate +  $2,5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoéthanol, antibiotiques (pénicilline 100UI/ml, streptomycine 100µg/ml)) à la concentration de  $10^7$  cellules par ml.

#### b. Préparation des cellules accessoires

- Prélèvement de thymus de rats sains syngéniques en milieu RPMI 1640 dans des conditions stériles sous hotte à flux laminaire.

- Broyage en milieu RPMI HEPES, filtration de la solution cellulaire sur filtre nylon (Bultex). Deux lavages dans 50 ml de milieu RPMI HEPES par centrifugation à 1500 rpm, 10 minutes à 4°C. Le dernier culot est repris dans 3 ml de milieu minimum et irradié à 30 Grey (Phillips RT, filtre 1,5 AL, 100KV, 8 mA). La solution finale est ajustée à une concentration de  $2 \times 10^7$  cellules par ml en milieu "lignée".

#### 23. Test de prolifération

$4 \times 10^5$  lymphocytes T sont mis en culture avec les différentes fractions à tester : la Con-A à 0,4, 0,2, 0,1 µg/puits ; la PHA 0,8, 0,4, 0,2 µg/puits, les préparations parasitaires : 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 µg/puits.

Les cultures sont menées en présence ou non de cellules accessoires à  $8 \times 10^5$  cellules par puits dans un volume final de 0,2 ml.

. Elles sont réalisées en triplets dans des boîtes de 96 puits à fond plat (Nunc),

. En fin d'incubation, 17,5 KBq de méthyl thymidine (37MBq/mmol, CEA), sont ajoutés à chaque puits. L'incorporation de thymidine est quantifiée 6 heures après le marquage par dépôt des cellules sur filtre de fibre de verre (Skatron) et comptage de filtres séchés repris par 2 ml de liquide "Organic counting scintillant" (OCS) (Amersham) dans un compteur à scintillation (Beckman LS 3801).

Pour les tests indirects, les lymphocytes T seuls sont incubés avec 20 µg de matériel par puits durant 2 heures avant d'être stimulés par les mitogènes durant 48 heures. les résultats sont exprimés en index de prolifération :

DPM des cellules stimulées

DPM de cellules témoins

## 24. Production d'IL-2

### 1. Sécrétion d'IL-2

Les surnageants contenant l'IL-2 sont obtenus par cultures doublées, en boîtes de 24 puits à fond plat (Falcon 3047), de  $2 \times 10^6$  lymphocytes T/puits en présence ou non de  $4 \times 10^6$  cellules accessoires dans un volume final de 1 ml. Les tests directs sont réalisés avec par puits : 2,1,0,5 µg de Con-A ; 4, 2, 1 µg de PHA ; 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 et 3.125 µg de préparations parasitaires. Dans les expériences indirectes, les cellules sont incubées avec 100 µg de matériel par puits durant deux heures, avant d'être stimulées par les mitogènes. En fin d'incubation, les doubles puits sont mélangés, centrifugés (1500 rpm, 10 min) et congelés avant le test IL-2.

### 2. Test IL-2

Les cellules IL-2 dépendantes sont préparées à partir d'une rate de rat, broyée, et filtrée sur Bultex. Le filtrat est soumis à une lyse osmotique (1 volume NaCl 0,6% p/v suivi d'un volume de NaCl 1,2% p/v) qui élimine les hématies, puis lavé dans le milieu RPMI. Les cellules sont alors mises en culture à raison de 3 à  $5 \times 10^6$  cellules/ml en présence de 5 µg de Con-A/ml pendant 72 heures. Puis, les cellules sont lavées 7 fois dans le milieu RPMI contenant 20 mg/ml d'α D-mannoside. Le test IL-2 est réalisé en triplets dans des boîtes de 96 puits avec  $10^4$  cellules IL-2 dépendantes par puits dans un volume final de 0,2 ml. Chaque surnageant à tester est dilué en cascade dans les puits (1/2, 1/4, 1/8, 1/16). Une gamme d'IL-2 recombinante (Roussel-UCLAF) à 100 U/ml est utilisée comme référence pour des déterminations quantitatives. L'incubation est menée dans les conditions standardisées pendant 48 heures, et la prolifération appréciée par incorporation de thymidine triciée<sup>23</sup>.

## 25. Préparation des lymphocytes périphériques humains

Le sang est dilué de moitié dans du sérum physiologique et 35 ml de mélange sont déposés délicatement sur une solution de Ficoll-paque (Pharmacia). Une centrifugation (1800 rpm, 30 minutes, température ambiante) livre un anneau de cellules mononuclées situé entre le plasma supérieur et le ficoll inférieur les hématies formant un culot. Enfin, les cellules sont lavées plusieurs fois à la même vitesse pour éliminer le ficoll. La culture est pratiquée en double dans des boîtes de 24 puits à fond plat en concentration de  $5 \times 10^6$  cellules/puits dans un volume final de 1 ml en présence du matériel parasite

à 100 µg par puits. Les tests indirects sont réalisés par pré-incubation de 2 heures avec les mêmes quantités de matériel. Après 20 heures, les cellules sont lavées dans un tampon physiologique contenant 1% de BSA (p/v) (5 minutes 400 g) puis incubées avec un anticorps monoclonal préparé sur souris, anti CD25, marqué à la phycoerythrine (Becton Dickinson). Les populations marquées sont quantifiées par cytofluorométrie en flux à l'aide d'un appareil de type EPICS Profile (Coulter).

## 26. Méthode de calcul du coefficient de variation (différence couplée stastique)

- 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  $\sigma^2$  théorique)

$$S^2 = \sum x^2/n-1 \text{ (nombre de degrés de liberté)}$$

- l'écart type ou déviation standard S (estimation  $\sigma$ ) :  $S = \sqrt{S^2}$

- 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 :

$$S^2 = \left[ (n_A-1)S_A^2 + (n_B-1)S_B^2 \right] / n_A + n_B - 2$$

(nombre de degrés de liberté)

$n_A$  = nombre d'échantillons (série A)       $S_A^2$  = variance de la série A

$n_B$  = nombre d'échantillons (série B)       $S_B^2$  = variance de la série B

$$t = (X_A - X_B) \sqrt{(n_A n_B) / [S^2 (n_A + n_B)]}$$

$X_A$  et  $X_B$  représentant la moyenne de chacune des 2 séries.

Soit la valeur  $t = 0,05$  pour  $(n-1)$  degrés de liberté (lue sur la table Fisher et Yates) (tableau 18) on assigne à la moyenne inconnue  $\mu$  l'intervalle de confiance à 5% :  $\bar{X} \pm t \times S$ .

La diminution est dite "significative" si la probabilité pour que B soit identique à A n'est pas supérieure à 5% ( $p < 0,05$ ).

## 27. Dosages radioimmunologiques

### a. Dosage radioimmunologique direct de la testostérone

Les dosages radioimmunologiques des hormones stéroïdes sexuelles issues d'échantillon de rat sont effectués par utilisation d'une trousse commerciale.

- 181 -  
TABLE DE t (D'APRES FISHER 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   |

Tableau 18

## 1. Principe

Le dosage radioimmunologique direct des hormones gonodotropes dans le sérum repose sur la compétition entre l'hormone marquée à l'iode  $^{125}\text{I}$  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. Dosage

Nous avons utilisé la trousse commerciale SB Testo, Oris - Gif sur Yvette, qui contient :

- \* Testostérone  $^{125}\text{I}$  (0,8  $\mu\text{Ci}$  = 30 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. Dosages radioimmunologiques de la LH 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 LH  $\text{I}_6$  dont l'activité biologique est de 0,9 x NIH LH  $\text{S}_1$ .

la contamination en rFSH, rTSH, rGH et rPrI est inférieure à 0,1%.

b- Pour les courbes de référence et les contrôles de spécificité

La NIDDK rat LH RP<sub>2</sub> (activité biologique : 61 x NIDDK rat LH RP<sub>1</sub>).

## 2. Antisérum utilisé

Le NIDDK anti rat LH sérum 10, préparé chez le lapin, utilisé à la dilution finale de 1/180 000 dans le tampon phosphate 0,01 M EDTA.

## 3. Marquage

2,5 µg de NIDDK rat LH I<sub>6</sub>, sont marqués au <sup>125</sup>I Na (IMS 30 Amersham) selon une adaptation de la méthode à la chloramine T de Greenwood et coll (1965), dont les modalités sont les suivantes :

- à 25 µl d'<sup>125</sup>I Na d'activité 0,5 mCi (18500 KBq) sont ajoutés :
- 2,5 µg d'hormone à marquer diluée dans 25 µl d'eau
- 25 µl de tampon phosphate 0,5 mM de Sorensen, de pH 7,5 et de composition :

|                                  |            |
|----------------------------------|------------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 3,75 g     |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 38,95 g    |
| H <sub>2</sub> O                 | 500 ml qsp |

- 25 µl d'une solution phosphate 0,05 M (dilution au 1/10<sup>ème</sup> du tampon de 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 tyrosylés 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 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/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 Sephadex G50 équilibrée en tampon barbital sodique 0,07 M de pH 8,6 obtenu par dilution dans H<sub>2</sub>O (7:3 v/v) du tampon barbital sodique 0,1 M:

|                                                                |               |
|----------------------------------------------------------------|---------------|
| C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>3</sub> | : 20,6 g      |
| H <sub>2</sub> O                                               | : 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.

#### 4. Préparation 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 2 ml 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 d'un 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 dilué au 1/50<sup>ème</sup> dans le tampon phosphate 0,01 M EDTA, et 50 µl d'antigammaglobuline de lapin diluée au 1/5<sup>ème</sup> 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 0,01 M. Les tubes sont ensuite centrifugés 15 minutes à 2500 g. Le surnageant est enlevé par aspiration, la radioactivité du précipité est comptée.

°00°

## B I B L I O G R A P H I E

°00°

ALLEN, G. and GURNETT, L.P. (1983).

Locations of the six disulphide bonds in a variant surface glycoprotein (VSG 117) from Trypanosoma brucei.

Biochem. J., 209, 481-487.

AMES, B.N. (1966).

Assay of inorganic phosphate.

Methods Enzymol., 8, 115-118.

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.

ANOSA, V.O. (1983).

Diseases produced by Trypanosoma vivax in ruminants, horses and rodents.

Zol. Vet. Med., B30, 717-747.

ANOSA, V.O. and KANEKO, J.J. (1984).

Pathogenis of Trypanosoma brucei infection in deermica (peromyscus maniculatus). Light and electron microscopic study of testicular lesions.

Vet. Path., 21, 233-240.

APTED, P.I.C. (1970).

Clinical manifestation and diagnosis of sleeping sickness.

In : The african Trypanosomiasis Mulligan EW., POTTS W.H., (Eds) London, Allen and Unwin 661-683.

ARRICK, B.A., GRIFFITH, O.W. and CERAMI, A. (1981).

Inhibition of glutathione synthesis as a chemotherapeutic strategy for trypanosomiasis.

J. Exp. Med., 153, 720-725.

ASKONAS, B.A., F.R.S., and BANCROFT, G.J. (1984).

Interaction of african trypanosomes with the immune system.

Phil. Trans. R. Soc. Land, B307, 41-50.

AUFFREY, 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 concanavoline A pour Trypanosoma equiperdum. Applications à l'isolement de la fraction glycoprotéique spécifique du type antigénique.

Ann. Immunol. (Institut Pasteur), 127C, 761-774.

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

The variable surface glycoproteins of Trypanosoma equiperdum are phosphorylated.

EMBO J., 1, 1393-1398.

BAKER, J.R. (1974).

Epidemiology of african sleeping sickness in Trypanosomiasis and Leishmaniasis (Elsevier Ed.). Ciba Foundation Symposium, 20, 29-50.

BANGS, J.D., DOERING, T.L., ENGLUND, P.T., and HART, G.W. (1988).

Biosynthesis of a variant surface glycoprotein of Trypanosoma brucei. Processing of the glycolipid membrane anchor and N-linked oligosaccharides.

J. Biol. Chem. 263, 17697-17705.

BARTH, P. (1989).

A new method for the isolation of the trypanocidal factor from normal human serum.

Acta Tropica, 46, 71-73.

BERZOFSKY, J.A. (1988).

Structural basis of antigen recognition by T lymphocytes.

J. Clin. Investigation, 82, 1811-1817.

BLACK, S.J., SENDASHONGA, C.N., LALOR, P.A., WHITELOW, D.D., JACK, R.M., MORRISON, W.I., and MURRAY, M. (1983a).

Regulation of the growth and differentiation of Trypanosoma (Trypanozoon) brucei brucei in resistant (C57Bl/6) and susceptible (C3H/He) mice.

Parasite Immunol., 5, 465-478.

BLACK, S.J., JACK, R.M., and MORRISON, W.I. (1983b).

Host-parasite interactions with influence the virulence of Trypanosoma (Trypanozoon) brucei brucei organisms.

Acta Tropica, 40, 11-18.

BENSUSSAN, A. (1988).

Les lymphocytes T humains : un modèle unique de reconnaissance.

M.S., Spécial, 21-26.

BOOTHROYD, J.C., PAYNTER, C.A. COLEMAN, S.L. and CROSS, G.A.M. (1982).

Complete nucleotide sequence of cDNA coding for a variant surface glycoprotein from Trypanosoma brucei.

J. Mol. Biol., 157, 547-556.

BOOTHROYD, J.C. (1985).

Antigenic variation in African trypanosomes.

Ann. Rev. Microbiol., 39, 475-502.

BOVERIS, A., SIES, H., MARTINO, E.E., DOCAMPO, R., TURRENS, J.F. and STOPPANI, A.O.M. (1980).

Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in Trypanosoma cruzi.

Biochem. J., 188, 643-648.

BRAUER, M. and SYKES, B.D. (1984).

Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of phosphorylated proteins.

Methods Enz., 107, 36-81.

BRETT, C.T. and VOORHEIS, H.P. (1980).

Glycoprotein biosynthesis in Trypanosoma brucei. The glycosylation of glycoproteins located in and attached to the plasma membrane.

Eur. J. Biochem., 109, 139-150.

BULOW, R. and OVERATH, P. (1985).

Synthesis of hydrolase for the membrane-form variant surface glycoprotein is repressed during transformation of Trypanosoma brucei.

FEBS Lett., 187, 105-110.

BULOW, R. and OVERATH, P. (1986).

Purification and characterization of the membrane-form variant surface glycoprotein hydrolase of Trypanosoma brucei.

J. Biol. Chem., 261, 11918-11923.

BULOW, R., NONNENGASSER, C., and OVERATH, P. (1989).

Release of the variant surface glycoprotein during differentiation of bloodstream to procyclic form of Trypanosoma brucei.

Mol. Biochem. Parasitol., 32, 85-92.

CAMPBELL, G.H., ESSER, K.M. and PHILLIPS, M. (1982).

Parasite-(antigen) specific stimulation of B and T cells in African trypanosomes.

J. Immunol., 129, 1272-1274.

CAPBERN, A., GIROUD, C., BALTZ, T. and MATTERN, P. (1977).

Trypanosoma equiperdum : etude des variations antigéniques au cours de la trypanosome expérimentale du lapin.

Exp. Parasitol., 42, 6-13.

CARDOSO DE ALMEIDA, M.L. and TURNER, M.J. (1983).

The membrane form of variant surface glycoproteins of Trypanosoma brucei.

Nature, 302, 349-352.

CARMEL, P.W., ARAKI, S. and PEKIN, M. (1976).

Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys : evidence for pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone (Gn RH).

Endocrinology, 99, 243.

CARRINGTON, M., BULOW, R., REINKE, H. and OVERATH, P. (1989).

Sequence and expression of the glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase C of Trypanosoma brucei.

Mol. Biol. Parasitol. 33, 289-296.

CERDAN, S., HANSEN, C.A., JOHANSON, R., INUBUSHI, T. and WILLIAMSON, J.R. (1986).

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic analysis of myo-Inositol phosphates including inositol 1, 3, 4, 5 tetrakisphosphate.

J. Biol. Chem., 31, 14676-14680.

CHAROENVIT, Y., CAMPBELL, G.H. and TOKUDA, S. (1981).

Suppression of parasite antigen-specific lymphoid blastogenesis in African trypanosomiasis.

J. Immunol., 127, 2350-2354.

CILLARI, E., LIEW, F.Y. and LELCHUK, R. (1986).

Suppression of interleukin-2 production by macrophages in genetically susceptible mice infected with Leishmaniai major.

Infect. Immunity, 54, 386-394.

CLARKE, M.W., OLAFSON, R.W. and PEARSON, T.W., (1984).

Purification of major variable surface glycoproteins from african trypanosomes by reverse-phase high performance liquid chromatography.

Anal. Biochem., 142, 360-368.

CLARKE, M.W., OLAFSON, R.W. and PEARSON, T.W. (1985).

Rapid preparative scale purification of myristilated variant surface glycoprotein from african trypanosomes.

Mol. Biochem. Parasitol., 17, 19-34.

CLAYTON, C.E., SACKS, D.L., OLGIVIE, B.M. and ASKONAS, B.A. (1979).

Membrane fraction of trypanosomes mimic the immunosuppressive and mitogenic effect of living parasites on the host.

Parasit Immunol., 1, 241-249.

CLONEK, T., HENDERSON, T.O., HILDERBRAND, R.L., AND MYERS, T.C.

Biological phosphonates : determination by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance.

Science, 169, 192-194.

COMBARNOUS, Y. (1988).

Relations structure-activité des gonatropines.

Coll. Soc. Fr. Etudes. Fertil., 26, 5-24.



CORSINI, A.C., CLAYTON, C., ASKONAS, B.A. and OGIVIE, B.M. (1977).  
Suppressor cells and loss of B-cell potential in mice infected with  
Trypanosoma brucei.

Clin. Exp. Immunol., 29, 122-131.

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. (1977).

Isolation, structure and function of variant-specific surface antigens.

Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 57, 389-399.

CROSS, G.A.M. (1984).

Release and purification of Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein.

J. Cell. Biol., 24, 79-90.

DAUSON, M.J., CONROY, K., McQUATTIE, A. and STEVENSON, K.J.  
(1987).

Dihydrolipoamide deshydrogenase from Trypanosoma brucei 1<sup>C</sup>.

Biochem. J., 243, 661-665.

DAWSON, R.M.C., FREINKEL, N., JUNGALWALA, F.B. and CLARKE, N.  
(1971).

The enzymatic formation of myo-Inositol 1 : 2-cyclic phosphate from  
phosphatidylinositol.

Biochem. J., 122, 605-607.

DE GEE, A.L.W., LEVINE, R.F. and MANSFIELD, J.M. (1988).

Genetics of resistance to the African trypanosomes. VI. Heredity of resistance  
and variable surface glycoprotein - specific immune responses.

J. Immunol., 140, 293-288.

DEGOS, L. (1989).

Organisation générale de la réaction immunitaire.

M.S., supplément n° 1, 1-19.

DE RAADT, P. (1974).

Immunity and antigenic variation : clinical observations suggestive of immune phenomena in African trypanosomiasis.

in Trypanosomiasis and Leishmaniasis (Elsevier Ed). Ciba Foundation Symposium, 20, 199-224.

DIFFLEY, P. and JAWARDENA, N. (1982).

Comparative analysis of procedures used to isolate variant antigen from *Trypanosoma brucei rhodesiense*.

J. Parasitol., 68, 532-537.

DIFFLEY, P. (1983).

Trypanosomal surface coat variant antigen causes polyclonal lymphocyte activation.

J. Immunol., 131, 1983-1986.

DONELSON, J.E. (1988).

Unsolved mysteries of trypanosome antigenic variation in the biology of parasitism (Alan R. Liss Inc.) 371-400.

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

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

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

EDINGTON, G.M. and GILLES, H.M. (1969).

Pathology in the tropics.

Ed. by E. Arnold. London, 11, 1-951.

EGGE, H., GUNAWAN, J., PETERKATALINIC, J., SCHMITZ, B., DUNCAN, I.A. and KLEIN, R.A. (1986).

Structural investigations on the glycans of the variant surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei*. In : Topics in lipid research. From structural elucidations to biological function. R. Soc. Chem. London 149-157.

EMEH, J.K., and NDUKA, E.U. (1983).

Circulating serum levels of gonatropins in gambian sleeping sickness.

IRCS Medical, 11, 411.

ESURUOSO, G.O. (1976).

The demonstration in vitro of the mitogenic effects of trypanosomal antigen on the spleen cells of normal, athymic and cyclophosphamide-treated mice.

Clin. Exp. Immunol., 23, 314-317.

FAIRLAMB, A.H. and CERAMI, A. (1985a).

Identification of a novel thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids.

Mol. Biochem. Parasitol, 14, 187-198.

FAIRLAMB, A.H., BLACKBURN, P., ULRICH, P., CHAIT, B.T. and CERAMI, A. (1985b).

Trypanothione : A novel bis (glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatides.

Science, 227, 1485-1487.

FAUCONNET, M. and ROCHEMONT, J. (1978).

A single-column amino acid analysis method which resolves hexosamines and several cysteine derivatives.

Anal. Biochem., 91, 403-409.

FERGUSON, M.A.J. and CROSS, G.A.M. (1984).

Myristylation of the membrane form of a Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein.

J. Biol. Chem., 259, 3011-3015.

FERGUSON, M.A.J., HALDAR, K. and CROSS, G.A.M. (1985a).

Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein has a sn-1,2-dimyristyl glycerol membrane anchor at its COOH terminus.

J. Biol. Chem., 260, 4963-4968.

FERGUSON, M.A.J., LOW, M.G. and CROSS, G.A.M. (1985b).

Glycosyl-sn-1,2-dimyristyl phosphatidylinositol is covalently linked to Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein.

J. Biol. Chem., 260, 14547-14555.

FERGUSON, M.A.J., HOMANS, S.W., DWEK, R.A., RADEMACHER, T.W. (1988).

Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein to the membrane.

Science, 239, 753-759.

FERIN, M. and VAN DE WIELE, R.L. (1982).

Contrôle neuro endocrinien de la fonction gonadotrope.

ed. Flammarion Medecine/Sciences, Presse de l'Université de Montréal 1-14.

FISH, W.R., MURIUKI, C.W., MUTHIANI, A.M., GRAB, D.J. and LONSDALE-ECCLES, J.D. (1989).

Disulfide bond involvement in the maintenance of the cryptic nature of the cross-reacting determinant of metacyclic forms of Trypanosoma congolense.

Biochem., 28, 5415-5421.

FOX, J.A., DUSZENKO, M., FERGUSON, M.A.J., LOW, M.G. and CROSS, G.A.M. (1986).

Purification and characterization of a novel glycan-phosphatidylinositol specific phospholipase C from Trypanosoma brucei.

J. Biol. Chem., 261, 15767-15771.

FREEMANN, J., HUDSON, K.M., LONGSTAFFE, J.A. and TERRY, R.J. (1973).

Immunodepression in trypanosome infections.

Parasitologie, 67, 23.

FREYMAN, D.M., METCALF, P., TURNER, M., and WILEY, D.C. (1984).

6 Å<sup>o</sup>- Resolution X-ray structure of a variable surface glycoprotein from Trypanosoma brucei.

Nature, 311, 167-169.

FROMMEL, T.O. and BALBER, A.E. (1987).

Trypanosoma brucei brucei, T. brucei gambiense, and T. brucei rhodesiense : common glycoproteins and glycoprotein oligosaccharide heterogeneity identified by lecting affinity blotting and endoglycosidase H treatment.

Exp. Parasitol., 63, 32-41.

GASBARRE, L.C., HUG, K. and LOUIS, J.A. (1980).

Murine T lymphocyte specificity for African trypanosomes. I. Induction of a T lymphocyte-dependent proliferative response to Trypanosoma brucei.

Clin. Exp. Immunol., 41, 97-106.

GASBARRE, L.C., HUG, K. and LOUIS, J. (1981).

Murine T lymphocyte specificity for African trypanosomes. II. Suppression of the T lymphocyte proliferative response to Trypanosoma brucei by systemic trypanosome infection.

Clin. Exp. Immunol., 45, 165-172.

GBENLE, G.O., OPPERDOES, F.R., VAN ROY, J. (1986).

Localization of 3'-nucleotidase and calcium-dependent endoribonuclease in the plasma-membrane of Trypanosoma brucei.

Acta Tropica, 43, 295-305.

GENTILINI, M. et DUFLO, B. (1973).

Trypanosomases africaines in : Encyclopédie médico-chirurgicale thérapeutique. Paris 25070-C.10.

GILLETT, M.P.T. and OWEN, J. (1987).

Binding of human plasma lipoproteins by Trypanosoma brucei brucei.

Biochem. Soc. Trans., 15, 135.

GOODWIN, L.G., GREEN, D.G., GUY, M.W. and VOLLER, A. (1972).

Immunosuppression during trypanosomiasis.

Br. J. Exp. Path., 53, 40-43.

GOODWIN, L.G. (1974).

The African scene : mechanisms of pathogenesis in trypanosomiasis in Trypanosomiasis and Leishmaniasis (Elsevier ed) Ciba Foundation Symposium, 20, 108-124.

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 variant surface glycoprotein of Trypanosoma brucei.

Arch. Biochem. Biophys., 249, 427-436.

GRAB, D.J., WEBSTER, P. and VERJEE, Y. (1984).

The intracellular pathway and assembly of newly formed variable surface glycoprotein of Trypanosoma brucei.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7703-7707.

GRAB, D.J., WEBSTER, P., ITO, S., FISH, W.R., VERJEE, Y. and LONSDALE-ECCLES, J.D. (1987).

Subcellular localization of a variable surface glycoprotein phosphatidylinositol-specific phospholipase-C in African trypanosomes.

J. Cell. Biol., 105, 737-746.

GREENWOOD, F., HUNTER, W. and GLOBER, S. (1963).

Preparation of <sup>131</sup>I labelled human growth hormone of high specific radioactivity.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 54, 440-448.

GREENWOOD, B.N., WHITTLE, H.C. and MOLYNEUX, D.H. (1973).

Immunosuppression in Gambian Trypanosomiasis.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 67, 846-850.

GURNETT, A.M., WARD, J., RAPER, J. and TURNER, M.J. (1986).

Purification and characterization of membrane-form variant glycoproteins of Trypanosoma brucei.

Mol. Biochem. Parasitol., 20, 1-13.

HAJDUK, S.L., MOORE, D.R., VASUDEVACHARYA, J., SIQUERIA, H., TORRI, A.F., TYTLER, E.M. and ESKO, J. (1989).

Lysis of Trypanosoma brucei by a toxic subspecies of human high density lipoprotein.

J. Biol. Chem., 264, 5210-5217.

HAREL-BELLAN, A., JOSKOWILZ, M., FRADELIZI, D. and EISEN, H. (1983).

Modification of T cell proliferation and interleukin-2 production in mice infected with Trypanosoma cruzi.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 80, 3466-3469.

HENDERSON, G.B., FAIRLAMB, A.H., ULRICH, P. and CERAMI, A. (1987a).  
Substrate specificity of the flavoprotein trypanothione disulfide reductase from  
Crithidia fasciculata.

Biochemistry, 26, 3033-3027.

HENDERSON, G.B. and FAIRLAMB, A.H., (1987b).

Trypanothione metabolism : a chemotherapeutic target in trypanosomatids.

Parasitol. Today, 3, 312-315.

HENSSEN, C. and DOWDLE, E.R. (1980).

Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels  
containing sodium docecyl sulfate and copolymerized substrates.

Analytical Biochemistry, 102, 196-202.

HERELD, D., KRAKOW., J.L., BANGS, J.D., HART, G.W. and ENGLUND,  
P.T. (1986).

A phospholipase C from Trypanosoma brucei which selectively cleaves the  
glycolipid on the variant surface glycoprotein.

J. Biol. Chem., 261, 13813-13819.

HOARE, C.A. (1972).

The trypanosomes of mammals.

Blackwell Scientific Publications Oxford and Edinburgh.

HOLDER, A.A. and CROSS, G.A.M. (1981).

Glycopeptides from variant surface glycoproteins of Trypanosoma brucei.  
C-terminal localisation of antigenically cross-reacting carbohydrate moieties.

Mol. Biochem. Parasitol., 2, 135-150.

HOMANS, S.W., EDGE, C.J., FERGUSON, M.A.J., DWEK, R.A. and  
RADEMACHER, T.W. (1989).

Solution structure of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor glycan  
of Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein.

Biochem., 28, 2881-2887.

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

Fonction endocrine et trypanosomiase africaine.

Bull. Soc. Path. Ex., 81, 468-476.

HUBLART-SINSOILLIER, M. (1989).

Hypogonadisme et trypanosomiase africaine.

Thèse doctorat Sciences.

HUDSON, K.M., BYNER, C., FREEMAN, J. and TERRY, R.J. (1976).

Immunodepression, high IgM levels and evasion of the immune response in murine trypanosomiasis.

Nature, 264, 256-258.

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

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

Exp. Parasitol., 67, 31-38.

IKEDE, B.O. and LOSOS, G.J. (1972).

Pathology of the disease in sheep produced experimentally by Trypanosoma brucei.

Vet. Path., 9, 278-289.

IKEDE, B.O. (1979).

Genital lesions in experimental chronic Trypanosoma brucei infection in rams.

Res. Vet. Sci., 26, 145-151.

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 diminaz aceturate.

Res. Vet. Sci., 32, 374-376.

ISOUN, T.T. and ANOSA, V.O. (1974).

Lesions in the reproductive organs of sheep infected with Trypanosoma vivax.

2. Tropenmed. parasit., 25, 469-476.

ITAYA, K. and MICHIO, U. (1966).

A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate.

Clin. Chim. Acta, 14, 361-366.



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 glycoproteins from Trypanosoma brucei.  
Biochem. J., 230, 195-202.

JENKINS, G.C. and FACER, C.A. (1985).

Hematology of African Trypanosomiasis in Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis.

(Ian Tizard ed) CRC Press Inc., 13-44.

JI, I., BOCK, J.H. and JI, T.H. (1985).

Composition and peptide maps of cross-linked human choriogonadotropin receptor complexes on porcine granulosa cells.

J. Biol. Chem., 260, 1281-1282.

JOHNSON, J.G. and CROSS, G.A.M. (1979).

Selective cleavage of variant surface glycoproteins from Trypanosoma brucei.  
Biochem. J., 178, 689-697.

JULIUS, M.H., SIMPSON, E. and HERZENBERG, L.A. (1973).

A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes.

Eur. J. Immunol., 3, 645.



KAAYA, G.P. and ODUOR-OKELD, D. (1980).

The effects of Trypanosoma congolense infection on the testis and epididymis of goat.

Bull. Anim. Health Prod. Afr., 28, 1-5.

KAMERLING, J.P., GERWIG, G.J. and VLIEGENTHART, J.F.G. (1979).

Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methylglycosides obtained in the methanolysis glycoproteins and glycopeptides.

Biochem. J., 151, 491-495.

KRAUTH-SIEGEL, R.L., ENDERS, B., HENDERSON, G.B., FAIRLAMB, A.H. and SCHIRMER, R.H. (1987).

Trypanothione reductase from Trypanosoma cruzi.

Eur. J. Biochem., 164, 123-128.

KNOWLES, G., BLACK, S.J. and WHITELOW, D.D. (1987).

Peptidase in the plasma of mice with Trypanosoma brucei brucei.

Parasitology, 95, 291-300.

KNOWLES, G., ABEBE, G. and BLACK, S.J. (1989).

Detection of parasite peptidase in the plasma of heifers infected with Trypanosoma congolense.

Mol. Biochem. Parasitol., 34, 25-34.

KRUMMEN, L.A. and BALDWIN, D.M. (1988).

Regulation of luteinizing hormone subunit biosystems in cultured male anterior pituitary cells : effects of gonadotropin-releasing hormone and testosterone.

Endocrinology, 123, 1868-1878.

LAEMMLI, U.K. (1970).

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>.

Nature, 227, 680-681.

LABUSQUIERE, R., DUTERTRE, J. and GATEFF, C. (1971).

Les trypanosomes humaines africaines.

Encyclopédie Médico-chirurgicale (Paris) 8095, A10, 9, 1-14.

LALOR, T.M., KJELDGAARD, M., SHIMAMATO, G.T., STRICKLER, J.E., KONIGSBERG, W.H. and RICHARDS, F.F. (1984).

Trypanosome variant-specific glycoproteins : A polygene protein family with multiple folding patterns.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 998-1002.

LANHAM, S.M. and GODFREY, D.G. (1970).

Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose.

Exp. Parasitol., 28, 521-534.

LEEFLANG, P. (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.

LETCH, C.A. and GIBSON, W. (1981).

Trypanosoma brucei : the peptidases of bloodstream trypanosomes.

Exp. Parasitol., 52, 86-90.

LI, C.H. and STARMAN, B. (1964).

Molecular weight of sheep pituitary interstitial cell-stimulating hormone.

Nature, 202, 291-292.

LIU, W.K. and WARD, D.N. (1976).

Effect of selective nitration on ovine lutropin on the subunit association and biological activity of the hormone.

J. Biol. Chem., 251, 316-319.

LONSDALE-ECCLES, J.D. and MPIMBAZA, G.W.N. (1986).

Thiol-dependent proteases of African trypanosomes.

Eur. J. Biochem., 155, 469-473.

LONSDALE-ECCLES, J.D. and GRAB, D.J. (1987).

Lysosomal and non-lysosomal peptidyl hydrolases of the bloodstream forms of Trypanosoma brucei brucei.

Eur. J. Biochem., 169, 467-475.

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.

LUMSDEN, W.H.R. (1974).

Leishmaniasis and trypanosomiasis : the causative organisms compared and contrasted in Trypanosomiasis and Leishmaniasis.

(Elsevier ed) Ciba Foundation Symposium 20, 3-27.

MACFIE, J.W.S. (1913)

Trypanosomiasis of domestic animals in Northern Nigeria.

Ann. Trop. Med. parasit., 7, 1-39.

MAGNUS, E., LE RAY, D. and VAN MEIRVENNE, N. (1983).

Variable antigen repertoires of Trypanosoma (T.) brucei in Proceedings of Symposium on the diagnosis of african sleeping sickness due to T. gambiense.

(Antwerp 16-17 nov.), 39-44.

MANSFIELD, J.M., (1978).

Immunology of African trypanosomiasis.

Cell. Immunol., 39, 204-210.

MANSFIELD, J.M. and BAGASRA, D. (1978).

Lymphocyte function in experimental african trypanosomiasis. I.B. cell responses to helper T cell-independent and -dependent antigens.

J. Immunol., 759-765.

MARTIN, R.B., VOORHEIS, P.H. and KENNEDY, E.L. (1978)

Adenylate cyclase in bloodstream forms of Trypanosoma (Trypanozoon) brucei sp.

Biochem. J., 175, 207-212.

MASAKE, R.A. (1980).

The pathogenesis of infection with Trypanosoma vivax in goats and cattle.

Vet. Rec., 107, 551-557.

MAUDLIN, I. and WELBURN, S.C. (1988).

Tsetse immunity and the transmission of trypanosomiasis.

Parasitol. Today, 4, 109-111.

Mc CONNEL, J., TURNER, M. and ROVIS, L. (1983).

Biosynthesis of Trypanosoma brucei variant surface glycoproteins analysis of carbohydrate heterogeneity and timing of post-translational modifications.

Mol. Biol. Parasitol., 8, 119-135.

Mc LAUGHLIN J. (1985).

A high affinity  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATPase in the surface membrane of the bloodstream stage of Trypanosoma rhodesiense.

Mol. Biochem. Parasitol., 15, 189-201.

MAITES, J. KAHN, R.H., and NICOLL, C.S. (1961).

Prolactin production by rat pituitary in vitro.

Proc. Soc. Exp. Biol., 108, 440-443.

MESHNICK, S.R., BLOBSTEIN, S.H., GRADY, R.W. and CERAMI, A. (1978).

An approach to the development of new drugs for african trypanosomiasis.

J. Exp. Med., 148, 569-579.

METCALF, P., BLUM, M., FREYMAN, D., TURNER, M. and WILEY, D.C. (1987).

Two variant surface glycoproteins of Trypanosoma brucei of different sequence classes have similar 6Å resolution X-ray structures.

Nature, 325, 84-87.

MITCHELL, L.A., PEARSON, T.W. and GAULDIE J. (1986).

Interleukin-1 and interleukin-2 production in resistant and susceptible inbred mice infected with Trypanosoma congolense.

Immunol., 57, 291-296.

MONTREUIL, J., BOUQUELET, S., DEBRAY, H., FOURNET, B., SPIK, G. and STRECKER, G. (1986)

In : Carbohydrate analysis. Practical approach. Champlin, M.S., N. Kennedy J.S., Eds IRL Press, Oxford, 143-204.

MORRISON, W.I., MURRAY, M. and AKOL, G.W.O. (1985).

Immune responses of cattle to African trypanosomes in immunology and pathogenesis of Trypanosomiasis.

(Ian Tizard ed.) CRC Press, Inc., 103-131.

MULLA, A.F. and RICKMAN, L.R. (1988).

How do African game animals control trypanosome infections ?

Parasitol. Today, 4, 352-354.

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.

NIELSEN, K. H. (1985).

Complement in Trypanosomiasis in Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis (Ian Tizard ed.) CRC Press Inc., 133-144.

NORTH, M.J., COOMBS, G.H. and BARRY, J.D. (1983).

A comparative study of the proteolytic enzymes of Trypanosoma brucei, T. equiperdum, T. evansi, T. vivax, Leishmania tarentolae and crithidia fasciculata.

Mol. Biochem. Parasitol., 9, 161-180.

NWAGWU, M., OKENU, D.M.N., OLUSI, T.A. and MOLOKWU, R.I. (1988).

Trypanosoma brucei releases proteases extracellularly.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 82, 577.

OLAFSON, R.W., CLARKE, M.W., KIELLAND, S.O., BARBET, A.F., McGuire, T.D. (1984).

Amino terminal sequences homologies amongst variant surface glycoproteins of the African trypanosomes.

Mol. Biochem. Parasitol., 2, 287-298.

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. Parasitol., 52, 427-439.

PAMER, E.G., SO, M. and DAVIS, C.E. (1989)

Identification of a developmentally regulated cysteine protease of Trypanosoma brucei.

Mol. Biochem. Parasitol., 33, 27-32.

PASTEELS, J.L. (1961).

Premiers résultats de culture combinée in vitro d'hypophyse et d'hypotalamus dans le but d'apprécier la sécrétion de prolactine.

C.R. Acad. Sci. (Paris), 253, 3074-3075.

PAYS, E., VAN ASSEL, M.L., DARVILLE, M., VERVOORT, T., VAN MEIRVENNE, N. AND STEINERT, M. (1983a)

Gene conversion as a mechanism for antigenic variation in trypanosomes.

Cell, 34, 371-381.

PAYS, E., DELAUW, M.F., VAN ASSEL, S., LAURENT, M., VERVOORT, T., VAN MEIRVENNE, N. and STEINERT, M. (1983b).

Modifications of a Trypanosoma b. brucei antigen gene repertoire by different DNA recombinational mechanisms.

Cell, 35, 721-731.

PAYS, E. (1988)

Expression of variant specific antigen genes in African trypanosomes.

Biol. Cell, 64, 121-130.

PENKE, B., FERENCZI, R. and KOWACS, K. (1984).

A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins.

Analytical Biochemistry., 60, 45-50.

PENKETH, P.G. and KLEIN, R.A. (1986).

Hydrogen peroxide metabolism in Trypanosoma brucei.

Mol. Biochem. Parasitol., 20, 111-121.

PENKETH, P.G., KENNEDY, W.P.K., PATTON, C.L., SARTORELLI, A.C. (1987).

Competent metabolic utilization of hydrogen peroxide by trypanosomes.

Acta Tropica, 44, 461-462.

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.

REINER, N.E. and FINKE, J.H. (1983).

Interleukin-2, deficiency in murine Leishmaniasis donovani and its relationship to depressed spleen cell response to phytohaemagglutinin.

J. Immunol., 131, 1487-1491.

REINWALD, D.E., RAUTENBERG, P. and RISSE, H.J. (1981).

Purification of the variant antigens of Trypanosoma congolense. A new approach to the isolation of glycoproteins.

Biochem. Biophys. Acta, 668, 119-131.

RICE-FICHT, A.C., CHEN, K.K., DONELSON, J.E. (1981).

Sequence homologies near the C-termini of the variable surface glyco proteins of Trypanosoma brucei.

Nature, 294, 53-57.

RIDET, J. (1953).

Etude des troubles du cycle menstruel chez la femme trypanosomée à l'aide de frottis vaginaux.

Médecine tropicale, 13, 514-519.

RIFKIN, M.R. (1978).

Identification of the trypanocidal factor in normal human serum : high density lipoprotein.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3450-3454.

RIFKIN, M.R. (1983).

Interaction of high-density lipoprotein with Trypanosoma brucei : effect of membrane stabilizers.

J. Cell. Biochem, 23, 57-70.

RIFKIN, M.R. (1984).

Trypanosoma brucei : biochemical and morphological studies of cytotoxicity caused by normal human serum.

Exp. Parasitol., 58, 81-93.

ROELANTS, G.E. and PINDER, M. (1987).

The virulence of Trypanosoma congolense can be determined by the antibody response of inbred strains of mice.

Parasite Immunol., 9, 379-388.



ROTTENBERG, M., LINDQUIST, C., KOMAN, A., SEGURA, E.L. and ORN A. (1989).

Modulation of both Interleukin-2 receptor expression and Interleukin-2 production during experimental murine Trypanosoma cruzi infection. Scandinavian J. Immunol., 30, 65-73.

ROVIS, L., BARBET, A.F., WILLIAMS, R.O. (1978).

Characterization of the surface coat of Trypanosoma congolense. Nature, 271, 654-656.

ROVIS, L. and BAEKKESKOV, S. (1980)

Sub-cellular fractionation of Trypanosoma brucei. Isolation and characterization of plasma membranes. Parasitology, 80, 507-524.

RURANGIRWA, F.R., MUSOKE, A.J., NANTULYA, V.M., NKONGE, C., NJUGUNA, L., MUSHI, E.Z., KARSTAD, L., GROOTENHUIS, J. (1986).

Immune effector mechanisms involved in the control of parasitemia in Trypanosoma brucei infected wildebeest (Connochaetes taurinus). Immunology, 58, 231-277.

SACKS, D.L., SELKIRK, M., OGILVIE, B.M. and ASKONAS, B.A. (1980).

Intrinsic immunosuppressive activity of different trypanosome strains varies with parasite virulence. Nature, 283, 476-478.

SEED, J.R. and SECHELSKI, J. (1987).

The role of antibody in African trypanosomiasis. J. Parasit., 73, 840-842.

SEED, J.R. and SECHELSKI, J.B. (1989).

African trypanosomes : inheritance of factors involved in resistance. Exp. Parasitol., 69, 1-8.

SENDASHONGA, C.N. and BLACK, S.J. (1982).

Humoral responses against Trypanosoma brucei variable surface antigen are induced by degenerating parasites. Parasite Immunol., 4, 245-257.

SHAMES, S.L., FAIRLAMB, A.H., CERAMI, A. and WALSH, C.T. (1986).  
Purification and characterization of trypanothione reductase from Crithidia fasciculata, a newly discovered member of the family of disulfide-containing flavoprotein reductases.

Biochemistry, 25, 3519-3526.

SHAMES, S.L., KIMMEL, B.E., PEOPLES, O.P., AGABIAN, N. and WALSH, C.T. (1988).

Trypanothione reductase of Trypanosoma congolense : gene isolation, primary sequence determination, and comparison to glutathion reductase.

Biochemistry, 27, 5019-5026.

SILEGHEM, M., HAMERS, R. and DE BAETSELIER, P. (1986).

Active suppression of interleukin-2 secretion in mice infected with Trypanosoma brucei AnTat 1.1.E.

Parasite Immunol., 8, 641-649.

SILEGHEM, M., HAMERS, R. and DE BAETSELIER, P. (1987).

Experimental Trypanosoma brucei infections selectively suppress both interleukin-2 receptor expression.

Eur. J. Immunol., 17, 1417-1421.

SILEGHEM, M., DARJI, A., REMELS, L., HAMERS, R. and DE BAETSELIER, P. (1989).

Different mechanisms account for the suppression of interleukin 2 receptor expression in Trypanosoma brucei infected mice.

Eur. J. Immunol., 19, 119-124.

SMITH, K.A. (1988).

Interleukin-2 : inception, impact, and implications.

Science, 240, 1169-1176.

STEIGER, R.F., OPPERDOES, F.R. and BONTEMPS, J. (1980).

Subcellular fractionation of Trypanosoma brucei bloodstream forms with special reference to hydrolases.

Eur. J. Biochem., 105, 163-175.

STRANG, A.M., WILLIAMS, J.M., FERGUSON, M.A.J., HOLDER, A.A. and ALLEN, A.K. (1986).

Trypanosoma brucei brucei variant surface glycoprotein contains non-N-acetylated glucosamine.

Biochem. J., 234, 481-484.

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.

STRICKLER, J.E., PATTON, C.L. (1980).

Trypanosoma brucei : Inhibition of glycosylation of the major variable surface glycoprotein by tunicamycin.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77, 1529-1553.

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.

STROBER, W. and JAMES, S.P. (1988).

The interleukins.

Pediatric Res., 24, 543-557.

TARTELTON, R.L. and KUHN, R.E. (1984).

Restoration of in vitro immune responses of spleen cells from mice infected with Trypanosoma cruzi by supernatants containing interleukin-2.

J. Immunol., 133, 1570-1575.

TURNER, M.J. (1988).

Trypanosome variant surface glycoprotein in : The biology of parasitism. (Alan R. Liss, Inc) 349-369.

VAESSEN, R.T.M.J., KREIKE, J., GROOT, G.S.P. (1981).

Protein transfer to nitrocellulose filters.

FEBS Lett., 124, 193-196.

VAN DER PLOEG, L.H.T., VALERIO, D., DELANGE, T., BERNADS, A., BORST, P. and GROSVELD, F.G. (1982).

An analysis of cosmid clones of nuclear DNA from Trypanosoma brucei shows that the genes for VSGs are clustered in the genome.

Nucleic Acids Res., 10, 5905-59023.

VERVOORT, T., BARBET, A.F., MUSOKE, A.J., MAGNUS, E., MPIMBAZA, G. and VAN MEIRNVENNE, N. (1981).

Isotopic surface glycoproteins of trypanosomes.

Immunol., 44, 223-232.

VICKERMAN, K. and LUCKINS, A.G. (1969).

Localization of variable antigens in the surface coat of Trypanosoma brucei using ferritin conjugated antibody.

Nature, 224, 1125-1126.

VICKERMAN, K. (1985).

Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes.

Br. Med. Bull., 4, 105-114.

VOORHEIS, H.P., GALE, J.S., OWEN, M.J. and EDWARDS, W. (1979).

The isolation of the plasma membrane from Trypanosoma brucei.

Biochem. J., 180, 11-24.

VOORHEIS, H.P. and MARTIN B.R., (1980).

"Swell dialysis" demonstrates that adenylate cyclase in Trypanosoma brucei is regulated by calcium ions.

Eur. J. Biochem., 113, 223-227.

VOORHEIS, H.P. and MARTIN, B.R. (1982).

Local anaesthetics including benzyl alcohol activate the adenylate cyclase in Trypanosoma bucei by a calcium-dependent mechanisms.

Eur. J. Biochem., 123, 371-376.

WAINDI, E.N., GOMBE, S. and ODUOR-OKELO, D. (1986).

Plasma testosterone in Trypanosoma congolense infected toggerburg goats.

Arch. Andrology, 17, 9-17.

WAKELIN, D. (1984).

Immunity to Parasites : How animals control parasite infections.

Edvard Arnold Ed., London, VIII p. 9-27.

WEIGENT, D.A. and BLALOCK, J.E. (1989).

Structural and functional relationships between the immune and neuroendocrine systems.

Bull. Inst. Pasteur, 87, 62-92.

WELLHAUSEN, S.R. and MANSFIELD, J.M. (1979).

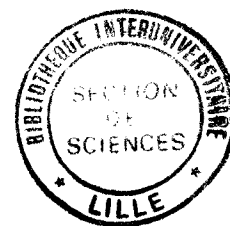
Lymphocyte function in experimental African trypanosomiasis. II. Splenic suppressor cell activity.

J. Immunol., 122, 818-824.

WELLHAUSEN, S.R. and MANSFIELD, J.M. (1980).

Lymphocyte function in experimental African trypanosomes. III. Loss of lymph node cell responsiveness.

J. Immunol., 124, 1183-1186.





BOUTIGNON Francois

APPROCHE BIOCHIMIQUE DES DEFICITS IMMUNITAIRES ET ENDOCRINIENS  
OBSERVES AU COURS DE L'INFESTATION EXPERIMENTALE DU RAT PAR  
*Trypanosoma brucei brucei*.

BIOCHEMICAL STUDY OF IMMUNOLOGICAL AND ENDOCRINOLOGICAL  
DISORDERS DURING RAT EXPERIMENTAL INFECTION WITH *Trypanosoma brucei*  
*brucei*.

Thèse de Doctorat en Biochimie - Lille Flandres Artois - 1989.

Mots-clés: *Trypanosoma brucei brucei* - Trypanosomiase africaine -  
Immunosuppression - Déséquilibre endocrinien - Antigène variable de  
surface - Relation hôte-parasite - Enzymes protéolytiques

---

#### RESUME DE LA THESE

La trypanosomiase humaine africaine, due à l'infestation par le protozoaire *Trypanosoma brucei gambiense*, se traduit par une atteinte profonde de systèmes immunitaire et endocrinien. Utilisant un modèle expérimental (*T.b.brucei*/rat), nous avons caractérisé les constituants de surface parasitaire, et étudié leur rôle dans l'apparition de dysfonctionnements endocrinien et immunitaire. La surface du parasite est représentée en majorité par une glycoprotéine de masse moléculaire 60Kd, existant en solution à l'état de dimère sensible aux agents réducteurs (AVS, antigène variable de surface). Au cours des différentes étapes de préparation de la glycoprotéine, des activités enzymatiques sont décrites : thiol protéase, sérine protéase, AVS thiol réductase. Sur le plan immunologique, l'étude in vitro révèle que l'AVS constitue l'élément actif principal, stimulant directement la prolifération des lymphocytes T, probablement par l'intermédiaire de récepteurs de surface. Cependant, si l'AVS est capable de stimuler la production d'interleukine 2 (IL-2) et l'expression de son récepteur, l'effet de la lymphokine sur les cellules incubées avec l'AVS est modifié. Sur le plan endocrinien, les expériences menées in vivo et in vitro indiquent un effet inhibiteur direct, lié à l'AVS, au niveau de la libération d'hormones gonadiques, et un effet direct, lié aux activités enzymatiques, provoquant la dégradation de l'hormone lutéinisante.

---

#### JURY

Président : Professeur J. MONTREUIL

Rapporteurs : Professeurs J.P. DESSAINT et B. FOURNET

Examineurs : Professeurs F. GAUTHIER et P. DEGAND