

50376
1993
157

50376
1993
157

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

Année 1993

N° d'ordre : 1120

THESE de DOCTORAT D'UNIVERSITE
présentée à l'Université de Lille I
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

Benoît SOUDAN

EXPLORATION DES ANOMALIES DE L'AXE
HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-GONADIQUE
AU COURS DE LA TRYPANOSOMIASE AFRICAINE
CHEZ LE RAT

présentée le 26 Mai 1993 devant la commission d'examen



JURY



Président : Professeur André VERBERT
Rapporteurs : Docteur Annette BERAULT
 Docteur Serge CARREAU
Membres : Professeur Arnold BOERSMA
 Professeur Maurice PORCHET

Nos travaux ont bénéficié des aides financières

-du programme spécial PNUD/Banque mondiale/OMS de Recherche et de Formation
concernant les Maladies Tropicales (T 70 18123)

-et de la Faculté de Médecine de l'Université de Lille II

Je remercie Monsieur le Professeur Degand (Université de Lille II) de m'avoir accueilli à l'Unité INSERM n°16

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Boersma (Université de Lille II) qui m'a accepté dans son laboratoire et a orienté mes recherches ainsi qu'au Docteur Tetaert (INSERM, Lille) sans les conseils et l'aide duquel ce travail n'aurait pu être mené convenablement.

Je remercie également :

- Mes deux rapporteurs : Le Docteur Carreau (CNRS, CAEN), pour la qualité de son accueil au sein de son laboratoire ainsi que pour son enseignement de la pratique des cultures de cellules de Leydig

Le Docteur Berault (CNRS, GIF s/Yvette), pour sa collaboration dans le domaine de l'étude des gonadotrophines hypophysaires.

- Messieurs les Professeurs Verbert et Porchet (Université de Lille I) pour avoir accepté de lire ce travail et de constituer ce jury.

Enfin, je remercie :

- Le Docteur Racadot pour ses encouragements et l'aide technique apportée dans le laboratoire des USN de Lille pour le dosage des stéroïdes sériques et des récepteurs testiculaires de la LH .

- Tous les membres de l'équipe de l'Unité pour leur collaboration, mais aussi pour la très bonne ambiance qu'ils ont chacun entretenue.

COMMUNICATIONS ORALES ET POSTERS :

- Soudan B., Hublart M., Tetaert D., Croix D., Boersma A. et Degand P. Effet sur l'axe gonadique du rat de l'Antigène Variable de *Trypanosoma brucei brucei* (AnTat 1.1 A). XVII^o forum des jeunes chercheurs (Villeneuve d'Ascq le 6 juillet 1990, Communication orale).

- Hublart M., Tetaert D., Croix D., Boutignon F., Soudan B., Degand P. et Boersma A. Retentissements sur l'axe gonadotrope de la trypanosomiase expérimentale par *Trypanosoma brucei brucei* chez le rat. VII^{ème} Congrès International de Parasitologie (Paris du 20 au 24 aout 1990, Communication par affiche)

-Soudan B., Tetaert D., Racadot A., Degand P. et Boersma A. Récepteurs testiculaires de la LH et trypanosomiase africaine. XIX^o forum des jeunes chercheurs (Caen du 7 au 10 juillet 1992, Communication orale).

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

PUBLICATIONS :

- Huet G., Richet C., Demeyer D., Bisiau H., Soudan B., Tetaert D., Han K.K. and Degand P. Characterization of different proteolytic activities in *Trypanosoma brucei brucei*. Biochim. Biophys. Acta (1992), 1138, 213-221.

- Soudan B., Tetaert D., Racadot A., Degand P. and Boersma A. Decrease of testosterone level during an experimental African trypanosomiasis: involvement of a testicular LH receptor desensitization. Acta Endocrinol. (1992), 127, 86-92.

- Tetaert D., Soudan B., Huet-Duvillier G., Degand P. and Boersma A. Unusual cleavage of peptidic hormones generated by trypanosome enzymes released in infested rat serum. Int. J. Peptide Protein. Res. (1993), 41, 147-152.

- Soudan B., Boersma A., Degand P. and Tetaert D. Mini review : Hypogonadism induced by African trypanosomes in humans and animals. Comp. Biochem. Physiol. (1993), 104-A, 757-763.

- Soudan B., Tetaert D., Hublart M., Racadot A., Croix D. and Boersma A. Experimental "chronic" African trypanosomiasis: Endocrine dysfunctions generated by parasitic components released during the trypanolytic phase in rats. Exp. Clin. Endocrinol. soumis pour publication.

ABREVIATIONS

3 β -HSD :	Δ^5 -3 β -HydroxyStéroïde Déshydrogénase
α -MSH :	α -Melanocyte Stimulating Hormone
ABP :	Androgen Binding Protein
ACTH :	Adrenocorticotropic Hormone
AC :	Anticorps
ACE :	Enzyme de conversion de l'angiotensine
AMC :	7-amino-4-methylcoumarine
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm :	ARN messenger
AVS :	Antigène Variable de Surface du trypanosome
A II :	Angiotensine II
CBP :	Protéine de liaison des corticostéroïdes
CG :	Gonadotrophine Chorionique
CLHP :	Chromatographie liquide haute performance
CRF :	Corticotropin Releasing Factor
db-AMPc :	Dibutyl AMPc (N ⁶ ,2'-O- dibutyladénosine 3':5' monophosphate cyclique)
DFMO :	α -difluorométhylornithine
DFP :	Di-isopropyl fluorophosphate
DAG :	Diacylglycérol
DHEA :	Dehydroépiandrostérone
DMSO :	Diméthyle sulfoxyde
DTT :	Dithiothreitol
E-64 :	L-trans-époxy succinyl-leucinamido-(4-guanidino)-butane
E2 :	Oestradiol-17 β
EDTA :	Ethylène diamine tétracétate

EGF :	Epidermal Growth Factor
FAB-MS :	Spectrométrie de masse "Fast Atom Bombardment"
FGF :	Fibroblast Growth factor
FSH :	Follicle Stimulating Hormone
FSH-RF :	FSH-Releasing Factor
GAP :	Gonadotropin Associated Peptide
GH :	Growth Hormone
GRF :	Growth hormone Releasing Factor
hCG :	Gonadotrophine Chorionique humaine
Hom1 :	Homogénat H1
IGF-I :	Insulin-like Growth Factor-I
IgM :	Immunoglobuline M
IL-1 :	Interleukine-1
IL-6 :	Interleukine-6
IP-3 :	Inositol triphosphate
i.p :	intrapéritonéal
LHRHa :	agoniste de la LHRH (des-Gly ¹⁰ , [D-Ala ⁶]-Luteinizing Hormone Releasing Hormone éthylamide)
LH :	Luteinizing Hormone
LHRH :	Luteinizing Hormone Releasing Hormone
MES :	Acide 2-[N-Morpholino]éthanesulfonique
NAD :	β-Nicotinamide Adenine Dinucléotide
NBT :	Nitrobleu de tétrazolium = chlorure de 2, 2'-Di-p-nitrophenyl-5, 5'-diphenyl-3,3'-[3, 3'-dimethoxy-4, 4'-diphenylene]-ditetrazolium
NEM :	N-éthylmaléimide
NPY :	Neuropeptide Y
NSS :	Solution isotonique de chlorure de sodium
P-Mod-S :	Peritubular Modulating Substance
PAM :	Peptidylglycine α-amidation monooxygénase

pCMPSA :	Acide parachloromercuri-phénylsulfonique
PGE ₂ :	Prostaglandine E ₂
PLMs :	Prolactin-like molecules
PMSF :	Phényl-méthane sulfonyl fluoride
POMC :	Proopiomélanocortine
PRL :	Prolactine
PSG :	Tampon phosphate glucosé de pH 8
RBP :	Retinol Binding Protein
SDS :	Dodécyl sulfate de sodium
SGP-1 :	Glycoprotéine sulfatée-1
SRIF :	Somatotropin Release Inhibiting Factor (Somatostatine)
β-LPH :	β-lipotropine
SVF :	Sérum de veau foetal
TEMED :	N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylenediamine
TFA :	Acide trifluoroacétique
T :	Testostérone
Tf :	Transferrine
TGF-α :	Transforming Growth Factor-α
TGF-β1 :	Transforming Growth Factor-β1
TGO :	Transaminase glutamate/oxaloacétate
TGP :	Transaminase glutamate/pyruvate
TLCK :	N α-p-tosyl-L-lysine chlorométhyl ketone
TPCK :	Phénylalanine chlorométhyl cétone
TRH :	Thyrotropin Releasing Hormone
TSH :	Thyroid Stimulating Hormone
VIP :	Vasoactive Intestinal Peptide
Z-Phe-Arg-AMC :	N-Cbz-L-phénylalaninyl-L-arginine-7-amido-4-méthylcoumarine
Δ ₄ a :	Delta-4 androstene dione

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION / OBJECTIFS	1
GENERALITES	3
<u>A) CLASSIFICATION ET BIOLOGIE GENERALE DES TRYPANOSOMES</u>	3
<u>I) CLASSIFICATION</u>	3
<u>II) MORPHOLOGIE ET BIOLOGIE DU TRYPANOSOME</u>	4
1°) Caractères morphologiques	4
2°) Cycle évolutif	4
a) Chez l'insecte vecteur	4
b) Chez l'homme	5
<u>B) ASPECTS CLINIQUES DE LA TRYPANOSOMIASE AFRICAINE HUMAINE</u>	5
<u>C) DESCRIPTION DE L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-GONADIQUE</u>	6
<u>I) HYPOTHALAMUS ET LHRH</u>	7
1°) Distribution hypothalamique du LHRH	7
2°) Biosynthèse du LHRH	8
3°) Dynamique de sécrétion du LHRH	9
a) Régulation par les stéroïdes gonadiques	9
b) Concentration en LHRH dans la circulation porte hypophysaire	9

<u>II) HISTOLOGIE ET REGULATIONS HYPOPHYSAIRES</u>	9
1°) Anatomie et histologie de l'hypophyse	9
a) Anatomie de la glande hypophysaire	9
b) Populations cellulaires de l'antéhypophyse	12
2°) Régulations antéhypophysaires	12
<u>III) LHRH ET HYPOPHYSE : SYNTHÈSE DES GONADOTROPHINES</u>	15
1°) Les gonadotrophines	15
a) Structures peptidiques des gonadotrophines	15
b) Rôle des structures glycaniques des gonadotrophines	15
c) Régulation de la glycosylation des gonadotrophines	16
2°) Action du LHRH sur les cellules gonadotropes de l'hypophyse	16
a) Synthèse des gonadotrophines	16
b) Régulation de la synthèse des gonadotrophines	17
3°) Evénements moléculaires résultant de la fixation du LHRH sur son récepteur	18
a) "Down- et up-régulation" des récepteurs pour le LHRH	18
b) Désensibilisation des récepteurs hypophysaires du LHRH	19
c) LHRH et synthèse hormonale dans la cellule gonadotrope	19
4°) Effets extra-hypophysaires du LHRH	19
<u>IV) LE TESTICULE</u>	20
1°) Organisation structurale et cellulaire du testicule	20
2°) Régulations hormonales testiculaires	22
3°) Structure et distribution testiculaire du récepteur de la LH	27
4°) Fixation de la LH sur son récepteur	28
5°) "Down-régulation" des récepteurs testiculaires de la LH	28
a) Dégradation des complexes [ligand-récepteur]	28
b) Protéolyse du récepteur de la LH à la surface de la cellule de Leydig	29
c) Diminution de la synthèse des récepteurs	29

6°) Désensibilisation des récepteurs	29
7°) Autres facteurs de régulation des récepteurs testiculaires de la LH	30
<u>D) DEGRADATION ENZYMATIQUE DES MEDIEATEURS PEPTIDIQUES</u>	31
<u>I) ACTIVITES ENZYMATIQUES DANS LE CERVEAU</u>	31
<u>II) PEPTIDASES ET ANTEHYPOPHYSE</u>	35
1°) Enzymes et sécrétion hormonale hypophysaire	35
2°) Enzymes et dégradation hormonale hypophysaire	35
a) Inactivation des médiateurs peptidiques	36
b) Régulation des taux intracellulaires d'hormones	36
c) Rôle des enzymes plasmatiques	36
3°) Enzymes et modifications post-traductionnelles des composés hormonaux	37
<u>III) PEPTIDASES TESTICULAIRES</u>	38
<u>E) PROTEASES ET PARASITISME</u>	39
<u>I) ORIGINALITE ET CARACTERISTIQUES DES CYSTEINE-PROTEASES DES PROTOZOAIRES</u>	40
<u>II) LOCALISATION CELLULAIRE DES ENZYMES DU TRYPANOSOME</u>	40
<u>III) ACTIVITES ENZYMATIQUES PLASMATIQUES D'ORIGINE PARASITAIRE</u>	41
1°) Activités enzymatiques libérées par le parasite	41
2°) Interactions des constituants sériques avec les enzymes parasitaires	42

**RESULTATS : ETUDE DES DESEQUILIBRES ENDOCRINIENS
SURVENANT AU COURS DE LA TRYPANOSOMIASE AFRICAINE 43**

**A) SUIVI DES REPERCUSSIONS SUR L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-
GONADIQUE D'UNE TRYPANOSOMIASE CHRONIQUE 43**

B) ETUDE DES EFFETS D'UNE TRYPANOSOMIASE AIGUE CHEZ LE RAT 46

**I) DESORDRES ENDOCRINIENS ET METABOLIQUES INDUITS PAR
UNE TRYPANOSOMIASE AIGUE 47**

1°) Effets de la trypanosomiase sur la testostéronémie de base des rats 47

2°) Recherche de l'origine de l'hypogonadisme 49

a) Taux sériques de LH le troisième jour d'une infestation aiguë 49

b) Etude fonctionnelle testiculaire du rat parasité 50

3°) Mise en évidence de la survenue d'un stress et d'un processus
inflammatoire au cours de la trypanosomiase 53

4°) Variations de la glycémie et des transaminases sériques au cours d'une
infestation aiguë 54

**II) INCIDENCE DE LA TRYPANOSOMIASE SUR LES RECEPTEURS
TESTICULAIRES DE LA LH 56**

1°) Mise au point des conditions d'étude des récepteurs testiculaires
de la LH 56

a) Détermination des conditions de durée et de température d'incubation
d'homogénats testiculaires. Effet des inhibiteurs de protéases. 56

b) Effet des lavages sur la fixation spécifique testiculaire
de l'hCG* 58

2°) Etude des récepteurs testiculaires de la LH au cours de la
trypanosomiase 59

a) Modifications quantitatives et qualitatives des récepteurs testiculaires
de la LH le troisième jour d'une infestation aiguë 59

b) Recherche de l'origine de la diminution du nombre des récepteurs testiculaires de la LH au cours de la trypanosomiase	62
--	----

C) EFFET DE COMPOSES D'ORIGINE PARASITAIRE SUR L'AXE

HYPOTHALAMO-HYPOPHYSSO-GONADIQUE 64

I) ETUDE DE L'EFFET DES ENZYMES DU PARASITE SUR

LES NEUROPEPTIDES 64

1°) Dégradation du LHRH par les enzymes du trypanosome présents dans le sérum des rats infestés	65
2°) Dégradation du LHRH par un extrait enzymatique "brut" parasitaire	69
3°) Caractérisation du/des enzyme(s) du trypanosome responsable(s) de la dégradation du LHRH	72
4°) Autres cibles peptidiques des enzymes du trypanosome	75
5°) Recherche des répercussions <i>in vivo</i> de la dégradation du LHRH par les enzymes du parasite	79

II) ETUDE DES EFFETS DU TETRAPEPTIDE LHRH¹⁻⁴ SUR LE

FONCTIONNEMENT GONADIQUE 82

1°) Etude <i>in vivo</i> des effets du tétrapeptide LHRH ¹⁻⁴ chez le rat	82
2°) Etude <i>in vitro</i> des effets du tétrapeptide sur la dégradation du LHRH par les enzymes du cerveau et du testicule	84
3°) Exploration de l'effet du tétrapeptide sur les cellules testiculaires de rat <i>in vitro</i>	88
a) Effet de différents composés sur la production de testostérone des cellules de Leydig	88
b) Effet du tétrapeptide sur la réponse des cellules de Leydig à la LH et au LHRH	92

III) EFFETS DE COMPOSES PARASITAIRES DE NATURE NON
ENZYMATIQUE SUR LE FONCTIONNEMENT GONADIQUE

DU RAT SAIN 95

- 1°) Etude préliminaire du rythme circadien de la testostérone chez les rats
de 10 mois 96
- 2°) Conséquences sur la fonction gonadique de l'injection chez le rat sain
d'un matériel parasitaire partiellement purifié 97
- 3°) Etude approfondie des effets endocriniens de la fraction Con A-F2 99

IV) EFFET D'UN MATERIEL PARASITAIRE SUR LE MAINTIEN DE

L'INTEGRITE DES RECEPTEURS TESTICULAIRES DE LA LH 102

- 1°) Interférences de l'EDTA et du DTT sur la fixation de la gonadotrophine
chorionique sur les récepteurs testiculaires de la LH 102
 - a) Effets de l'EDTA sur le "binding" 102
 - b) Effets du DTT sur le "binding" 103
- 2°) Effet d'un extrait parasitaire sur la capacité des récepteurs testiculaires
de la LH à fixer l'hCG 105
- 3°) Intéractions de l'AVS avec le récepteur testiculaire de la LH 108
 - a) Recherche d'un récepteur spécifique de l'AVS ainsi qu'une
inhibition de sa fixation par un excès d'hCG 108
 - b) Recherche d'une inhibition de la fixation de l'hCG* sur les
récepteurs testiculaires de la LH par la fraction Con A-F2 110
 - c) Essai de mise en évidence de la fixation d'un produit parasitaire
sur le récepteur testiculaire de la LH 112

DISCUSSION 115

CONCLUSION	119
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	121
APPENDICE TECHNIQUE	163

FIGURES

	Pages
Figure 1-A : Schéma anatomique de la glande hypophysaire	10
Figure 1-B : Schéma du système porte hypothalamo-hypophysaire	11
Figure 2 : Histologie du testicule	21
Figure 3 : Dégradation du TRH par les enzymes du cerveau	32
Figure 4-A : Dégradation du LHRH par les enzymes de la fraction soluble du cerveau	33
Figure 4-B : Dégradation du LHRH par les enzymes membranaires du cerveau	34
Figure 5 : Evolution au cours de la trypanosomiase chronique des taux sériques de testostérone et de LH ainsi que du contenu hypophysaire en LH en fonction de la parasitémie.	44
Figure 6 : Evolution des taux sériques de testostérone chez des rats sains ou parasités suite à l'injection d'hCG.	51
Figure 7 : Fixation spécifique de 100 000 cpm d'hCG marquée à l'Iode 125 sur un homogénat H2 en présence (+AP) ou non (-AP) d'inhibiteurs de protéases à 20 et 37 °C.	58
Figure 8 : Effet du nombre de lavages sur la fixation spécifique de l'hCG marquée à l'Iode 125 sur un homogénat H2 en présence ou en absence d'inhibiteurs de protéases dans le milieu d'incubation.	59
Figure 9 : Evolution des taux sériques de testostérone et de LH pendant les premières 24 heures d'une infestation aiguë.	63
Figure 10 : Dégradation du LHRH par les enzymes libérés par le parasite dans le plasma (A), et par les enzymes de la fraction soluble du cerveau (B).	67
Figure 11 : Dégradation du LHRH par les enzymes contenues dans un extrait parasitaire "brut" ("surnageant d'extraction de pH 5,5").	71
Figure 12 : Dégradation de différents neuropeptides (neurotensine, bradykinine et substance P) par les enzymes du trypanosome.	76

Figure 13 :	Etude comparée des taux sériques de testostérone et de sous-unités alpha chez des rats sains ou des rats au troisième jour d'infestation par <i>T. b. brucei</i> variants AnTat 1.1 A ou AnTat 1.8.	81
Figure 14 :	Effets <i>in vivo</i> de l'injection du tétrapeptide LHRH ¹⁻⁴ sur les taux sériques de testostérone avec ou sans stimulation ultérieure par le LHRH.	84
Figure 15 :	Dégradation du LHRH par les enzymes de la fraction soluble du cerveau après 15 minutes d'incubation en absence ou en présence de tétrapeptide.	87
Figure 16 :	Production de testostérone par les cellules de Leydig après 5 heures d'incubation en l'absence ou en présence de différents composés : tétrapeptide, agoniste du LHRH, LH ovine et dibutyryl AMP cyclique.	89
Figure 17-A :	Effets de différentes quantités d'agoniste du LHRH sur la production de testostérone par des cellules de Leydig de rat après une préincubation de 30 minutes en présence du tétrapeptide à différentes concentrations.	93
Figure 17-B :	Effets de différentes concentrations en LH sur la production de testostérone par des cellules de Leydig de rat après une préincubation de 30 minutes en présence du tétrapeptide à différentes concentrations.	94
Figure 18 :	Variations circadiennes des taux sériques de testostérone chez le rat.	97
Figure 19 :	Taux sériques de testostérone 5 heures après l'injection des fractions Con A-F1 ou Con A-F2.	98
Figure 20 :	Perturbations endocriniennes relevées 5 heures après l'injection à des rats mâles sains de la fraction Con A-F2.	101
Figure 21 :	Effet de l'EDTA sur la fixation spécifique de l'hCG* sur les récepteurs testiculaires de la LH.	103
Figure 22 :	Effet du DTT sur la fixation spécifique de l'hCG* sur les récepteurs testiculaires de la LH en fonction du temps de préincubation des homogénats avec le réducteur.	104

- Figure 23 : Evolution en fonction du temps de la capacité des récepteurs testiculaires de la LH à fixer de l'hCG marquée à l'Iode 125 en présence ou non d'extraits parasitaires bruts préparés à partir des variants AnTat 1.1 A ou AnTat 1.8. A. 107
- Figure 24 : Recherche d'un récepteur testiculaire spécifique de l'AVS. 109
- Figure 25 : Etude de la fixation de l'AVS dimère sur un homogénat préparé à partir des testicules d'un rat infesté par *T. b. brucei* Variant AnTat 1.1 A. 110
- Figure 26 : Essai d'inhibition de la fixation de l'hCG* sur les récepteurs testiculaires de la LH par l'AVS dimère préparé à partir du variant AnTat 1.1 A. 111
- Figure 27 : Autoradiogramme mettant en évidence les complexes hCG*-Récepteur de la LH suite à une incubation préalable ou pas des homogénats testiculaires avec des extraits parasitaires "bruts". 114

TABLEAUX

	Pages
Tableau 1 :	Facteurs de régulation de la sécrétion des hormones hypophysaires. 14
Tableau 2-A :	Facteurs impliqués dans les régulations paracrines et autocrines testiculaires. 23
Tableau 2-B :	Facteurs impliqués dans les régulations paracrines et autocrines testiculaires. 24
Tableau 2-C :	Facteurs impliqués dans les régulations paracrines et autocrines testiculaires. 25
Tableau 2-D :	Facteurs impliqués dans les régulations paracrines et autocrines testiculaires. 26
Tableau 2-E :	Facteurs impliqués dans les régulations paracrines et autocrines testiculaires. 27
Tableau 3 :	Caractéristiques générales des cathepsines B, H et L. 38
Tableau 4 :	Evolution de différents paramètres endocriniens et de la parasitémie au cours d'une trypanosomiase évoluant sur un mode chronique. 45
Tableau 5 :	Taux sériques de testostérone de rats sains ou parasités au bout de 3 jours d'infestation en fonction du mode de sacrifice. 48
Tableau 6 :	Evolution des taux de testostérone et de LH sériques après 3 jours d'infestation par <i>Trypanosoma brucei brucei</i> variant AnTat 1.1 A. 49
Tableau 7 :	Mise en évidence au bout de trois jours d'infestation aiguë de l'augmentation des taux sériques de la corticostérone (marqueur d'un stress) et de l' α_2 -macroglobuline (marqueur d'un processus inflammatoire). 53
Tableau 8 :	Suivi de la glycémie et du taux des transaminases sériques en fonction de la parasitémie au cours d'une trypanosomiase aiguë. 55

Tableau 9 :	Altérations qualitatives et quantitatives des récepteurs testiculaire de la LH au cours de la trypanosomiase aigüe.	61
Tableau 10 :	Activité enzymatique des sérums de rats sains et de rats au troisième jour d'infestation aigüe par <i>T. b. brucei</i> variant AnTat 1.1 A.	65
Tableau 11 :	Composition en acides aminés des fractions A, B et C des chromatogrammes de la <u>Figure 10</u> (dégradation du LHRH par les enzymes sériques des rats infestés et par les enzymes de la fraction soluble du cerveau)	68
Tableau 12 :	Identification par spectrométrie de masse des peptides contenus dans les pics A, B et C de la <u>Figure 10</u> (pics résultant de la dégradation du LHRH soit par les enzymes du trypanosome, soit par les enzymes de la fraction soluble du cerveau).	69
Tableau 13 :	Identification par spectrométrie de masse de la nature des peptides constitutifs des différents pics obtenus lors de la dégradation du LHRH par les activités enzymatiques présentes dans un extrait parasitaire "brut" ("Surnageant de pH 5,5").	72
Tableau 14 :	Hydrolyse du LHRH par le sérum de rats le troisième jour d'une infestation aigüe en présence de différents inhibiteurs de protéases et/ou de DTT.	74
Tableau 15-A :	Produits de dégradation de la neurotensine par les enzymes du trypanosome.	77
Tableau 15-B :	Produits de dégradation de la substance P par les enzymes du trypanosome.	77
Tableau 15-C :	Produits de dégradation de la bradykinine par les enzymes du trypanosome.	78
Tableau 16-A :	Effet du tétrapeptide sur la production Leydigienne de testostérone <i>in vitro</i> en présence d'un agoniste synthétique du LHRH.	90

Tableau 16-B :	Effet du tétrapeptide sur la production Leydigienne de testostérone <i>in vitro</i> en présence de LH ovine.	91
Tableau 17 :	Effet des fractions Con A-F1 et Con A-F2 sur les taux sériques de testostérone 5 heures après leur injection chez des rats sains.	98
Tableau 18 :	Valeurs des paramètres endocriniens relevées 5 heures après l'injection de différentes dilutions de la fraction Con A-F2.	100

INTRODUCTION / OBJECTIFS

La trypanosomiase africaine, également appelée maladie du sommeil chez l'homme, est une affection parasitaire induite par un protozoaire flagellé sanguicole, le trypanosome. Cette maladie, qui est transmise par des arthropodes hématophages sévit à l'état endémique dans diverses régions d'Afrique Noire où elle touche environ 25 millions d'individus (251). Le parasite est transmis à l'homme par la piqûre d'une mouche du genre *Glossina* et pourra, au cours de la maladie, se localiser dans l'appareil encéphalo-méningé ce qui induit des perturbations de l'alternance normale veille-sommeil d'où l'appellation historique de "maladie du sommeil".

On distingue classiquement chez l'homme deux formes types de la maladie, une forme à *Trypanosoma brucei gambiense* dans l'ouest africain et une forme à *Trypanosoma brucei rhodesiense* en Afrique orientale. Outre leur distribution géographique différente, ces 2 protozoaires se distinguent également par la sévérité de la maladie.

Certains trypanosomes africains (*T. vivax*, *T. gambiense*, *T. rhodesiense*) sont, par ailleurs, susceptibles de parasiter des animaux (bovins, ovins, caprins, porcins, équidés) (192, 202, 220) qui peuvent dans certains cas constituer un "réservoir" permettant la propagation de la maladie chez l'homme. L'infestation des animaux domestiques est en outre souvent dramatique pour ces pays aux équilibres économiques et nutritionnels précaires dans la mesure où, en l'absence d'un traitement coûteux, ces animaux meurent à plus ou moins long terme (111).

La trypanosomiase Africaine entraîne en effet de nombreuses perturbations de l'organisme parmi lesquelles des déséquilibres de l'équilibre glucidique (hypoglycémie [224, 262], sans doute en partie responsable du stress observé au cours de l'infestation [219]) et des déséquilibres endocriniens avec l'apparition d'une hypothyroïdie (222) ou d'un hypogonadisme tant chez l'homme que chez l'animal (36, 94).

Des anomalies de la reproduction peuvent être observées dans les 2 sexes et on peut ainsi observer impuissance, stérilité, irrégularité des cycles menstruels et avortements. De nombreuses explications ont été avancées quant à l'origine des déséquilibres gonadiques observés (140) et la plupart font état

de l'apparition de lésions inflammatoires (nécrose et fibrose) tant au niveau de l'hypophyse (ce qui entraîne une diminution du taux des gonadotrophines circulantes) que du testicule (ce qui provoque une hypotestostéronémie) ou de l'ovaire (avec diminution des taux sériques de 17β -Oestradiol et de progestérone).

Cependant il est vraisemblable que ces atteintes ne sont pas primitivement à l'origine des dysfonctionnements gonadiques observés.

En effet, certains trypanosomes strictement circulants (*T. congolense* et *T. vivax*) sont capables d'induire une dégénérescence testiculaire (atrophie, nécrose) (5, 37, 152, 294) ou ovarienne (220, 221) sans atteinte inflammatoire (5, 152). Par ailleurs, les sujets parasités par *T. b. gambiense* ont des taux de LH normaux (36).

Enfin, les études précédemment citées ont toujours évalué l'incidence d'une parasitose "chronique" sur la reproduction. On peut admettre dans ces conditions que les atteintes dégénératives observées au niveau hypophysaire ou gonadique ne sont que les conséquences à long terme de la maladie et que l'hypogonadisme résulte de mécanismes autres qu'inflammatoires.

Les études menées au laboratoire nous ont fourni des arguments dans ce sens, dans la mesure où il a pu être démontré que l'injection d'extraits parasitaires préparés en l'absence ou en présence d'inhibiteurs de protéases induisaient un hypogonadisme (caractérisé par une diminution du taux sérique de testostérone pouvant atteindre 70 %) chez des rats mâles sains en l'espace de 5 heures (130). Par ailleurs, les mécanismes responsables de l'hypogonadisme dans cette étude apparaissent différents ; en effet, les extraits parasitaires préparés en l'absence d'inhibiteurs de protéases induisent une accumulation de LH dans l'hypophyse alors que les extraits préparés en présence d'inhibiteurs de protéases induisent une diminution du contenu hypophysaire en LH.

Le but de notre travail a donc été d'approfondir l'étude des déséquilibres précoces de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique dans le cadre de l'infestation par le trypanosome, d'une part en utilisant des modèles expérimentaux d'infestation parasitaire à évolution aiguë (3 jours) ou "chronique" (14 jours), et d'autre part en appréciant l'effet de composés parasitaires sur différents paramètres endocriniens.

GENERALITES

A) CLASSIFICATION ET BIOLOGIE GENERALE DES TRYPANOSOMES

I) CLASSIFICATION

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés appartenant à la famille des Trypanosomatidae, famille qui se divise en trois genres : Blastocrithidia, Leishmania et Trypanosoma. Le genre Trypanosoma se subdivise en trois groupes en fonction de l'agent vecteur (99).

On distingue :

- les trypanosomes transmis par des glossines (mouches tsé-tsé) qui engendrent la maladie du sommeil chez l'homme, la "nagana", par exemple, chez l'animal, et dont sont respectivement responsables *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*) et *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*), *Trypanosoma congolense* (*T. congolense*), *Trypanosoma vivax* (*T. vivax*) et *Trypanosoma brucei brucei* (*T. b. brucei*).

- les trypanosomes transmis par des réduvidés en Amérique du Sud : *T. cruzi* responsable de la maladie de Chagas et *T. rangeli*.

- les trypanosomes transmis par des tabanidés et stomoxynés (*T. evansi* et sa variété *T. equinum*) dont la répartition géographique comprend l'Amérique du Sud, l'Afrique du nord, et l'Asie centrale.

- les trypanosomes transmis par contact sexuel (*T. equiperdum*).

Pour nos études nous avons développé un modèle expérimental de trypanosomiase Africaine chez le rat en utilisant *T. b. brucei* qui induit chez cet animal des signes biologiques voisins de ceux rencontrés chez l'homme parasité.

II) MORPHOLOGIE ET BIOLOGIE DU TRYPANOSOME

1°) Caractères morphologiques

Les trypanosomes sanguicoles ont un corps fusiforme et allongé. La coloration permet de mettre en évidence un gros noyau arrondi central et un petit élément postérieur ou kinétoplaste d'où part un flagelle qui par accollement au protoplasme détermine une membrane ondulante. En raison d'un polymorphisme, il est possible d'observer dans le sang des trypanosomes allongés (29 à 42 microns) et minces (type "slender"), des formes intermédiaires, et des formes courtes et trapues (12 à 18 microns) sans flagelle libre (type "stumpy"). Ces dernières formes sont incapables de se diviser et ne sont donc pas infectieuses pour l'hôte (109).

Les trypanosomes sont recouverts d'un "manteau" de 15 nm d'épaisseur (292). Ce manteau de surface résulte de l'assemblage d'une glycoprotéine appelée Antigène Variable de Surface (AVS) qui a été initialement purifiée et caractérisée par Cross (74).

Cet AVS, qui est retrouvé sous forme dimère ou monomère en fonction des variants de trypanosomes (132), est un élément très important de l'adaptation du parasite à l'hôte dans la mesure où des variations des motifs antigéniques de cet AVS permettent au parasite d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte (38).

2°) Cycle évolutif

a) Chez l'insecte vecteur

La glossine ingère les trypanosomes qui parcourent tout le tube digestif de la mouche en subissant différentes modifications morphologiques aboutissant dans un premier temps à une forme épimastigote avec une évolution progressive ultérieure vers un stade de trypanosomes métacycliques infectieux qui se localisent dans les glandes salivaires de l'insecte. La durée de cette transformation est d'environ 20 jours.

b) Chez l'homme

La transmission se fait essentiellement par piqûre de l'insecte vecteur. Plus rarement, il est observé une transmission non cyclique : transmission mécanique par certains insectes, transmission interhumaine (congénitale, allaitement, transfusion).

Dans le cas d'une piqûre par une glossine, les parasites se multiplient d'abord localement dans le collagène dermique pendant 2 à 3 jours avec apparition au point d'inoculation d'un chancre. Les trypanosomes passent ensuite par voie sanguine ou lymphatique dans la circulation générale, les ganglions et le liquide céphalo-rachidien où ils se multiplient par scissiparité.

Le suivi de la parasitémie dans le sang permet de mettre en évidence une évolution par vagues successives de la prolifération parasitaire qui est liée aux variations du "manteau" de surface du parasite (AVS) qui permettent au protozoaire d'échapper aux défenses immunitaires de l'organisme contaminé. Par ailleurs, des produits libérés par le parasite ont une activité immunosuppressive sur la réponse IgM (257).

B) ASPECTS CLINIQUES DE LA TRYPANOSOMIASE AFRICAINE HUMAINE

La trypanosomiase ouest-africaine à *T. b. gambiense* sera prise comme exemple :

Suite à la piqûre infectante, la maladie va évoluer en 2 phases distinctes : phase lymphatico-sanguine puis phase nerveuse liée à la localisation cérébrale du parasite (14).

-La phase lymphatico-sanguine associe :

- une fièvre discrète (38-38,5°C) à caractère anarchique avec des pics de température survenant le soir. Elle est associée à des céphalées et à une asthénie plus ou moins nette.
- Un syndrome adéno-spléno-hépatomégalique modéré.
- Des signes cutanés constitués de grands "placards" papulo-érythémateux à contours irréguliers : les trypanides (signes inconstants et fugaces surtout visibles chez les sujets à téguments clairs).

-La phase de polarisation cérébrale se traduit par :

- des troubles du sommeil (insomnie nocturne et somnolence diurne)
- Des troubles de l'appétit (boulimie mais le plus souvent anorexie)
- Des troubles du comportement (succession d'états dépressifs et de phases d'excitation)
- Des troubles moteurs
- Des troubles neuro-endocriniens objectivés par des troubles gonadiques et thyroïdiens

La symptomatologie de cette dernière phase s'aggrave avec l'évolution vers la phase terminale en 15 à 20 jours, le décès du malade survenant dans un état de coma avec hypothermie.

Un traitement instauré lors de la première phase de la maladie entraîne le plus souvent la guérison sans séquelles tandis que si le traitement est réalisé en phase de polarisation cérébrale, le pronostic sera réservé.

La trypanosomiase à *T. b. rhodesiense* a une installation analogue à celle de la trypanosomiase à *T. b. gambiense* mais la phase de généralisation est plus sévère et plus rapide avec apparition d'une fièvre intense, d'une atteinte cardiaque, de complications pulmonaires et de troubles hépatiques avec altération rapide de l'état général.

Le plus souvent, cette évolution rapide ne laisse pas le temps à la phase de polarisation cérébrale de s'installer et le malade évoluera rapidement vers la phase terminale avec survenue du décès dans un délai de 3 à 6 mois

C) DESCRIPTION DE L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-GONADIQUE

La testostérone qui est le paramètre gonadique que nous avons particulièrement étudié au cours de notre travail est un composé stéroïdien de la famille des androgènes qui possède 19 carbones et est synthétisé par les cellules testiculaires de Leydig sous l'effet de la LH hypophysaire, elle-même dépendante pour sa synthèse et sa sécrétion du LHRH (LH Releasing Hormone) hypothalamique.

Nous allons donc détailler les 3 étages de cet axe hypothalamo-hypophyso-gonadique de façon à mieux apprécier ultérieurement les répercussions sur celui-ci de la trypanosomiase Africaine.

I) HYPOTHALAMUS ET LHRH

Le LHRH (ou GnRH ou gonadolibérine) est un décapeptide constitué d'une seule chaîne carbonée (71). Il est protégé du côté N-terminal par la cyclisation de la glutamine en pyroglutamate et présente une amidification du glycolle en position C terminal (structure : pGlu¹ - His - Trp - Ser - Tyr - Gly - Leu - Arg - Pro - Gly¹⁰NH₂)

Le LHRH hypothalamique est unique chez les mammifères alors qu'une seconde structure a été décrite chez les poulets (183, 309). Une activité LHRH-like a également été décrite dans le cerveau de reptiles, d'amphibiens et de poissons (183).

L'hormone intacte, biologiquement active, présente un coude β au niveau des résidus Tyr⁵-Gly⁶-Leu⁷-Arg⁸ ce qui a pour effet de rapprocher les extrémités N- et C- terminales. On estime ainsi que les acides aminés 1 et 10 du peptide sont nécessaires à la fixation de l'hormone sur son récepteur (69) alors que l'activation de ce dernier implique les 3 premiers (71).

1°) Distribution hypothalamique du LHRH

Les neurones immunoréactifs pour le LHRH sont retrouvés de façon diffuse dans la partie antérieure de l'hypothalamus et leur sécrétion de LHRH est régulée par la libération centrale de nombreux neurotransmetteurs (203) (5 HydroxyTryptamine [5 HT], norépinephrine [le rôle des neurones catécholaminergiques a cependant été discuté (182)], dopamine (28), Acide Gamma Amino Butyrique (GABA) et acide L-glutamique (84)) ainsi que par des neuropeptides comme le neuropeptide Y (256) et les tachykinines (neurokinine A, neuropeptide K, neuropeptide γ et substance P) (154).

Il existe par ailleurs un rétrocontrôle indirect des stéroïdes gonadiques (183) qui vont intervenir sur un "LHRH pulse generator" (198) dont l'identité n'est pas bien définie (88) mais qui contrôle la fréquence et l'amplitude de la sécrétion du LHRH (211).

Les axones issus des neurones à LHRH se projettent vers de nombreux sites du système nerveux central (SNC).

L'une de ces plus remarquables projections s'établit de l'aire préoptique médiane vers l'éminence médiane où le décapeptide est libéré dans la circulation porte-hypophysaire ainsi que d'autres médiateurs de nature peptidique, qui ont un rôle important sur le fonctionnement hypophysaire comme l'atriopeptine (6), le CRF, la Galanine (190), le GRF (151), la Neurotensine (138), le Neuropeptide Y (75, 147, 156), l'ocytocine (234), le TRH (1) et le VIP (271).

Enfin, il est à noter que l'éminence médiane, étant située en dehors de la barrière hémato-encéphalique, est de ce fait très exposée à l'influence de composés plasmatiques (hormones, enzymes).

2°) Biosynthèse du LHRH

Le LHRH est synthétisé sous forme d'un précurseur de 92 acides aminés qui après clivage protéolytique libère, d'une part le décapeptide LHRH¹⁻¹⁰, et d'autre part un peptide de 56 acides aminés, le GAP (Gonadotropin Associated Peptide) (316). Après leurs synthèses, LHRH et GAP sont stockés dans des granules et dirigés par un transport axonal rapide vers les extrémités nerveuses terminales de l'éminence médiane où ils sont cosecrétés (183).

3°) Dynamique de sécrétion du LHRH

La sécrétion du LHRH est pulsatile (211, 41). Elle est sous le contrôle du "LHRH pulse generator" qui régit de ce fait indirectement la fréquence et l'amplitude de la sécrétion de LH (211).

a) Régulation par les stéroïdes gonadiques

Des stéroïdes d'origine gonadique comme la progestérone (178), l'androsténone ($\Delta 4a$) et la testostérone inhibent cette sécrétion pulsatile (183).

L'oestradiol (E2) a, pour sa part, un effet biphasique : inhibiteur à des taux faibles à modérés, activateur à des taux élevés, notamment au moment du "pic" de LH préovulatoire.

b) Concentration en LHRH dans la circulation porte hypophysaire

Les concentrations de LHRH libéré dans la circulation porte hypophysaire au niveau de l'éminence médiane varient de 20 à 200 pg/ml (183) en fonction de la période du cycle chez la rate. Par contre, ces taux sont inférieurs à 4 pg/ml dans le sang périphérique où la demi-vie du décapeptide est d'environ 7 minutes (244).

II) HISTOLOGIE ET REGULATIONS HYPOPHYSAIRES

1°) Anatomie et histologie de l'hypophyse

a) Anatomie de la glande hypophysaire

L'hypophyse est située dans la selle turcique (171). Elle est divisée en 2 lobes : l'adénohypophyse ou ante-hypophyse (environ 80 % de la glande) et la neurohypophyse ou post-hypophyse (Figure 1-A).

L'adénohypophyse est constituée d'un lobe antérieur (pars distalis) (qui constitue la partie la plus importante de l'adénohypophyse), d'un lobe intermédiaire rudimentaire (pars intermedia) et d'une partie distale (pars tuberalis qui est l'extension en avant le long de la tige hypophysaire de la pars distalis mais qui joue un rôle mineur dans la sécrétion adénohypophysaire).

L'hypophyse est irriguée par du sang provenant des artères hypophysaires supérieures et inférieures. Certaines branches de l'artère hypophysaire supérieure pénètrent dans l'infundibulum, qui est une zone située à la surface de l'hypothalamus, avant de se terminer pour leur grande majorité dans un système porte appelé système porte-hypophysaire (Figure 1-B). Les hormones issues des noyaux neurosecrétoires de l'hypothalamus sont libérées à l'extrémité axonale des neurones dans ce système porte hypophysaire d'où elles pourront gagner le lobe antérieur.

L'artère hypophysaire inférieure irrigue pour sa part le lobe postérieur. Certains vaisseaux de ce lobe postérieur pénètrent par ailleurs dans le lobe antérieur ce qui permet le transport de substances de la post hypophyse vers la pars distalis.

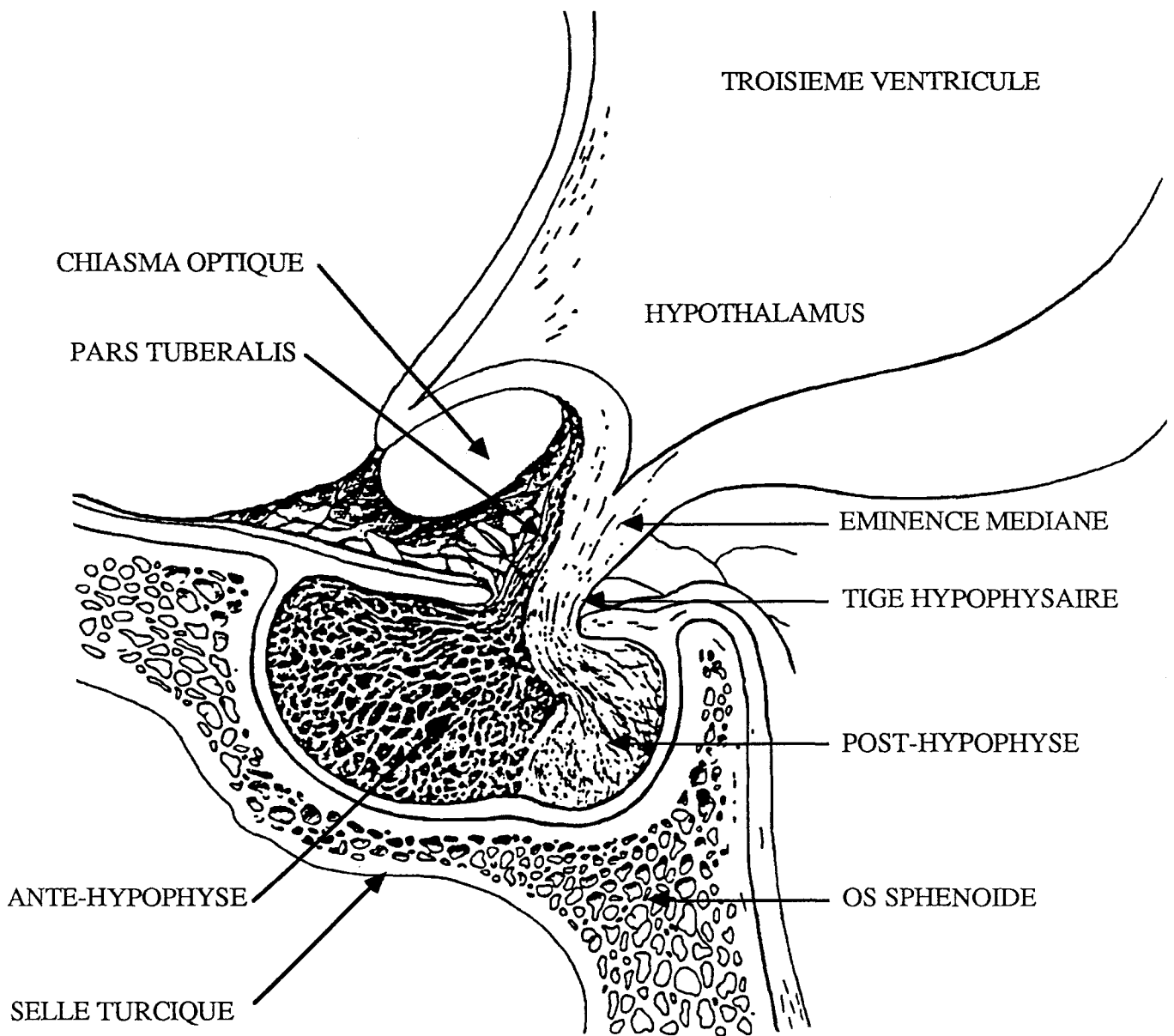


Figure 1-A : Schéma anatomique de la glande hypophysaire

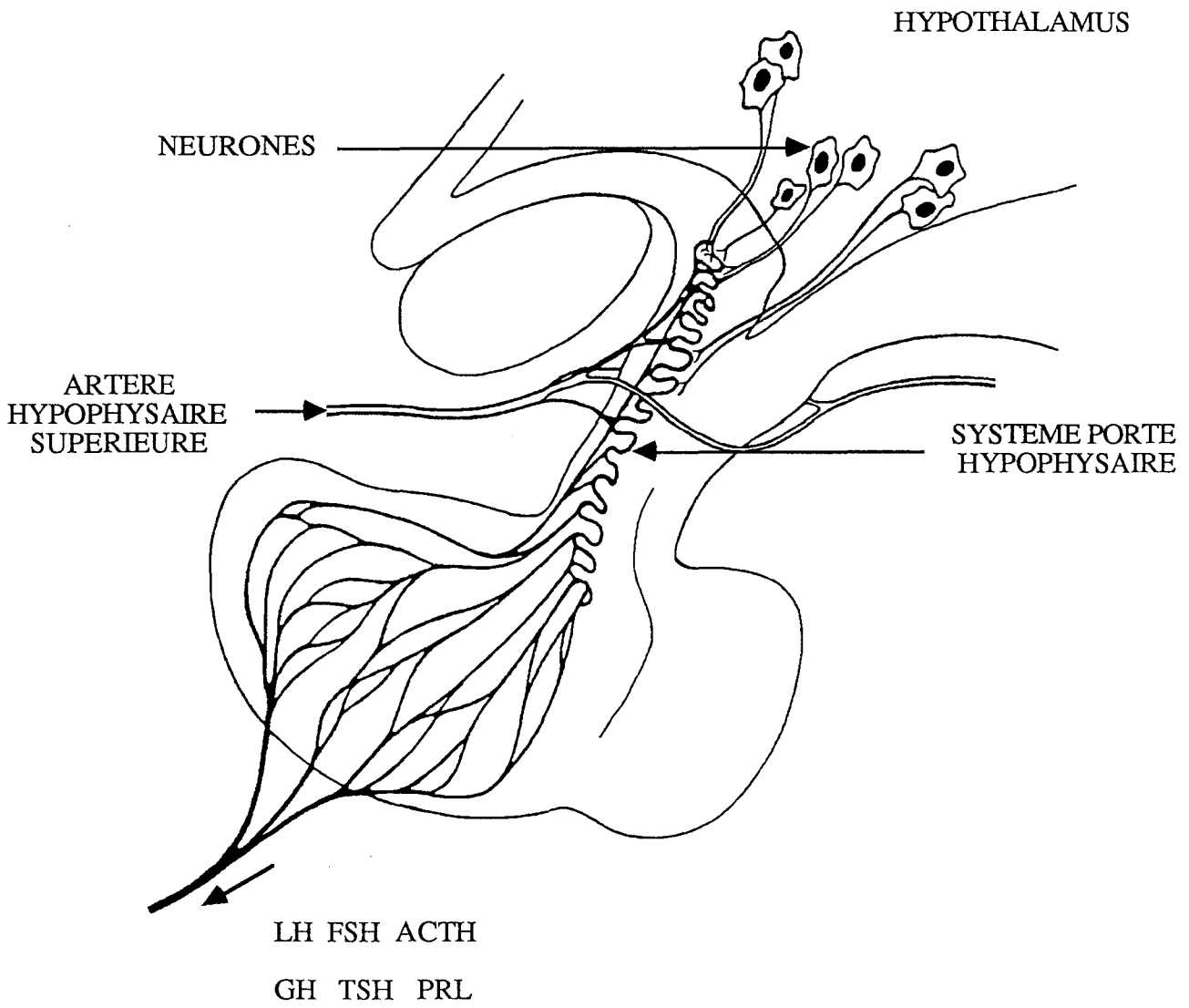


Figure 1-B : Schéma du système porte hypothalamo-hypophysaire

b) Populations cellulaires de l'antéhypophyse

On distingue actuellement au moins 6 types cellulaires dans l'hypophyse : les cellules somatotropes (environ 50 % des cellules) qui secrètent la GH (hormone de croissance ou Growth Hormone) ; les cellules à prolactine, également appelées mammotropes ou lactotropes (15 à 25 % de la population cellulaire) ; les cellules corticotropes (environ 20 % des cellules) qui contiennent des peptides dérivés de la proopiomélanocortine (POMC) comme l'ACTH, la β -LPH et des endorphines ; les cellules thyrotropes (environ 5 % des cellules) qui secrètent la TSH ; les cellules gonadotropes (environ 10 % de la population cellulaire) qui secrètent à la fois LH et FSH et enfin les cellules folliculo-stellaires (143, 151) qui secrètent la protéine S-100 (171).

Les cellules lactotropes, gonadotropes, corticotropes et somatotropes sont dispersées à travers l'antéhypophyse tandis que les cellules thyrotropes forment des amas au centre de la glande. Par ailleurs, certaines populations cellulaires sont topographiquement proches les unes des autres ce qui suggère des interactions paracrines entre : cellules gonadotropes et lactotropes ; somatotropes et corticotropes ; thyrotropes et somatotropes (149).

2°) Régulations antéhypophysaires

Leurs caractères complexes peuvent être illustrés par un exemple (151).

Le LHRH stimule les cellules gonadotropes ce qui entraîne la libération de LH et de FSH mais également d'angiotensine II (AII).

L'AII induit la libération de prolactine par les cellules lactotropes et a également un effet sur les cellules somatotropes dont elle entraîne une libération de GH. Ce dernier effet est cependant modulé par les glucocorticoïdes qui augmentent cette libération chez les jeunes rats et la diminuent chez les rats adultes. Dans la mesure où l'AII stimule également au niveau hypophysaire la sécrétion d'ACTH à partir des cellules corticotropes, ce qui va induire la production de glucocorticoïdes surrénaliens, on comprend que cet effet sur les cellules corticotropes aura des répercussions indirectes sur le fonctionnement des cellules somatotropes.

Les mécanismes de régulation intra-hypophysaires sont donc très complexes et font intervenir de nombreuses protéines et peptides dont une liste non exhaustive est présentée dans le Tableau 1.

Ainsi, d'autres substances interviennent dans les régulations hypophysaires comme les [Met]- et [Leu]-enkephalines ; les kinines [bradykinine, kallidine ([Lys]-bradykinine) et [Met-Lys]-bradykinine (151) ainsi que les tachykinines (Substance P et substance K (ou neurokinine A) (145)] ; la β -endorphine (2) ; la dynorphine (165) ; la gastrine ; la secrétine (151) ; le peptide 7B2 et les neuromédines (B et U) (273) ; la motiline (151) ; l'activine (290), la follistatine (195), l'inhibine (195) et des facteurs de croissance [FGF, EGF, IGF-I] (151).

HORMONES SECRETEES	AGENTS STIMULANTS	AGENTS INHIBITEURS
ACTH (Adrenocorticotropic Hormone) (Cellules corticotropes)	Corticotropin Releasing Factor (CRF), Angiotensine II (AII) (151), arginine vasopressine (8), Interleukine-I (IL-1) (30)	activine (290), Substance P (Sbce P) (8), atriopeptine (6)
FSH (Follicle Stimulating Hormone) (Cellules gonadotropes)	Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH) (114), activine (301, 312), Neuropeptide Y (NPY) (205), Gonadotropin Associated Peptide (GAP) (316), FSH-Releasing Factor (FSH-RF) (76)	inhibine (77, 312)
GH (Growth Hormone) (Cellules somatotropes)	Growth hormone Releasing Factor (GRF) (271), AII (151), bradykinine (151), Interleukine-6 (IL-6) (271), Prostaglandine E ₂ (PGE ₂) (271), NPY (205), IL-1 (30)	activine (290), Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) (inhibe la libération de GH induite par le GRF) (151), galanine (138, 228, 253), somatostatine (Somatotropin Release Inhibiting Factor = SRIF) (271)
LH (Luteinizing Hormone) (Cellules gonadotropes)	LHRH (114), CRF (151), PGE ₂ (271), IL-6 (271), AII (75), NPY (potentialise l'effet du LHRH) (75, 205), IL-1 (30), galanine (190), GAP (316), neuropeptide K (154), neuropeptide γ (154)	Sbce P et opioïdes (inhibition de l'effet du LHRH) (35, 50, 75), inhibine (suppression du pic préovulatoire) (77)
PROLACTINE (PRL) (Cellules lactotropes)	AII (96), VIP (271, 1), TRH (271), bradykinine ; kallidine (151), Epidermal Growth Factor (EGF) (151), Fibroblast Growth Factor (FGF) (potentialise l'effet du TRH) (151), IL-6 (271), Sbce P (8), neurotensine (chez le mâle) (8), PGE ₂ (271), protéine S-100 (143), oestradiol (106)	dopamine (96), SRIF (138, 271), neurotensine (chez la femelle) (8), IL-1 (30), ACTH (30), GAP (316)
TSH (Thyroid Stimulating Hormone) (Cellules thyroïdotropes)	Thyrotropin Releasing Hormone (TRH), Fibroblast Growth Factor (FGF) (potentialise l'effet du TRH) (151), IL-1 (30)	neurotensine (8)

Tableau 1 : Facteurs de régulation de la sécrétion des hormones hypophysaires.

III) LHRH ET HYPOPHYSE : SYNTHÈSE DES GONADOTROPHINES

1°) Les gonadotrophines

Bien que de nombreuses molécules soient susceptibles d'interférer sur les fonctions gonadiques, seules 3 glycoprotéines structurellement apparentées portent le nom de gonadotrophines : la LH (Hormone Lutéinisante), la FSH (Hormone stimulant le Follicule) qui sont synthétisées dans l'antéhypophyse et la CG (Gonadotrophine Chorionique) qui est une hormone placentaire. Les gonadotrophines exercent des effets sur la stéroïdogénèse, la maturation et la libération des gamètes, et la libération de peptides gonadiques comme l'inhibine qui, à leur tour, vont contrôler les processus de synthèse et de sécrétion des gonadotrophines hypophysaires (73, 308).

a) Structures peptidiques des gonadotrophines

Les gonadotrophines sont des hormones glycoprotéiques d'une masse moléculaire d'environ 28 kDa (hLH), 34 kDa (hFSH) et 37 kDa (hCG). Il s'agit d'hétérodimères résultant de la liaison non covalente de sous-unités désignées sous le nom de α et β qui sont codées par des gènes différents. La sous unité α est commune à chacune de ces hormones (ainsi qu'à la TSH) alors que la sous-unité β est spécifique de chacune d'elles et va leur conférer leur activité biologique et leurs propriétés immunologiques particulières. La séquence en acides aminés de ces sous-unités est très conservée d'une espèce à l'autre bien qu'une certaine hétérogénéité soit rencontrée dans la partie N-terminale des chaînes α et β de même que dans la partie C-terminale de certaines sous-unités β (308).

b) Rôle des structures glycaniques des gonadotrophines

Les gonadotrophines présentent uniquement des chaînes N-glycaniques sur les 2 sous-unités α et β à l'exception de chaînes O-glycaniques localisées sur l'extrémité C-terminale de la β -CG. Ces structures glycaniques sont à l'origine de l'existence de nombreuses isoformes de ces gonadotrophines en raison essentiellement de leur contenu plus ou moins abondant en acides sialiques et en groupements sulfates (308).

L'existence de ces isoformes dont l'activité biologique est variable, explique les discordances rencontrées lors de l'étude comparée du dosage radioimmunologique (I) de ces hormones et de leur effet stéroïdogène (B = bioassay) (discordance exprimée par le rapport B/I).

Il apparaît ainsi que le rapport B/I est plus élevé pour les isoformes les plus basiques.

Les structures glycaniques ont également :

- un rôle de protection des gonadotrophines, les formes les plus acides ayant la demi-vie la plus longue et donc une plus grande durée d'action

- un rôle dans l'activation des récepteurs gonadiques par les gonadotrophines, dans la mesure où, une fois déglycosylées, ces dernières ont une activité stéroïdogène réduite de 1 à 10 % par rapport à celle de l'hormone intacte. Il est par ailleurs intéressant de noter que la déglycosylation de la chaîne α de la LH mais non celle de la chaîne β entraîne des effets similaires à ceux obtenus lors de la déglycosylation de la molécule entière.

c) Régulation de la glycosylation des gonadotrophines

Cette régulation est mal connue et fait l'objet d'études souvent contradictoires. Il apparaît cependant que la testostérone augmenterait la sialylation et que les oestrogènes la diminuerait en activant une neuraminidase hypophysaire (308).

Par ailleurs, il a été montré *in vitro* sur des préparations hypophysaires, que le LHRH, à des concentrations plus faibles que celles requises pour stimuler la sécrétion de LH, augmenterait l'incorporation de glucosamine ainsi que la sulfatation de la molécule de LH (308).

2°) Action du LHRH sur les cellules gonadotropes de l'hypophyse

a) Synthèse des gonadotrophines

Le LHRH stimule la libération par l'hypophyse de LH et de FSH. Le caractère pulsatile de la sécrétion du décapeptide augmente la transcription des gènes codant pour les ARNm des sous unités α et β de la FSH et de la sous unité β de la LH (310), la fréquence de la sécrétion étant très importante pour l'expression quantitativement différentielle des mRNA des sous unités (114, 142).

La transcription du gène codant pour la sous unité β constitue pour sa part l'étape limitante de la formation de la LH "hétérodimère" (315).

Il faut cependant noter que la sécrétion pulsatile de FSH apparaît régulée par un facteur hypothalamique différent du LHRH (le FSH-RF) mais que la présence du LHRH est requise pour maintenir des taux sériques élevés de FSH (76).

b) Régulation de la synthèse des gonadotrophines

Outre l'effet de facteurs d'origine hypothalamique, des composés stéroïdiens et protéiques d'origine gonadique jouent un grand rôle dans la régulation endocrine de la sécrétion des gonadotropines par l'hypophyse. Il s'agit d'une part de l'oestradiol (E2), de la progestérone (P) (importants chez la femelle) et de la testostérone (importante chez le mâle) ; et d'autre part de l'inhibine, de l'activine, et de la follistatine (195).

Chez la femelle, E2 et P modulent la sécrétion de LH induite par le GnRH, dans le sens soit d'une inhibition soit d'une stimulation (106,233). Il a été ainsi montré, *in vitro*, qu'une exposition prolongée à la progestérone de cellules gonadotropes inhibe la sécrétion de LH LHRH-dépendante, mais qu'une exposition courte à la progestérone de ces cellules préalablement mises en présence d'Oestradiol augmente la sécrétion de LH LHRH-dépendante (233).

Chez le mâle, la testostérone a un effet inhibiteur plus important sur la sécrétion LHRH-dépendante de LH que sur celle de FSH (310). Par ailleurs, comme on l'a déjà indiqué, une des actions de la testostérone est de ralentir le "LHRH pulse generator" ce qui influe sur les sécrétions de FSH et LH ainsi que sur l'expression de leur ARNm (142). Enfin, ce stéroïde agit également directement sur les cellules gonadotropes en induisant une diminution du nombre de leurs récepteurs pour le LHRH (68, 110).

En ce qui concerne l'E2, ce stéroïde augmente *in vitro* chez le mâle la sécrétion hypophysaire de LH et FSH mais la diminue *in vivo* ce qui semble indiquer que le site d'action de l'E2 se situe au niveau du "LHRH-pulse generator" (170).

L'inhibine et l'activine (312), modulent également la sécrétion de la LH et de la FSH en réponse au LHRH (inhibition par l'inhibine et activation par l'activine) (77, 301, 312). L'inhibine diminue la sécrétion basale de FSH alors que la testostérone la stimule. Cependant, lors d'une stimulation des

cellules gonadotropes par le LHRH, inhibine et testostérone agissent de concert pour supprimer la sécrétion des gonadotrophines (167).

Il a été proposé que l'effet en synergie de ces deux composés pourrait se situer au niveau des récepteurs du LHRH dans la mesure où l'inhibine est capable de s'opposer à leur "up-régulation" induite par l'hormone homologue (45) et que la testostérone entraîne également une diminution du nombre de ces récepteurs à la surface des cellules gonadotropes.

Enfin, rappelons que de nombreux composés (parmi lesquels un grand nombre de neuropeptides) contrôlent la synthèse et de la sécrétion des gonadotrophines (Tableau 1).

3°) Evénements moléculaires résultant de la fixation du LHRH sur son récepteur

Lors de la stimulation des cellules gonadotropes, il s'installe transitoirement un état de désensibilisation qui repose sur 3 phénomènes : "down-régulation" des récepteurs, découplage des récepteurs restants de leurs signaux effecteurs, et inhibition de la synthèse hormonale (300).

a) "Down- et up-régulation" des récepteurs pour le LHRH

Les cellules gonadotropes possèdent à leur surface environ 15 000 récepteurs pour le LHRH.

La fixation du décapeptide sur ces récepteurs induit une microagrégation de ceux-ci puis leur internalisation par endocytose avec libération de seconds messagers qui vont induire la mobilisation de calcium (Ca^{2+}) et l'exocytose de la LH. Les seconds messagers impliqués sont l'AMP cyclique mais surtout des composés résultant de l'activation de la voie des phosphoinositides (inositol triphosphate (IP3) et diacylglycérol [DAG]) (73) qui jouent un rôle important dans la mobilisation des réserves de calcium et la phosphorylation des protéines.

Par ailleurs, le LHRH est avec l'angiotensine II (AII) et la prolactine, une des rares hormones capable d'induire l'augmentation du nombre de ses propres récepteurs (up-régulation) (67).

Ainsi, l'exposition de cellules gonadotropes à des concentrations physiologiques (0,1-1 nM) de LHRH, entraîne une diminution initiale de 30 à 40 % des récepteurs du décapeptide ("down régulation") dans un délai de 1 à 2 heures (70), cette diminution coïncidant avec la libération de LH

qui survient au bout d'environ 1 heure (1-4 heures). On peut ensuite observer dans un délai de 6 à 10 heures une augmentation d'un facteur 2 à 3 de ces récepteurs ("up-régulation").

Des composés stéroïdiens peuvent également intervenir sur le nombre de ces récepteurs.

L'oestradiol (E2) induit en 24 heures une augmentation de leur nombre tandis que la dihydrotestostérone provoque leur diminution en 48 heures.

b) Désensibilisation des récepteurs hypophysaires du LHRH

La fixation du LHRH sur ses récepteurs hypophysaires entraîne une inactivation transitoire des récepteurs restants exposés à la surface de la cellule gonadotrope. Dans les conditions physiologiques, cette désensibilisation, dont l'importance dépend de la dose de LHRH apporté sur la cellule ainsi que de la durée d'exposition au décapeptide, est de courte durée du fait du caractère pulsatile de la sécrétion du LHRH.

c) LHRH et synthèse hormonale dans la cellule gonadotrope

En cas de désensibilisation prolongée, on observe une diminution du contenu hypophysaire en LH (67) ce qui implique que la biosynthèse de cette dernière hormone est altérée. Ce phénomène est lié à une diminution marquée de la synthèse de la sous-unité β alors que la synthèse de la sous-unité α est augmentée (315).

4°) Effets extra-hypophysaires du LHRH

Des peptides "LHRH-like" (263) interviennent dans les régulations paracrines tant testiculaires (31) qu'ovariennes par l'intermédiaire de récepteurs qui ont été décrits à la surface des cellules de Leydig de rats (48) ainsi que dans les ovaires de rates (15, 34).

Le placenta humain exprime, pour sa part, le gène du LHRH et produit de l'authentique LHRH à partir d'un mRNA identique à celui de l'hypothalamus. Ce LHRH stimule la production d'hCG par le trophoblaste qui possède des récepteurs spécifiques de faible affinité (67).

IV) LE TESTICULE

1°) Organisation structurale et cellulaire du testicule

Le testicule des mammifères est constitué par l'assemblage, au sein d'une charpente de tissu conjonctif, de différentes cellules : Sertoli, Leydig, germinales et péritubulaires.

La charpente de tissu conjonctif comprend : (i) la capsule (ou albuginée) qui entoure tout l'organe ; (ii) des travées conjonctives qui en partent et définissent des lobules ; (iii) le corps de Highmore, situé à la face postérieure du testicule, où les travées conjonctives se rejoignent au niveau d'un épaissement de la capsule (Figure 2).

A l'intérieur de chaque lobule se trouvent 2 à 3 tubes séminifères d'un diamètre de 150 à 300 μm et d'une longueur de 0,3 à 1,5 m. Les tubes sont constitués de l'extérieur vers l'intérieur d'un fin tissu conjonctif qui renferme les cellules myoïdes péritubulaires, d'une matrice extracellulaire (contenant fibronectine, laminine, collagène...) et d'une lame basale sur laquelle reposent les cellules de Sertoli. Les cellules de Sertoli, qui s'étendent de la surface basale à la surface apicale des tubes, entourent de façon étroite les cellules appartenant à la lignée germinale (spermatogonies, spermatocytes, spermatides et spermatozoïdes), ces dernières étant isolées des constituants sanguins dans la mesure où les cellules de Sertoli établissent entre elles des jonctions étroites ("Tight junctions") qui définissent une "barrière hémato-testiculaire".

Les cellules de Sertoli ont un rôle essentiel dans le processus normal de la spermatogénèse (266) en assurant le ravitaillement énergétique (lactate et pyruvate) des cellules germinales. Elles produisent également des protéines analogues à celles du sérum (transferrine, céruléoplasmine, transcortine...) et de nombreuses autres protéines spécifiques comme l'"Androgen Binding Protein" (ABP) qui vont se substituer aux protéines sériques qui ne peuvent pas traverser la "barrière hémato-testiculaire".

A la sortie du lobule, les tubes séminifères se continuent par des tubes droits très courts qui s'anastomosent dans le corps de Highmore pour former le *rete testis* d'où naissent une douzaine de canaux efférents qui émergent à la surface du testicule pour former la tête de l'épididyme.

Dans l'interstitium du testicule, entre les tubules, se trouvent les cellules de Leydig qui sont des cellules polyédriques groupées en petits amas autour des capillaires sanguins mais également à la périphérie des tubes séminifères.

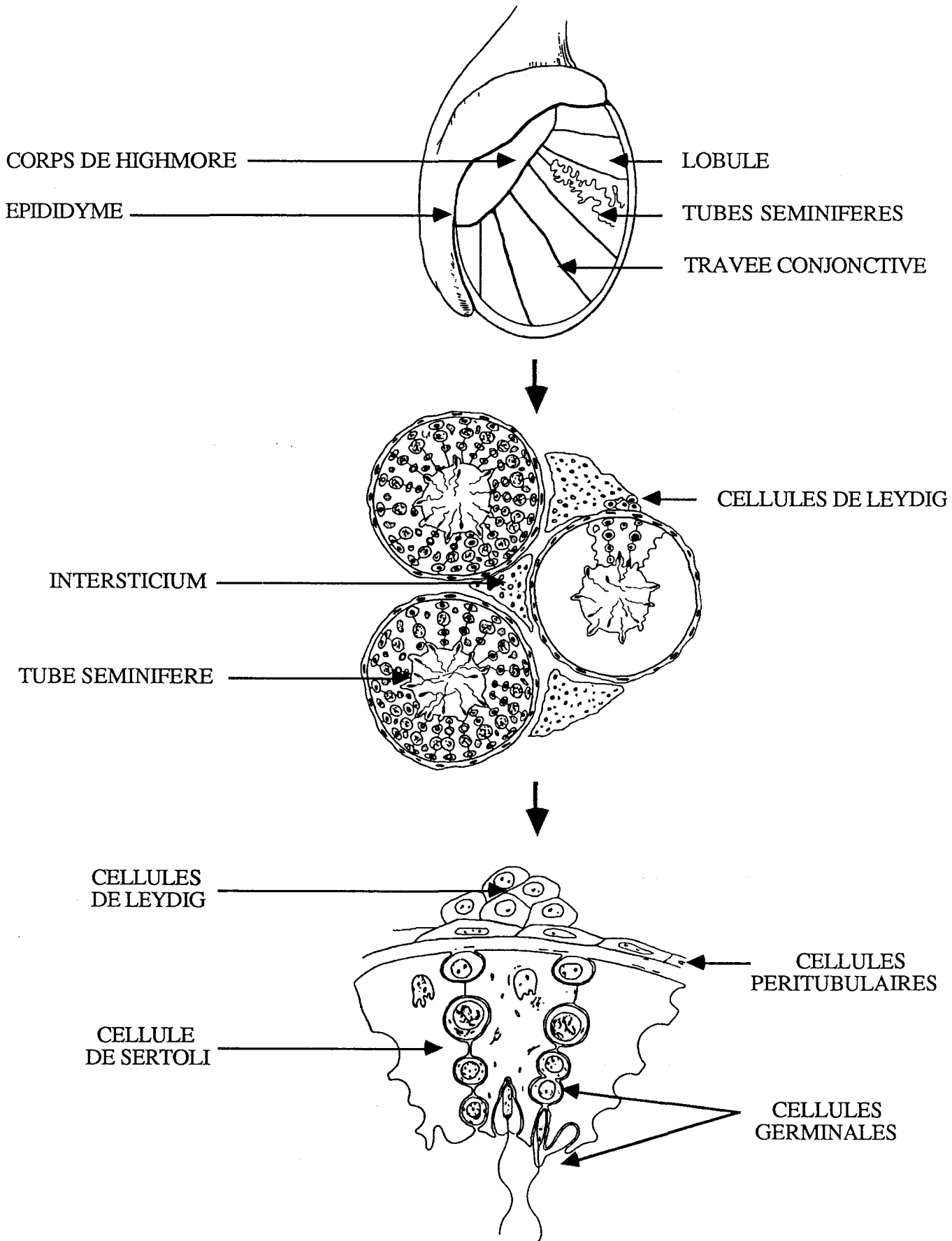


Figure 2 : Histologie du testicule [D'après Skinner (266)]

On trouve également dans l'interstitium des cellules macrophagiques et un riche réseau de capillaires sanguins (266).

2°) Régulations hormonales testiculaires

Les cellules testiculaires, et en particulier les cellules de Leydig et de Sertoli, sont soumises à une régulation endocrine assurée par les hormones hypophysaires LH et FSH.

La LH agit sur les cellules de Leydig et stimule via l'AMPc la synthèse et la sécrétion d'androgènes, en particulier la testostérone qui joue un rôle très important dans la spermatogénèse (115).

La FSH agit essentiellement sur la fonction sertolienne (267) et influence par ce biais le développement des cellules germinales (Tableaux 2).

Aux régulations endocrines se surajoutent de nombreuses régulations paracrines et autocrines (Tableaux 2) dans lesquelles les facteurs peptidiques sont nombreux à intervenir : IGF-I (266), Proopiomélanocortine (POMC) (289) et peptides dérivés : β endorphine (97), ACTH et α -MSH (95), enkephalines (258), dynorphine (193), γ endorphine (177), Arginine vasopressine (155), substance P (61), GHRH (32), substance "LHRH-like" (263, 87, 33), TRH (264) et CRF (101, 313, 98, 86).

Au regard de cette liste non exhaustive, il apparaît donc que des désordres fonctionnels testiculaires sont susceptibles d'apparaître en cas de catabolisme accru de ces peptides.

COMPOSES	SITES DE PRODUCTION	SITES D'ACTION	ACTIONS/FONCTIONS
Testostérone (T)	cellules de Leydig	-cellules péricubulaires -cellules de Sertoli	-stimulation de la production de Protéine Modulant la fonction Sertolienne (P-Mod-S) (80) -augmentation de la synthèse d'ABP (79, 129) -action synergique avec la FSH indispensable à certaines étapes de la spermatogénèse (129, 276)
Oestradiol (E2)	cellules de Sertoli et/ou (en fonction de l'âge) cellules de Leydig (56, 236)	cellules de Leydig	diminution de la stéroïdogénèse
facteur LHRH-like (80, 263)	cellules de Sertoli	cellules de Leydig	-augmentation (213) puis diminution (66) de la stéroïdogénèse
Androgen Binding Protein (ABP) (78, 79, 80)	cellules de Sertoli	cellules germinales	-accumulation de testostérone dans les tubes séminifères (129, 266)

Tableau 2-A : facteurs impliqués dans les régulations paracrines et autocrines testiculaires.

COMPOSES	SITES DE PRODUCTION	SITES D'ACTION	ACTIONS/FONCTIONS
Transforming Growth factor α (TGF α) (166, 184)	cellules de Sertoli (266) cellules péritubulaires (266)	cellules de Leydig cellules péritubulaires	diminution de la st�ro�idog�nese et augmentation de la croissance cellulaire
TGF β_1 (184, 215, 269)	cellules de Sertoli cellules péritubulaires cellules germinales (215)	cellules de Leydig cellules de Sertoli	-diminution du nombre des récepteurs de la LH � la surface des cellules -diminution des effets st�ro�idog�nes de la LH -inhibition des effets de la FSH sur la production de lactate et l'activité aromatase
inhibine (49, 216, 311)	cellules de Sertoli cellules de Leydig	cellules de Leydig cellules germinales (311)	-augmentation de la st�ro�idog�nese (266) -inhibition de l'action de l'activine sur la production d'AMPc et de testostérone induite par l'hCG (311) -diminution du nombre de certaines spermatogonies (311)

Tableau 2-B : facteurs impliqués dans les régulations paracrines et autocrines testiculaires.

COMPOSES	SITES DE PRODUCTION	SITES D'ACTION	ACTIONS/FONCTIONS
activine (311)	cellules de Leydig (281) cellules de Sertoli (82)	cellules de Leydig cellules germinales (266)	-stimulation de la transformation de la Testostérone en Oestradiol -inhibition de la synthèse d'AMPc et de testostérone induite par l'hCG (311) -prolifération de certaines spermatogonies (311)
transferrine (Tf) (81, 266)	cellules de Sertoli	cellules germinales	transport du fer vers les cellules germinales (266)
-céruleoplasmine (voir revue 81) -Glycoprotéine sulfatée-1 (SGP-1) (266) -Retinol Binding Protein (RBP)	cellules de Sertoli	cellules germinales	-transport du cuivre (266) -transport des sphingolipides -transport du rétinol
pyruvate, lactate	cellules de Sertoli (voir revue 266)	cellules germinales	-source énergétiques pour les cellules germinales
Corticotropin-Releasing Factor (CRF)	cellules de Leydig (86)	cellules de Leydig	-inhibition de la synthèse de testostérone LH-induite. -stimulation de la sécrétion de β -endorphine par les cellules de Leydig

Tableau 2-C : facteurs impliqués dans les régulations paracrines et autocrines testiculaires.

COMPOSES	SITES DE PRODUCTION	SITES D'ACTION	ACTIONS/FONCTIONS
Peritubular Modulating Substance (P-Mod-S) (80, 249)	cellules myoïdes péritubulaires	cellules de Sertoli	-stimule la production d'ABP (266), de Tf (266) et d'inhibine -diminue l'activité aromatasé
Interleukine-1 (IL-1) (108, 247, 275)	macrophages cellules de Sertoli (266, 277) cellules de Leydig (187, 295)	cellules de Leydig cellules de Sertoli cellules germinales	-inhibition de la stéroïdogénèse -diminution de la synthèse d'IGF-I (187) -stimulation de la croissance des cellules germinales
β-endorphine (100, 266)	cellules de Leydig	cellules de Sertoli (80) cellules de Leydig (80)	-inhibition de l'effet de la FSH sur la croissance testiculaire et la synthèse d'ABP (95) -stimulation de la stéroïdogénèse en synergie avec la LH
Mélanostimuline (α-MSH) (80, 266)	cellules de Leydig	cellules de Sertoli	-potentialisation des effets de la FSH
Interleukine-6 (IL-6) (277)	cellules de Sertoli	cellules germinales	-rôle vraisemblable dans la régulation de la spermatogénèse

Tableau 2-D : facteurs impliqués dans les régulations paracrines et autocrines testiculaires.

COMPOSES	SITES DE PRODUCTION	SITES D'ACTION	ACTIONS/FONCTIONS
Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) (32)	cellules de Sertoli (266) cellules de Leydig (187) cellules germinales	cellules de Leydig (185) cellules de Sertoli	-augmentation de la stéroïdogénèse stimulée par la LH (166) -stimulation de la transformation du glucose en lactate
Facteurs paracrines Sertoliens (40, 54, 55, 60, 237)	cellules de Sertoli	cellules de Leydig	Modulation de la biosynthèse de testostérone

Tableau 2-E : Facteurs impliqués dans les régulations paracrines et autocrines testiculaires.

3°) Structure et distribution testiculaire du récepteur de la LH

Le récepteur testiculaire de la LH appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Dans le cas particulier du récepteur de la LH, la stimulation de la protéine G active l'adényl cyclase induisant la synthèse d'AMPC qui joue le rôle de second messager.

Le récepteur de la LH est une glycoprotéine de masse moléculaire 70 à 80 kDa (208, 268) dont l'extrémité N-terminale est extracellulaire et la partie C-terminale intracellulaire (250).

Cette glycoprotéine comporte de 20 à 30 % de N-glycannes (242, 268) qui n'interviennent pas dans l'affinité pour le ligand mais qui sont indispensables pour l'expression de récepteurs fonctionnels à la surface cellulaire (144).

La cellule de Leydig présente à sa surface de 4000 (113) à 20 000 (115) récepteurs de la LH. Ces récepteurs sont capables de reconnaître et fixer de la LH mais également l'hCG. Ils sont ainsi souvent

appelés LH/hCG-récepteurs. La constante d'affinité du récepteur sera cependant différente en fonction du ligand proposé (134).

4°) Fixation de la LH sur son récepteur

En fonction des travaux réalisés sur le comportement de l'hCG vis à vis du récepteur de la LH, on pense actuellement que les interactions entre la LH et son récepteur sont les suivants :

-La LH reconnaît son récepteur testiculaire par l'intermédiaire de sa sous-unité β , cette reconnaissance étant suivie d'une modification structurale du complexe ligand-récepteur et la stabilité de ce dernier est alors assurée par l'interaction de la sous-unité α avec le récepteur (208, 241).

-La fixation de la LH sur son récepteur entraîne également des modifications membranaires qui induisent transitoirement une augmentation du nombre des récepteurs disponibles à la surface de la cellule avec un maximum au bout d'une heure et un retour à la normale en 1,5 à 2 heures (135).

-Cette surexposition est rapidement suivie par une diminution du nombre des récepteurs exposés sans modification de leur affinité pour leur ligand (103). Ce dernier phénomène, qui est temps- et dose-dépendant, est appelé "Down-régulation" (303).

5°) "Down-régulation" des récepteurs testiculaires de la LH

La "Down-régulation" correspond à l'établissement d'un état d'équilibre entre l'internalisation de complexes [ligand-récepteur] (LR) et l'exposition à la surface de la cellule de Leydig de nouveaux récepteurs (194).

Cette modulation négative du nombre des récepteurs fait intervenir 3 phénomènes :

- Internalisation des complexes hormone-récepteurs et dégradation de ceux-ci dans les lysosomes (164)
- Protéolyse des récepteurs à la surface de la cellule par des protéases membranaires
- Diminution de la transcription du gène codant pour le récepteur

a) Dégradation des complexes [ligand-récepteur]

La dégradation lysosomiale des complexes LR, après internalisation dans des endosomes, constitue le principal mécanisme responsable de la "Down-régulation" (296).

La vitesse d'internalisation apparaît inversement proportionnelle à l'affinité du ligand pour le récepteur (9, 209) et est déterminée par la nature de la sous-unité β du ligand (210).

Pour sa part, la vitesse de dégradation des complexes [hCG-récepteur] est plus lente que celle des complexes [LH-récepteur] (260).

Enfin il est à noter qu'une partie des récepteurs internalisés seront recyclés à la surface cellulaire après dégradation du ligand (113).

b) Protéolyse du récepteur de la LH à la surface de la cellule de Leydig

Les enzymes responsables de cette protéolyse sont différentes des protéases lysosomiales. Il s'agit en fait d'enzymes membranaires possédant des activités de thiol- et de métallo-protéases (160, 162).

La protéolyse se produit en permanence à la surface des cellules de Leydig chez certaines espèces comme le rat (303), mais ne survient chez d'autres comme la souris (303) que lorsque l'hormone s'est fixée sur son récepteur, phénomène qui induit un remaniement de celui-ci et sa fragilisation vis à vis des protéases membranaires (162).

Le clivage protéolytique du récepteur de la LH a été étudié au niveau ovarien. Ce clivage libère 2 fragments de masses moléculaires 64 000 et 38 000 daltons (163).

c) Diminution de la synthèse des récepteurs

La "Down-régulation" fait également intervenir une diminution temporaire de la transcription du gène codant pour le récepteur (121), l'AMPC jouant un rôle fondamental dans cette diminution (297).

6°) Désensibilisation des récepteurs

La désensibilisation des récepteurs testiculaires est un événement indépendant de la réduction du nombre de ceux-ci à la surface de la cellule de Leydig (Down-régulation) (317).

Cette désensibilisation correspond à l'apparition temporaire d'un état réfractaire de la cellule à toute stimulation supplémentaire par la LH ou l'hCG.

Différentes explications ont été apportées pour expliquer ce phénomène.

- Inhibition partielle de la [17, 20] desmolase testiculaire par les oestrogènes produits localement (64).

- Diminution très importante de la capacité des récepteurs restants à activer l'adénylcyclase (127) du fait d'un découplage du récepteur de sa protéine G (83, 243).

Le stress est un facteur qui provoque une désensibilisation partielle des récepteurs testiculaires de la LH (59, 232), et il a été démontré que cet effet pourrait résulter de la libération dans la circulation générale de sérotonine qui induit la sécrétion par les cellules de Leydig de CRF, ce neuropeptide inhibant alors de manière autocrine la production d'androgènes induite par la LH (86).

7°) Autres facteurs de régulation des récepteurs testiculaires de la LH

L'Epidermal Growth Factor (EGF) possède des récepteurs spécifiques à la surface des cellules de Leydig (274, 302). Cet EGF induit, d'une part une réduction du nombre des récepteurs de la LH présents à la surface cellulaire en agissant au niveau transcriptionnel (296), et d'autre part une diminution de la réponse stéroïdogène à l'hCG (10).

Le LHRH, qui possède un récepteur spécifique sur les cellules de Leydig de rat (119), entraîne également une diminution du nombre des récepteurs de la LH ainsi que de la réponse stéroïdogène (146).

Enfin, la prolactine possède des récepteurs spécifiques sur les cellules de Leydig et induit une augmentation du nombre des récepteurs de la LH (279).

Les effets de la prolactine sur la stéroïdogénèse induite par la LH sont pour leur part très controversés et les plus récentes études indiquent que cet effet serait double : Inhibiteur à faible dose et activateur à forte dose.

La stéroïdogénèse basale (c'est-à-dire en dehors de toute stimulation par la LH) des cellules de Leydig n'est quant à elle pas significativement altérée *in vivo* par l'administration prolongée de prolactine (201) même si, *in vitro*, la prolactine active l'activité aromatasase de base des cellules de Leydig ce qui entraîne une accélération de la transformation de la testostérone en oestradiol (238).

D) DEGRADATION ENZYMATIQUE DES MEDIEATEURS PEPTIDIQUES

Les médiateurs peptidiques jouent un rôle primordial dans de nombreux processus biologiques au niveau du système nerveux central. Les enzymes qui vont dégrader ces neuropeptides (interrompant ou modifiant leur effet biologique) ont donc également une importance très grande et ont, de ce fait, été très étudiés au niveau cérébral.

I) ACTIVITES ENZYMATIQUES DANS LE CERVEAU

Parmi les activités mesurées dans le cerveau, on note les activités Endooligopeptidase A (7, 53, 283) ; Dipeptidyl peptidase identique à l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) (EC 3.4.15.1) (58), Endopeptidase 24.11 (EC 3.4.24.11) (21, 196) ; Endopeptidase 24.15 (EC 3.4.24.15) (3, 63, 230, 283) ; Prolyl endopeptidase (EC 3.4.21.26) (307) ; Pyroglutamate aminopeptidases I et II (46, 227) ; Aminopeptidases (227) et Carboxypeptidases (105).

Il apparaît qu'il n'existe pas d'activité enzymatique spécifique d'un seul substrat (173), la seule restriction provenant parfois d'une taille limite des peptides dégradables. De ce fait, ces différentes activités sont susceptibles de dégrader, outre le TRH (46, 112, 227, 307) (Figure 3) et le LHRH [Figure 4-A et Figure 4-B] (62, 112, 214, 227, 307), de nombreux peptides comme l'Angiotensine I (21, 58) et II (307), la Bradykinine (7, 21, 58, 62, 196, 204, 229, 307), la substance P (21, 58, 62, 112, 116, 196, 307) et les tachykinines en général (21, 196), les Enképhalines (7, 58, 112, 196, 230), les Dynorphines (3, 112, 283), la β -endorphine (112), l'ACTH (112), l' α -MSH (112), l'ocytocine (21, 112) et la neurotensine (7, 58, 62, 112, 196, 204, 283, 307).

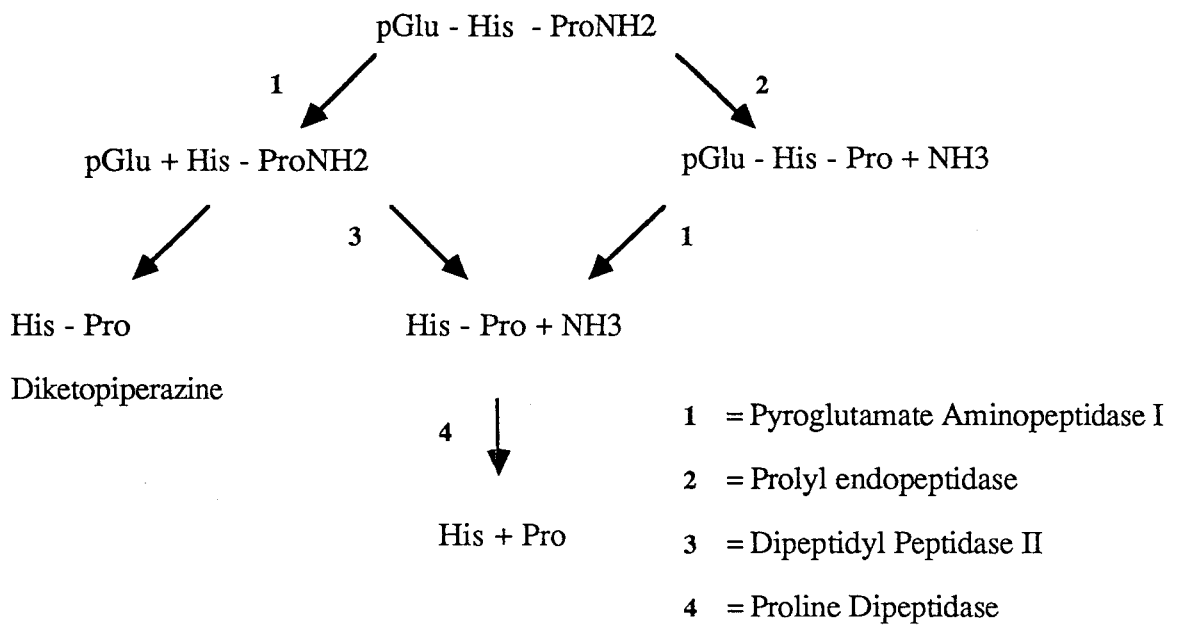


Figure 3-A : Dégradation du TRH dans le cerveau par des enzymes de la fraction soluble

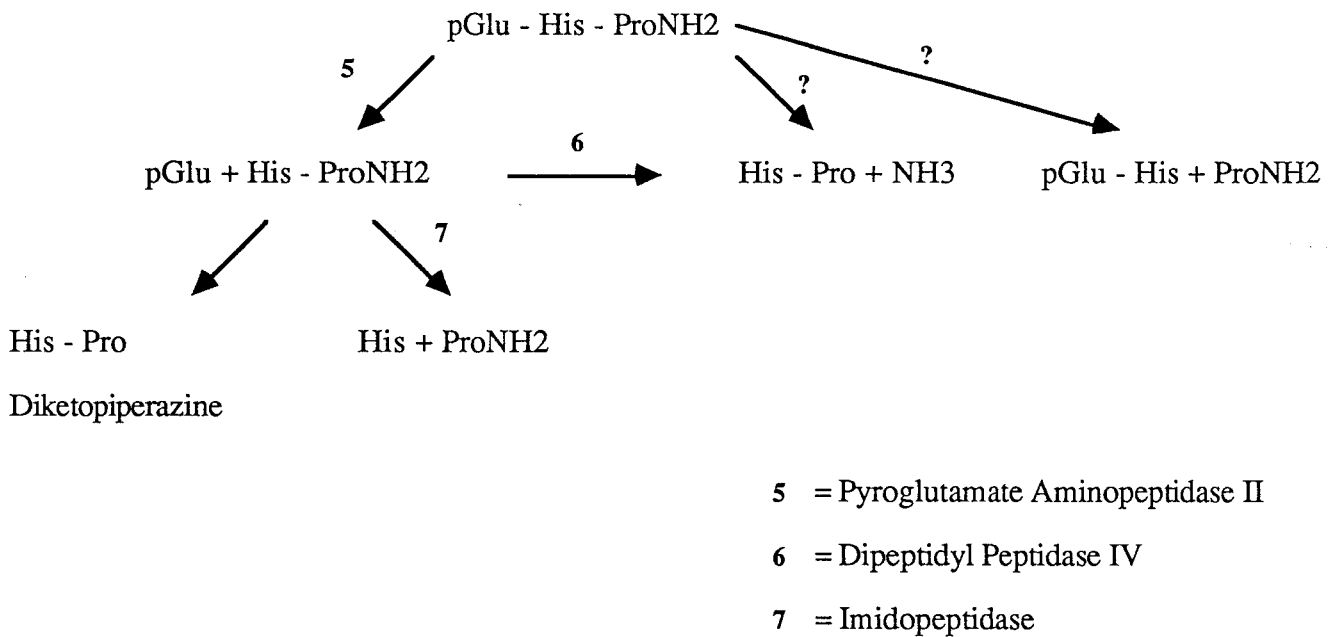


Figure 3-B : Dégradation dans le cerveau du TRH par des peptidases membranaires

Figures 3-A et B : Dégradation du TRH par les enzymes du cerveau (d'après 46 et 227)

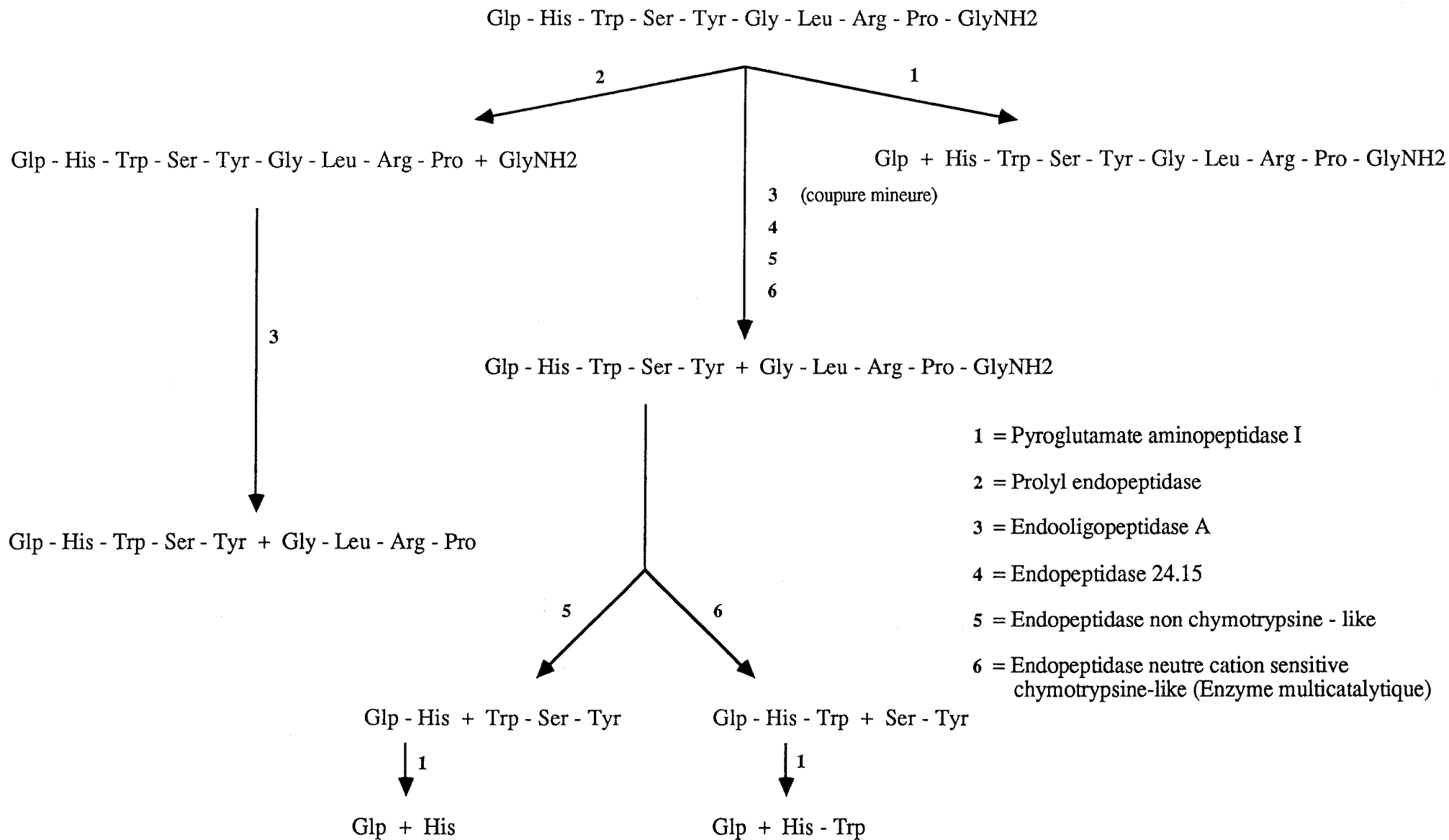


Figure 2 (a) :

DEGRADATION DU LHRH PAR DES ENZYMES DE LA FRACTION SOLUBLE DU CERVEAU (d'après 3, 227, 230, 305, 306, 307)

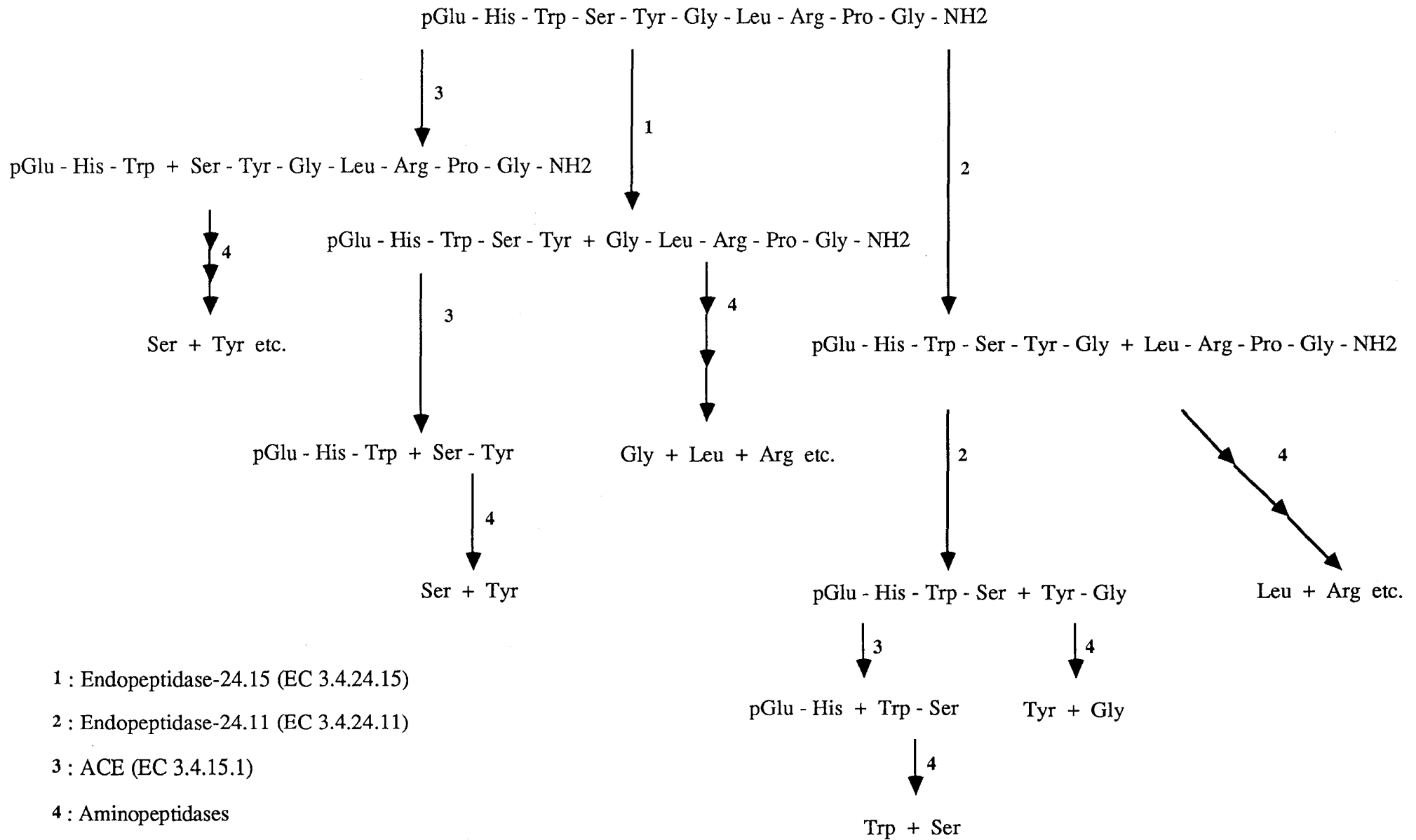


Figure 2 (b) :

DEGRADATION ENZYMATIQUE DANS LE CERVEAU DU LHRH PAR DES ENZYMES ASSOCIES AUX MEMBRANES (d'après 214 et 227)

II) PEPTIDASES ET ANTEHYPOPHYSE

L'antéhypophyse contient de nombreuses peptidases et protéases qui sont impliquées dans la maturation, la libération et la dégradation des hormones hypophysaires (191).

1°) Enzymes et sécrétion hormonale hypophysaire

On pense que des enzymes protéolytiques membranaires sont impliqués dans les processus de sécrétion bien que le rôle des protéases du compartiment intracellulaire ne puisse être exclu (191).

Ce rôle des composés enzymatiques dans les processus de sécrétion hormonaux a été suggéré par des équipes qui, travaillant sur des composés de nature tripeptide-aldéhyde dont on connaît l'effet inhibiteur de l'activité de sérine- et de thiol-protéases (comme le N-tert-butoxy-carbonyl-D-Phe-Pro-Arg-H ou t-Boc-D-Phe-Pro-Arg-H), ont montré que ces substances inhibent les sécrétions d'ACTH et de β -endorphine d'une part (20), et de GH et de PRL d'autre part (191), à partir de cellules antéhypophysaires stimulées *in vitro*.

Enfin, la trypsine et les enzymes trypsine-like présents dans l'hypophyse ont été proposés comme pouvant intervenir dans les processus de sécrétion (191), la cellule contrôlant leur activité par des inhibiteurs endogènes ou d'origine plasmatique comme l' α 1-Protease-Inhibiteur (207).

2°) Enzymes et dégradation hormonale hypophysaire

Différentes activités enzymatiques ont été identifiées dans l'hypophyse : Endopeptidase 24.15 [activité retrouvée dans les fractions solubles et particulaires] (204, 214) ; Endopeptidase 24.11 [activité associée à la membrane cytoplasmique et identique à l'Enképhalinase ou Thermolysine-like Métalloendopeptidase (3)] (4, 125, 214) ; Enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) [activité associée à la membrane cytoplasmique] (125) ; Endopeptidase neutre cation-sensible chymotrypsine-like [enzyme multicatalytique retrouvée dans la fraction soluble] (305, 306) ; Prolyl endopeptidase [activité de la fraction soluble] (307) ; Pyroglutamate aminopeptidase (25, 288).

D'autres activités [Aminopeptidase (125) et Endopeptidase neutre cation- et thiol- dépendante (176)] ont été mises en évidence au niveau de la fraction mitochondriale de l'antéhypophyse de rat et ne sont sans doute pas impliquées dans l'inactivation biologique des neuropeptides.

Le rôle des enzymes va donc, dans ce cas, être double : inactivation des médiateurs peptidiques, et régulation des taux intracellulaires des hormones synthétisées dans les cellules.

a) Inactivation des médiateurs peptidiques

Les peptides sont des médiateurs importants du fonctionnement de l'hypophyse et de nombreuses activités enzymatiques, souvent à localisation membranaire, sont susceptibles de les dégrader et ainsi d'interrompre leur effet (27, 63, 124).

C'est le cas de l'Endopeptidase 24.11 présente à la surface des cellules gonadotropes et qui hydrolyse le LHRH (21).

Parfois cette activité fera l'objet d'une régulation hormonale. C'est le cas d'une Pyroglutamate aminopeptidase qui est responsable de la dégradation du TRH et dont l'activité est augmentée par l'hormone thyroïdienne T3 (25) et diminuée par l'oestradiol (288).

b) Régulation des taux intracellulaires d'hormones

Les enzymes constituent également un moyen pour les cellules de réguler leur taux intracellulaire d'hormones.

Ainsi, au cours des processus d'hypersecrétions hormonales, on observe un phénomène dit de crinophagie qui correspond à la fusion des granules de sécrétion avec des lysosomes (16, 212) dont on connaît la richesse en enzymes protéolytiques de type cathepsine. Cette fusion a pour résultat une dégradation des composés hormonaux contenus dans les granules.

La crinophagie a été décrite pour les cellules corticotropes, lactotropes, somatotropes, gonadotropes et thyroïdiques (16, 212).

c) Rôle des enzymes plasmatiques

Il est à noter que des enzymes d'origine plasmatique sont potentiellement capables de dégrader les médiateurs peptidiques présents à la surface des cellules de l'hypophyse. Par exemple, une activité Pyroglutamate peptidase, permettant la dégradation du TRH, a été mise en évidence dans le sérum de porc (26).

3°) Enzymes et modifications post-traductionnelles des composés hormonaux

Des modifications post-traductionnelles de composés hormonaux faisant intervenir différentes activités enzymatiques peuvent survenir à l'intérieur des granules de sécrétion.

-Des Cathepsines (Cystéines protéases habituellement à localisation lysosomiale) (22) appartenant plus particulièrement aux classes B, H et L (285) (Tableau 3) sont rencontrées dans les granules de sécrétion en dehors des processus de crinophagie, ce qui suggère qu'elles jouent un rôle dans les processus de maturation des hormones peptidiques (287).

Ces 3 activités enzymatiques (en particulier, celle de la cathepsine B) ont ainsi été mises en évidence dans les granules de sécrétion de rénine des cellules juxtaglomérulaires de rat (197, 280).

Par ailleurs, il a été démontré la coexistence de cystatine β (un inhibiteur endogène de cystéine-protéases) et d'insuline dans les cellules β pancréatiques de rat (298) ; de cathepsine B et du peptide atrial natriurétique dans les granules de sécrétion des cellules atriales myoendocrines de rat (299) ; et des cathepsines B, H et L avec la thyroxine dans les granules cytoplasmiques des cellules thyroïdiennes folliculaires de rat (287).

Au niveau hypophysaire, une activité de type cathepsine H est retrouvée dans les granules de sécrétion des cellules corticotropes.

Par ailleurs, les granules de sécrétion des cellules gonadotropes contiennent à la fois une activité cathepsine B, de la LH, de la prorénine et de la rénine ce qui laisse supposer que la cathepsine B joue un rôle dans l'activation de la rénine au sein de ces granules (286).

-Une activité Kallicréine (EC 3.4.21.35), inductible par les oestrogènes (118), a été décrite dans les granules de sécrétion des cellules lactotropes d'hypophyses de rat (126) où elle est responsable du clivage de la PRL en fragments plus courts : les PLMs (PRL-like molecules), également secrétées mais dont le rôle physiologique est encore mal connu (126).

-Une activité enzymatique de type peptidylglycine α -amidation monooxygénase ou PAM (EC 1.14.17.3) (92) est présente pour sa part dans les granules de sécrétion des cellules antéhypophysaires où elle joue un rôle très important dans la synthèse, à partir de prohormones, d'hormones peptidiques ayant un résidu amide en position C-terminale (44, 91).

-Enfin, une activité Carboxypeptidase B-like a également été décrite dans les granules de sécrétion de l'hypophyse. Cette activité permet le clivage des arginines ou lysines C-terminales de

nombreux précurseurs de neuropeptides (105) comme la Met -enképhaline-Arg⁶ qui est transformée en Met-enképhaline.

	CATHEPSINE B	CATHEPSINE H	CATHEPSINE L
SUBSTRAT RECOMMANDE	Z-Arg-Arg-AMC	H-Arg-AMC	Z-Phe-Arg-AMC
MM (kDa)	24	28	23
pH OPTIMUM	6	6,8	5,5
PHi	4,5 à 5,5	6 à 7,1	5,5 à 6,1

Tableau 3 : Caractéristiques générales des cathepsines B, H et L.

Nb : Z-Phe-Arg-AMC est insensible à la Cathepsine H mais est dégradé par la Cathepsine B.

III) PEPTIDASES TESTICULAIRES

Des activités peptidasiques ont également été décrites au niveau du testicule et si elles sont relativement moins étudiées à l'heure actuelle que celles existant tant au niveau hypophysaire que central on peut penser qu'en général elles sont très proches sinon identiques à celles précédemment présentées. Dans ce sens, il a été mis en évidence dans le testicule des activités de type :

-ACE (Enzyme de conversion de l'Angiotensine) (29, 90, 123, 270) qui joue un rôle dans le métabolisme de l'angiotensine II, de la bradykinine, de la substance P et de la neurotensine. On estime ainsi qu'une activité dipeptidyl carboxypeptidase zinc dépendante (ce qui est le cas de l'ACE) est indispensable à la maturation et au développement des cellules germinales (245).

-Prolyl endopeptidase (307, 314) qui catabolise les peptides contenant une proline comme la substance P ou le LHRH.

-Endopeptidase 24.15 (24, 62, 231, 282) qui intervient dans la dégradation de la substance P, de la neurotensine, de la bradykinine et du LHRH.

-Carboxypeptidase (104) et Amino-peptidase (122, 199, 200, 293).

D'une manière générale, ces peptidases semblent plus particulièrement localisées dans les tubes séminifères (120) et plus particulièrement dans les cellules germinales (177).

-Les activités de type Cathepsine (en particulier B et L) semblent pour leur part peu abondantes dans le testicule (265).

E) PROTEASES ET PARASITISME

Le rôle des protéases parasitaires est fondamental dans l'adaptation et le développement des parasites chez un hôte (11, 235). Il a ainsi pu être démontré qu'elles interviennent dans l'invasion tissulaire (158, 240), la digestion des protéines de l'hôte (255), l'échappement aux réponses immunitaires et la prévention de la coagulation (206).

Parmi les 4 grandes classes de protéases (sérine-protéases, métallo-protéases, aspartyl-protéases et cystéine-protéases) (23), il apparaît que les cystéine-protéases constituent le groupe enzymatique majeur de nombreux protozoaires parasites (225) comme *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas foetus*, *Giardia lamblia* et *Entamoeba histolytica*. Les protéases des helminthes appartiennent, quant à elles, essentiellement aux sérine ou aux métallo-protéases (225).

I) ORIGINALITE ET CARACTERISTIQUES DES CYSTEINE-PROTEASES DES PROTOZOAIRES

De nombreuses études ont indiqué que les protéases les plus abondamment représentées dans les formes circulantes des trypanosomes africains appartiennent au groupe des cystéine-protéases. Elles sont apparentées aux cathepsines B et L des mammifères (189) avec lesquelles elles présentent néanmoins des différences quantitatives, fonctionnelles et structurales.

La plupart des tissus de mammifères ne renferment en effet que 3 types principaux de cystéine-protéases qui appartiennent aux groupes des cathepsines B, L et H.

Les protozoaires parasites (comme les trichomonas, les trypanosomes et *L. mexicana* renferment pour leur part un nombre relativement important de cystéine-protéases qui, comparées aux enzymes de mammifères, présentent une relative stabilité aux traitements alcalins (225) et ont une taille anormalement importante.

La séquence d'une cystéine-protéase de *Trypanosoma brucei* a d'ailleurs été déterminée par des techniques de biologie moléculaire et montre que si certaines régions de l'enzyme présentent de très grandes analogies avec la cathepsine L des mammifères, le gène du trypanosome code également pour une extension inhabituellement longue de la partie C-terminale dont une partie subsiste dans la protéine définitive (89, 217, 225)

II) LOCALISATION CELLULAIRE DES ENZYMES DU TRYPANOSOME

La plupart des cystéine-protéases de protozoaires sont localisées dans les lysosomes, ce qui est le cas pour les trypanosomes africains (189). Cependant, certains parasites sont capables de relarguer des protéases dans le milieu extérieur par un mécanisme encore mal connu.

En ce qui concerne *Trypanosoma brucei brucei*, il a été décrit dans les organelles "lysosome-like" de ces parasites, 2 cystéines-protéases "cathepsine L-like" à activité peptidolytique inhibée par le E-64 (188, 248).

Une activité cystéine peptidase cytosolique (188) active à pH alcalin (pH 8) a également été mise en évidence chez *Trypanosoma cruzi* ainsi que chez de nombreux autres trypanosomatidés parmi lesquels des trypanosomes africains comme *Trypanosoma brucei brucei*, *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense*, *T. evansi* et *T. equiperdum* (12).

Enfin, *Trypanosoma brucei brucei* possède également des enzymes de type sérine protéase (188) dont la localisation est vraisemblablement cytosolique.

III) ACTIVITES ENZYMATIQUES PLASMATIQUES D'ORIGINE PARASITAIRE

1°) Activités enzymatiques libérées par le parasite

Des peptidases parasitaires ont été mises en évidence dans le plasma de souris infestées par *Trypanosoma brucei brucei* (169) et celui de génisses parasitées par *Trypanosoma congolense* (168). Ces peptidases, qui sont libérées dans la circulation suite à la destruction des parasites par les défenses immunitaires, vont subir différentes destinées.

Ainsi, l'activité sérine peptidase cytoplasmique soluble à pH optimum alcalin de *Trypanosoma brucei brucei* est résistante à des inhibiteurs d'enzymes "trypsin-like" comme l'aprotinine et l' α_1 -protéase inhibiteur et n'est que partiellement inhibée par l' α_2 -macroglobuline ce qui implique que lors de sa libération dans le sang circulant elle puisse jouer un rôle important dans la pathogénie du parasite (188)

Par contre, les protéases lysosomales, lorsqu'elles sont libérées dans le torrent circulatoire, sont rapidement neutralisées par des inhibiteurs comme l' α_2 -macroglobuline, le kininogène et la cystatine (inhibiteur apparenté au kininogène) (188).

Ce dernier phénomène a été confirmé par Nwagwu et coll. (226) de la façon suivante.

Trypanosoma brucei brucei est capable de libérer, dans un tampon phosphate salin glucosé (PSG), différentes protéases dont les pH optima d'activité sont de 5,4 et 8,0. Lorsqu'on examine les activités protéolytiques des plasmas de rats infestés par ce même trypanosome, on retrouve l'activité avec un maximum à pH 8,0 mais aucune à pH 5,4 ce qui indique que la protéase active à pH 5,4 est instable ou indétectable dans le plasma des rats infestés (226).

2°) Interactions des constituants sériques avec les enzymes parasitaires

Le sérum de certaines espèces comme le rat et l'homme est capable pour sa part, lorsqu'il est mis en contact avec des enzymes parasitaires, d'induire l'apparition de nouveaux complexes enzymatiques actifs et d'entraîner une augmentation de l'activité protéolytique globale.

Ce phénomène apparaît lié à la fixation de l'enzyme parasitaire à un effecteur allostérique sérique ce qui entraîne une modification de sa masse moléculaire, de son activité et de son pH optimum qui est diminué. Cet événement n'est pas rencontré avec les enzymes lysosomales de mammifères ce qui indique une adaptation de l'équipement enzymatique des trypanosomes aux conditions de l'infestation (188).

RESULTATS

ETUDE DES DESEQUILIBRES ENDOCRINIENS SURVENANT AU COURS DE LA TRYPANOSOMIASE AFRICAINE

A) SUIVI DES REPERCUSSIONS SUR L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO- GONADIQUE D'UNE TRYPANOSOMIASE CHRONIQUE

Cette étude a été entreprise afin de valider le modèle expérimental d'infestation aiguë développé au laboratoire.

En effet, l'infestation expérimentale aiguë par *Trypanosoma brucei brucei* variants AnTat 1.1 A ou AnTat 1.8 présente sur au moins deux points des différences importantes avec l'infestation naturelle des humains et des animaux dans les zones d'endémie.

- la mort de l'animal survient en l'espace de 4 jours (contre 1 à plusieurs mois dans le modèle naturel)

- la parasitémie atteint au moment de la mort des animaux des niveaux très supérieurs à ceux observables sur le terrain.

On pouvait donc craindre que les déséquilibres endocriniens mis en évidence au laboratoire sur le modèle expérimental aigu ne soient pas liés à une intervention directe du trypanosome sur le fonctionnement de l'axe gonadique mais résultent d'une réponse non spécifique de l'organisme à un état infectieux très sévère.

Nous avons ainsi vérifié qu'une infestation se développant sur un mode "chronique" chez le rat (utilisation du variant *T. brucei brucei* AnTat 1.1 E) entraînait des déséquilibres endocriniens comparables à ceux observés lors d'une infestation aiguë.

L'étude a été entreprise sur 5 groupes de 6 rats mâles sains qui ont été inoculés par voie intrapéritonéale à $j = 0$ par 100 formes circulantes de *T. brucei brucei* AnTat 1.1 E mises en suspension dans du tampon PSG. Le développement de la parasitémie chez les rats infestés a été

suiti pendant 14 jours sur des échantillons de sang prélevés à la queue des animaux et, à $j = 0, 3, 5, 8$ et 14 , un groupe de 6 rats a été tué par décapitation à la même heure de la journée (pour tenir compte du rythme circadien de certains paramètres à doser) de façon à mesurer les taux sériques de LH, testostérone et corticostérone ainsi que la concentration hypophysaire en LH.

La Figure 5 reflète les variations dans le temps des taux sériques de la testostérone (T) et de la LH (S-LH) ainsi que celles du contenu hypophysaire en LH (P-LH) en fonction de la parasitémie. Les valeurs des différents paramètres suivis sont quant à elles reportées dans le Tableau 4.

Pourcentages de variation
(valeurs initiales = 100%)

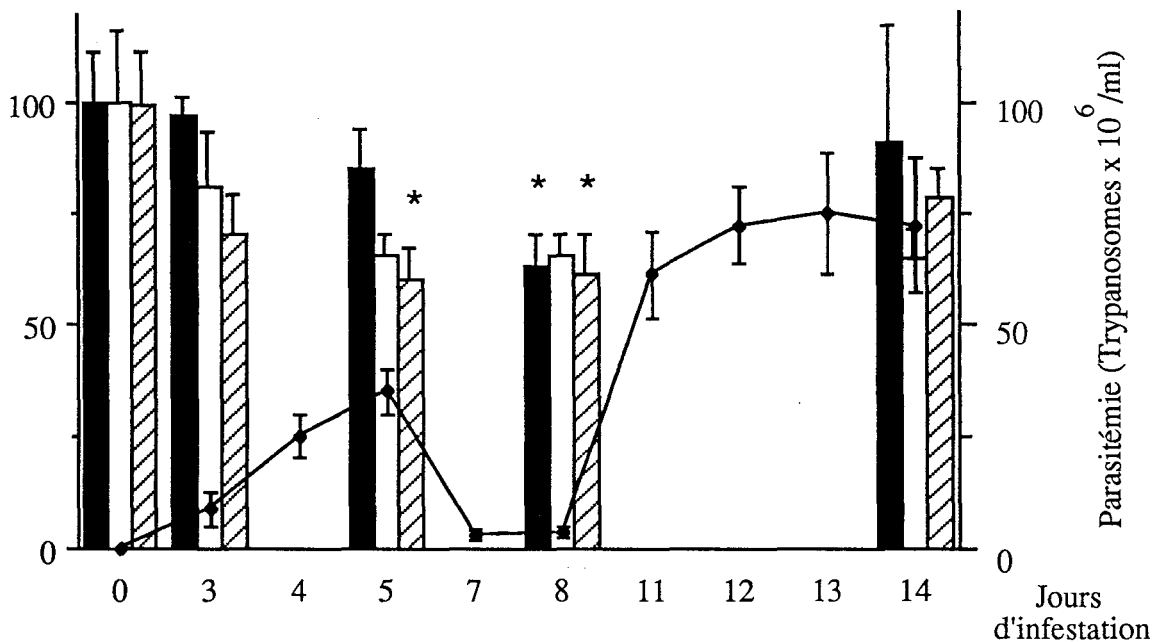


Figure 5 : Evolution au cours de la trypanosomiase chronique des taux sériques de testostérone (barres noires) et de LH (barres blanches) ainsi que du contenu hypophysaire en LH (barres hachurées) en fonction de la parasitémie (ligne noire continue) chez des groupes de 6 rats. Les étoiles indiquent les paramètres dont la valeur est significativement différente ($p < 0,05$) de celle mesurée chez les rats témoins à j_0 .

Jours	0	3	4	5	7	8	11	12	13	14
Parasitémie (Trypanosomes x 10 ⁶ / ml)	0	8.7 ± 3.7	25 ± 5	35 ± 5	3 ± 1	3.7 ± 1.2	61.2 ± 10	72.5 ± 8.7	75 ± 14	72.5 ± 15
LH hypophysaire (µg / hypophyse)	23 ± 2.7	16.3 ± 2.2		13.9 ± 1.7		14.2 ± 2				18.1 ± 1.6
LH sérique (ng / ml)	3.85 ± 0.64	3.13 ± 0.47		2.52 ± 0.17		2.53 ± 0.19				2.51 ± 0.24
Testostérone (ng / ml)	0.68 ± 0.08	0.66 ± 0.03		0.58 ± 0.06		0.43 ± 0.05				0.62 ± 0.18
Corticostérone (µg / l)	168 ± 24	234 ± 59		195 ± 45		178 ± 71				167 ± 43

Tableau 4 : Evolution de différents paramètres endocriniens et de la parasitémie au cours d'une trypanosomiase évoluant sur un mode chronique.

Les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM pour chaque groupe de 6 animaux.

On observe que l'infestation induit un premier pic de parasitémie à j0+5 (35 x 10⁶ Trypanosomes/ml) alors qu'un très petit nombre de parasites est observable dans le sang à j0+7 et j0+8, période correspondant à une phase de trypanolyse. Le premier pic est suivi d'un deuxième qui atteint son maximum vers le deuxième jour (environ 75 x 10⁶ trypanosomes/ml) et se maintiendra au moins jusqu'au vingt et unième jour, période où les animaux décéderont.

Avant le premier pic de parasitémie, les valeurs de la testostérone sérique ainsi que celles de LH (sérique et hypophysaire) restent comparables aux valeurs des témoins.

Par contre, après ce premier pic, les valeurs des différents paramètres endocriniens étudiés diminuent graduellement, avec un minimum vers j0+8 ; cette diminution coïncidant avec la phase de trypanolyse

ce qui suggère que les troubles observés ont pour origine des composés parasitaires libérés au cours de la lyse des parasites.

L'hypogonadisme (objectivé par la diminution du taux sérique de testostérone) est moins net à j0+14 qu'à j0+8, lorsque la parasitémie atteint un plateau, mais ce phénomène peut être lié à une adaptation à moyen terme de l'organisme aux dérèglements endocriniens induits par le parasite. Dans ce cadre, les taux de LH sériques et hypophysaires restent néanmoins plus bas que ceux des contrôles avec $0,05 < p < 0,1$.

La corticostéronémie (C), quant à elle, augmente de façon modérée à j0+3 puis revient à un taux comparable à celui des témoins à j0+8 (Tableau 4) ce qui correspond à l'évolution habituellement décrite de ce paramètre au cours d'un stress prolongé (246).

En fonction des observations réalisées sur ce modèle d'infestation "chronique" qui est proche de celui retrouvé en milieu naturel, il nous est donc apparu que l'utilisation d'un "modèle expérimental d'infestation aiguë" pour étudier les effets du trypanosome sur le fonctionnement de l'axe gonadotrope, était justifié dans la mesure où des déséquilibres endocriniens comparables étaient relevés dans les deux cas.

Par ailleurs le modèle "aigu" apporte sans doute plus de renseignements que le modèle "chronique" dans la mesure où le caractère important de l'infestation exacerbe les effets du parasite sur ses cibles privilégiées, l'organisme de l'animal n'ayant pas, de plus, le temps de s'adapter et de compenser les déséquilibres endocriniens provoqués.

B) ETUDE DES EFFETS D'UNE TRYPANOSOMIASE AIGUE CHEZ LE RAT

Les observations précédemment réalisées au laboratoire sur un modèle expérimental chez le rat d'infestation aiguë à *Trypanosoma brucei brucei* variant AnTat 1.1 A, avaient mis en évidence l'apparition en l'espace de trois jours d'un hypogonadisme (objectivé par la diminution du taux sérique de testostérone) accompagné d'une accumulation de LH dans l'hypophyse des rats infestés mais sans diminution significative de la LH sérique (130).

En fonction de ces résultats, le trypanosome apparaissait avoir deux cibles privilégiées : le testicule et l'hypophyse.

Nos travaux ont donc essentiellement consistés à élucider sur ce modèle d'infestation aiguë la physiopathologie de l'altération des fonctionnements hypophysaires et gonadiques.

I) DESORDRES ENDOCRINIENS ET METABOLIQUES INDUITS PAR UNE TRYPANOSOMIASE AIGUE

1°) Effets de la trypanosomiase sur la testostéronémie de base des rats

Notre première étude a consisté à vérifier la survenue d'un hypogonadisme en l'espace de trois jours chez les rats infestés.

Par ailleurs, dans l'optique d'une étude ultérieure des effets du parasite sur les récepteurs testiculaires de la LH, nous avons également étudié l'incidence du mode de sacrifice des animaux (décapitation ou injection de pentobarbital) sur la valeur des taux sériques de testostérone.

En effet, les rats utilisés ultérieurement pour l'étude de ces récepteurs devaient être sacrifiés par l'injection d'une solution de pentobarbital.

L'anesthésie étant susceptible d'induire un stress responsable d'une augmentation transitoire de la LH sérique et donc de testostérone, il convenait donc de vérifier que ce mode de sacrifice ne risquait pas de masquer l'hypogonadisme induit par l'infestation.

L'étude des taux sériques de la testostérone au cours de l'infestation par le trypanosome a été conduite sur 4 groupes de rats pour un nombre total de 94.

Les rats témoins ont été répartis en 2 groupes (groupe 1 (G1) : n = 22 et groupe 4 (G4) : n = 20) et ont été uniquement inoculés par voie intrapéritonéale (ip) avec 5 ml d'un tampon PSG de pH 8,0 (38 mM Na₂HPO₄, 29 mM NaCl, 83,3 mM glucose) à j = 0. Ce même jour, 2 groupes de rats (groupe 2 (G2) : n = 26 et groupe 3 (G3) : n = 26) ont été inoculés en ip par 50 x 10⁶ formes circulantes de

trypanosomes diluées dans le PSG et appartenant respectivement aux variants *T. brucei brucei* AnTat 1.1 A et AnTat 1.8.

Trois jours après l'infestation, les rats parasités ont développé une parasitose aiguë (plus de 360×10^6 trypanosomes/ml de sang) et ont été sacrifiés entre 09h00 et 11h00 le matin.

-Le groupe 4 a été décapité et le sang récupéré à partir du tronc dans des tubes secs de 10 ml.

-Les rats appartenant aux groupes 1, 2 et 3 ont reçus chacun par voie ip l'injection d'un mélange contenant 0,5 ml d'héparine (Liquemine[®], Roche) et 0,6 ml de pentobarbital (Pentobarbital sodique[®], Sanofi). Le sang des animaux a ensuite été prélevé par ponction intracardiaque.

Après préparation, les sérums ont été conservés à -20°C pour la détermination ultérieure des taux sériques de testostérone.

La valeur moyenne de ces taux, pour chacun des groupes étudiés, est reportée dans le Tableau 5.

	<u>Groupe 1</u> (G1)	<u>Groupe 2</u> (G2)	<u>Groupe 3</u> (G3)	<u>Groupe 4</u> (G4)	Analyse statistique (test de Student)
Testostérone (ng/ml)	2,51 $\pm 0,25$	1,09 $\pm 0,23$	0,93 $\pm 0,14$	1,94 $\pm 0,36$	G1/G2 : $p < 0,001$ G1/G3 : $p < 0,001$

Tableau 5 : Taux sériques de testostérone de rats sains ou parasités au bout de 3 jours d'infestation en fonction du mode de sacrifice.

A la vue de ces résultats, il apparaît clairement que notre modèle d'infestation expérimentale aiguë induit en l'espace de 3 jours un hypofonctionnement gonadique objectivé par la diminution du taux sérique de testostérone.

Les études statistiques (test de Student) révèlent une différence significative entre les groupes 1 et 2 ($p < 0,001$) et entre les groupes 1 et 3 ($p < 0,001$). Il n'existe cependant pas d'identité entre les 2 groupes témoins (groupes 1 et 4) ($0,2 < p < 0,3$) ce qui indique que le sacrifice par anesthésie induit une légère augmentation de la production de testostérone (+29 %).

2°) Recherche de l'origine de l'hypogonadisme

La diminution de la production testiculaire de testostérone peut relever de 3 origines : hypothalamique, hypophysaire ou gonadique.

De manière à mieux cerner cette origine, deux expériences ont été menées. Tout d'abord, nous avons mesuré les taux de LH sérique de rats après trois jours d'infestation ; puis, nous avons réalisé une étude fonctionnelle testiculaire par un test de stimulation par l'hCG.

a) Taux sériques de LH le troisième jour d'une infestation aiguë

L'étude a été menée sur 2 groupes de rats (témoins, n = 8 et infestés [*T. b. brucei*. variant AnTat 1.1 A], n = 8). Pendant les 3 jours nécessaires au développement de la parasitose aiguë (parasitémie supérieure à 360×10^6 trypanosomes / ml) les rats n'ont pas été dérangés.

Le troisième jour, ils ont été tués par décapitation et le sang a été prélevé au tronc en vue de la mesure des taux de testostérone et de LH sériques.

Le résultat de ces mesures met en évidence une diminution conjointe des taux sériques de testostérone et de LH (environ 60 à 70 %) (Tableau 6).

	Rats témoins sains	Rats infestés	Différence statistique (test de Student)
Testostérone (ng/ml)	1,33 ± 0,23	0,57 ± 0,09	p < 0,01
LH (ng/ml)	4,12 ± 1,03	1,19 ± 0,31	p < 0,02

Tableau 6 : Evolution des taux de testostérone et de LH sériques après 3 jours d'infestation

par *Trypanosoma brucei brucei* variant AnTat 1.1 A. Chaque résultat est la moyenne obtenue à partir de 8 animaux ± SEM.

Ces résultats viennent contredire ceux précédemment publiés sur le même modèle expérimental par Hublart et col. (130) qui indiquaient que l'hypotestostéronémie ne s'accompagnait pas d'une diminution significative des taux de LH sériques. On peut donc en déduire que l'atteinte hypophysaire, si elle existe, n'est pas seule responsable du dysfonctionnement gonadique.

Dans ce sens, l'étude fonctionnelle testiculaire prend tout son intérêt.

b) Etude fonctionnelle testiculaire du rat parasité

De façon à évaluer la réponse testiculaire à une gonadotrophine exogène (hCG), 7 rats infestés depuis 3 jours par le variant *T. brucei brucei* AnTat 1.1 A et 6 rats témoins sains ont reçu par voie intrapéritonéale (ip) une injection de 500 µl d'une solution de chlorure de sodium isotonique (NSS) contenant de l'hCG à raison de 50 UI/100 g de poids vif (153). Trois rats sains, à titre de contrôles, ont reçus uniquement 500 µl de la solution NSS. Le sang de tout ces rats a été prélevé à la queue 1, 2, 3, 4 et 6 heures plus tard afin de mesurer la testostérone (volume unitaire prélevé : 400 µl).

La Figure 6 révèle clairement une altération de la capacité testiculaire à répondre à l'hCG chez les rats infestés. La production de testostérone apparaît ainsi retardée et diminuée par rapport à celle des rats témoins.

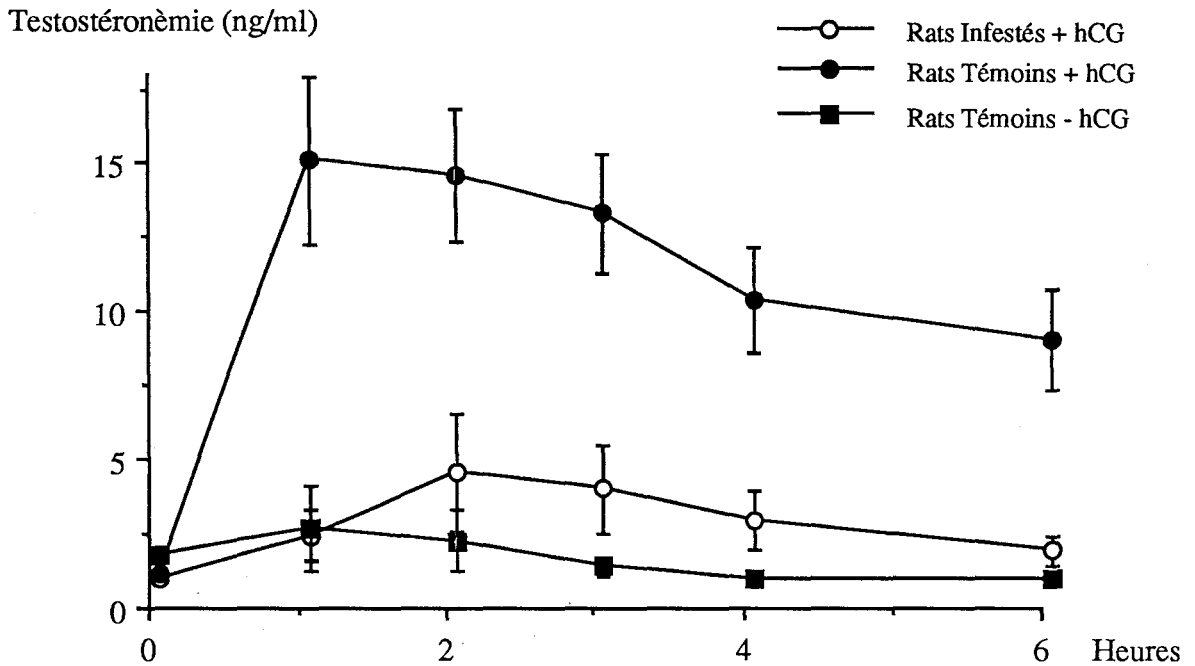


Figure 6 : Evolution des taux sériques de testostérone des rats suite à l'injection d'hCG.

Les ronds noirs correspondent aux rats sains, les ronds blancs aux rats infestés. Les carrés blancs montrent l'évolution de la testostérone chez des rats sains injectés uniquement à t=0 par du sérum physiologique.

Chaque point correspond à la moyenne du groupe étudié \pm SEM.

L'hypogonadisme survenant de manière précoce au cours de la trypanosomiase Africaine apparaît donc être essentiellement lié à une altération du fonctionnement testiculaire.

Parmi les causes possibles de ce dysfonctionnement, deux semblent particulièrement intéressantes à retenir : le stress et l'inflammation tissulaire générée par le parasite.

La trypanosomiase Africaine induit un stress. Ce stress, qui est révélé par l'augmentation de la cortisolémie chez les chèvres (219), entraîne chez le rat une diminution du taux sérique de testostérone qui est liée à une désensibilisation partielle des récepteurs testiculaires de la LH (59) sans modification de leur capacité de fixation ou de leur affinité (232).

Une cause possible de ce stress pourrait être l'hypoglycémie qui survient au cours de la parasitose autant chez l'homme (224) que chez l'animal (262), et qui résulte d'une augmentation de la consommation périphérique du glucose par le parasite ainsi qu'à la mobilisation des réserves de glycogène du foie du fait de l'altération des fonctions de ce dernier.

L'hypoglycémie constitue en effet la plus puissante source de stress chez les mammifères (304) et il a été démontré qu'elle induit une diminution de la sécrétion de LH (65).

L'hypotestostéronémie peut être aussi le résultat de l'inflammation testiculaire induite par le parasite.

En effet, le trypanosome induit chez le bélier (5) et le bouc (141) l'apparition d'un oedème testiculaire avec une infiltration diffuse de cellules macrophagiques et un envahissement de la *tunica vaginalis* par les parasites.

Les cellules macrophagiques, normalement présentes dans les tissus interstitiels testiculaires et en contact avec les cellules de Leydig, sont ainsi susceptibles d'intervenir dans l'inhibition de la stéroïdogénèse gonadique observée dans la trypanosomiase africaine. En effet, au cours de l'infestation par *T. b. brucei*, il a été démontré que ces cellules macrophagiques sont activées et libèrent de grandes quantités d'interleukine-1 (IL-1) et de prostaglandine E2 (PGE2) (13). Or l'IL-1 inhibe la stéroïdogénèse testiculaire (51) et si le rôle des prostaglandines au sein du testicule n'est pas encore bien défini (117), il a été suggéré qu'elles interviendraient dans les effets inhibiteurs des fonctions testiculaires par le LHRH (213). Il a ainsi été démontré *in vivo* que l'administration de prostaglandines entraînait une diminution de la spermatogénèse et de la testostéronémie (259).

Dans le cadre de notre modèle expérimental, le stress et le processus inflammatoire ont été respectivement mis en évidence par l'observation de l'augmentation des taux sériques de corticostérone et d' α_2 -macroglobuline [protéine augmentant précocement au cours des processus inflammatoires chez le rat (139)].

Par ailleurs, dans l'optique d'une étude étiologique plus approfondie du stress, les variations de la glycémie ont été suivies pendant les 3 jours d'infestation aiguë ainsi que celles des taux des

transaminases (TGO et TGP), utilisés dans le cas précis comme des marqueurs de l'intégrité hépatique.

3°) Mise en évidence de la survenue d'un stress et d'un processus inflammatoire au cours de la trypanosomiase

Les taux sériques de corticostérone (marqueur d'un stress) et d' α_2 -macroglobuline (témoin de l'existence d'un processus inflammatoire) ont été mesurés au bout de trois jours d'infestation chez les mêmes rats que ceux décrits dans le chapitre précédent (B-I-2°-a). Les résultats, rapportés dans le Tableau 7, montrent clairement que le parasite induit un état de stress et un processus inflammatoire qui sont des paramètres qui jouent certainement un rôle dans la survenue de l'hypogonadisme.

	Rats témoins sains	Rats infestés	Différence statistique (test de Student)
Corticostérone ($\mu\text{g/l}$)	162,9 \pm 50,7	354,3 \pm 56	p < 0,02
α_2 -macroglobuline (mg/l)	72 \pm 12	135 \pm 28	p < 0,05

Tableau 7 : Mise en évidence au bout de trois jours d'infestation aiguë de l'augmentation des taux sériques de la corticostérone (marqueur d'un stress) et de l' α_2 -macroglobuline (marqueur d'un processus inflammatoire).
Chaque résultat est la moyenne obtenue à partir de 8 animaux \pm SEM.

4°) Variations de la glycémie et des transaminases sériques au cours d'une infestation aiguë

Des rats (témoins, n = 7 et infestés, n = 6) ont été inoculés à 10h00 le matin respectivement soit avec le tampon PSG soit avec 50×10^6 formes circulantes de *T. brucei brucei* AnTat 1.1 A dans ce même PSG.

Le sang a été prélevé à la queue des mêmes rats pendant 3 jours de façon à mesurer la parasitémie, la glycémie et les activités transaminasiques sériques [transaminase glutamate-oxaloacétate (TGO) et transaminase glutamate-pyruvate (TGP)].

Le volume de chaque prélèvement a été d'environ 600 μ l pour une durée n'excédant pas 5 minutes par rat.

Le Tableau 8 met en évidence les variations de la glycémie et de l'activité des transaminases sériques pendant les 3 jours d'infestation. On peut ainsi observer une légère diminution de la glycémie le troisième jour de la parasitose (0,75 g/l pour 1,24 g/l chez les rats témoins), cette diminution étant pour une part liée à une atteinte hépatique (révélée par une augmentation des transaminases TGO et TGP) qui apparaît déjà au bout de 24 heures d'infestation, moment où les trypanosomes apparaissent dans le sang circulant des animaux parasités.

Jours	0	0,3	1	2	3
Parasites (x10 ⁶ /ml sang)	0	0	2 ± 0,8	109,6 ± 17,7	316 ± 47,7
Infestés Glycémie (g/l)	1,30 ± 0,05	1,35 ± 0,06	1,22 ± 0,06	1,08 ± 0,06	0,75 ± 0,04
Témoins	1,25 ± 0,06	1,25 ± 0,05	1,12 ± 0,12	1,22 ± 0,04	1,24 ± 0,02
Infestés TGO (UI/l)	170 ± 16	165 ± 10	162 ± 18	600 ± 94	1825 ± 262
Témoins	170 ± 13	159 ± 8	247 ± 33	204 ± 17	114 ± 13
Infestés TGP (UI/l)	56 ± 2	64 ± 5	77 ± 6	2183 ± 472	8254 ± 2416
Témoins	56 ± 2	51 ± 5	50 ± 5	56 ± 2	46 ± 4

Tableau 8 : Suivi de la glycémie et de l'activité des transaminases sériques en fonction de la parasitémie au cours d'une trypanosomiase aiguë. (TGO : transaminase glutamate-oxaloacétate et TGP : transaminase glutamate-pyruvate). Les résultats correspondent aux moyennes des valeurs ± SEM.

Nos résultats mettent donc en évidence qu'en dépit des dommages hépatiques causés par le parasite, la glycémie n'est pas altérée de façon significative sauf au troisième jour d'infestation. Quoi qu'il en soit, le caractère peu marqué de cette diminution n'est pas suffisant pour expliquer à lui seul l'altération de la sécrétion de la LH et le stress.

II) INCIDENCE DE LA TRYPANOSOMIASE SUR LES RECEPTEURS TESTICULAIRES DE LA LH

Lors de la réalisation du test à l'hCG, nous avons mis en évidence une altération fonctionnelle testiculaire. Parmi les causes envisagées de ce dysfonctionnement, le stress provoqué par le parasite avait été évoqué et il avait été rappelé que chez le rat, ce stress induit une diminution de la testostéronémie qui est liée à une désensibilisation partielle des récepteurs de la LH (59) sans modification de leur capacité de fixation ou de leur affinité (232).

De manière à fournir plus d'arguments sur l'incidence du stress sur le fonctionnement gonadique, nous avons donc étudié de manière plus précise les effets du trypanosomes sur les récepteurs testiculaires de la LH.

Cette étude a nécessité dans un premier temps la mise au point d'une méthode de "binding" de l'hCG marquée à l'iode 125 sur des homogénats testiculaires, cette gonadotrophine placentaire étant habituellement utilisée pour la mise en évidence des récepteurs testiculaires de la LH.

La technique développée s'est inspirée de celle décrite par Salesse et coll. (260).

1°) Mise au point des conditions d'étude des récepteurs testiculaires de la LH

a) Détermination des conditions de durée et de température d'incubation d'homogénats testiculaires. Effet des inhibiteurs de protéases.

Deux types de tampons Tris ont été utilisés pour cette étude. Le premier (Tris 1) est identique à celui utilisé pour la préparation des homogénats testiculaires, et le deuxième (Tris 2) est un tampon Tris 1 dans lequel a été ajouté des inhibiteurs de protéases (PMSF, TLCK et NEM) à une concentration de 1 mM.

Une quantité fixe d'hCG* (100 000 cpm dilués dans 50 µl du tampon Tris 1 ou Tris 2) a été apportée dans un tube polystyrène cristal sur 100 µl d'homogénat H1 (voir Appendice Technique) dilué au 1/4 avec l'un ou l'autre des tampons. Le compétiteur, lorsqu'il était requis, a été apporté sous un volume de 50µl dans le tampon Tris 1 ou Tris 2. Le volume final du mélange réactionnel était de 200 µl.

Après une période d'incubation, chaque tube a été repris par 4 ml de tampon Tris 1 glacé puis centrifugé à 5000 g pendant 20 minutes à +4°C. Après élimination du surnageant par retournement, la radioactivité fixée sur les culots a été mesurée sur un Multigamma II counter (LKB).

Notre étude a consisté à mesurer l'évolution de la fixation du traceur ("binding") sur les récepteurs testiculaires au bout de 1, 2, 3, 4, 6 et 24 heures d'incubation à 20°C ou à 37 °C. La Figure 7 montre clairement que la température de 37 °C est à éviter dans nos conditions expérimentales car elle entraîne une dégradation rapide des récepteurs. Par contre, à 20 °C, un maximum de fixation du traceur est observé au bout de 4 heures surtout quand des inhibiteurs de protéases sont présents dans le milieu. De façon à se ménager une marge de sécurité lors de la réalisation des mesures ultérieures, les conditions d'incubation retenues ont donc été les suivantes : 3 heures à 20 °C en présence d'inhibiteurs de protéases.

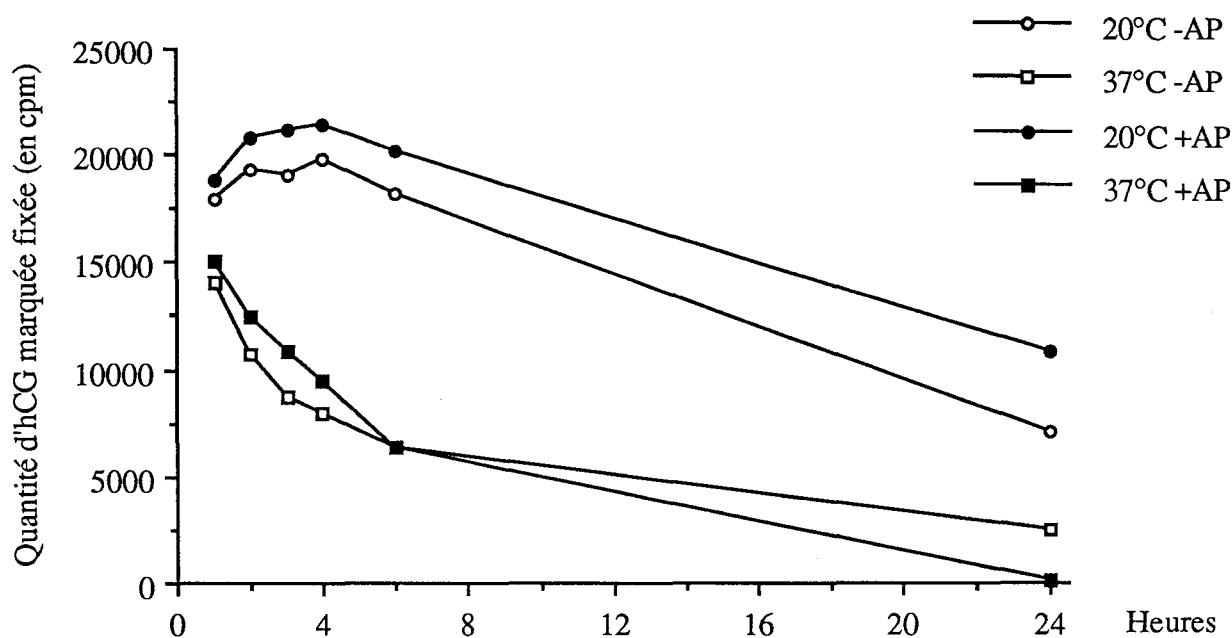


Figure 7 : Fixation spécifique de 100 000 cpm d'hCG marquée à l'Iode 125 sur un homogénat H2 (voir Appendice Technique) en présence (+AP) ou non (-AP) d'inhibiteurs de protéases à 20 et 37 °C.

b) Effet des lavages sur la fixation spécifique testiculaire de l'hCG*

Dans l'étude qui précède, un seul lavage par 4 ml de tampon Tris1 avait été réalisé après l'incubation. Dans les conditions définies précédemment (3 heures d'incubation à 20°C) nous avons donc testé (avec présence ou non d'inhibiteurs de protéases dans le milieu) l'évolution du "binding" suite à 1, 2, 3, 4, 5 et 6 lavages. Chaque mesure a été réalisée en triple.

L'évolution du binding suite à ces lavages est présentée sur la Figure 8. On observe ainsi clairement qu'un seul lavage est suffisant pour avoir une fixation spécifique maximale de la gonadotrophine marquée.

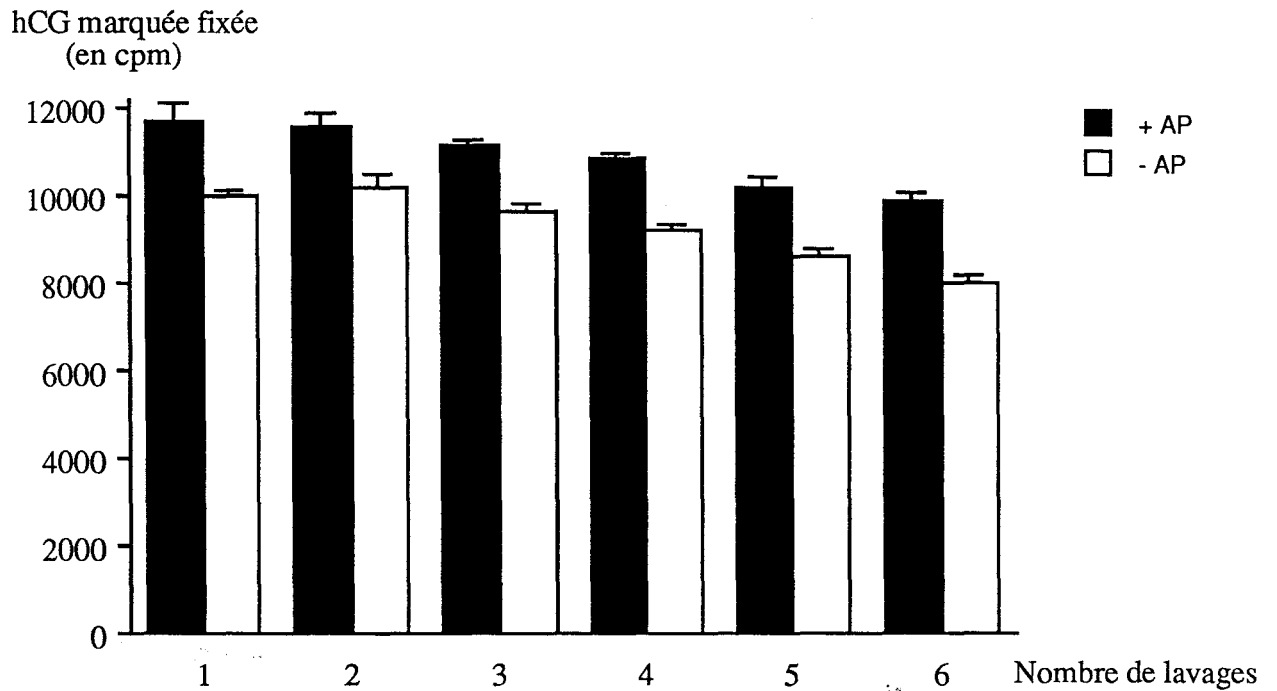


Figure 8 : Effet du nombre de lavages sur la fixation spécifique de 100 000 cpm d'hCG marquée à l'Iode 125 sur un homogénat H2 en présence (barres noires) ou absence (barres blanches) d'inhibiteurs de protéases dans le milieu d'incubation. Chaque barre est la moyenne de trois mesures \pm SEM.

2°) Etude des récepteurs testiculaires de la LH au cours de la trypanosomiase

a) Modifications quantitatives et qualitatives des récepteurs testiculaires de la LH le troisième jour d'une infestation aiguë

Au total, 63 rats appartenant aux groupes 1, 2 et 3 de l'expérience décrite en B-I-1° ont été étudiés : groupe 1 (groupe témoin ; n = 22), groupe 2 (rats inoculés par le variant AnTat 1.1 A ; n = 19) et groupe 3 (rats inoculés par le variant AnTat 1.8 ; n = 22).

La fixation spécifique de quantités croissantes d'hCG* (0,4 à 4 µg/l) a été mesurée sur les homogénats testiculaires préparés à partir de chacun de ces animaux et l'analyse de cette fixation a résulté de l'exploitation des diagrammes de Scatchard correspondants (261).

Aucune différence n'a été trouvée entre le poids des testicules décapsulés des rats appartenant à ces différents groupes (Tableau 9).

Par contre, l'analyse des diagrammes de Scatchard indique que la trypanosomiase induit de manière précoce une apparente diminution du nombre des récepteurs testiculaires de la LH. Les valeurs obtenues (exprimées par g de testicule frais décapsulé) pour chacun des groupes sont reportées dans le Tableau 9.

On peut noter qu'une différence significative existe entre le nombre des récepteurs testiculaires de la LH des rats témoins sains et celui des rats infestés quel que soit le variant employé pour l'infestation (groupes 1 et 2 : $p < 0,01$; groupes 1 et 3 : $p < 0,001$).

Aucune différence n'existe entre les 2 groupes de rats infestés.

Les valeurs totales de récepteurs par testicule sont également reportées dans le Tableau 9. Ici encore il existe une différence significative entre les groupes 1 et 2 ($p < 0,01$) et les groupes 1 et 3 ($p < 0,01$), mais aucune entre les groupes 2 et 3 ($0,2 < p < 0,3$).

Il apparaît par ailleurs que les récepteurs de la LH qui persistent à la surface des cellules de Leydig ont une affinité augmentée pour leur ligand (Tableau 9) mais que ce phénomène n'est statistiquement significatif que lorsque les animaux sont infestés par le variant AnTat 1.8 ($p < 0,01$). Enfin, aucune corrélation n'a été retrouvée entre la valeur de la testostéronémie et le nombre ou l'affinité des récepteurs de la LH.

	Rats témoins (groupe 1) (G1)	Rats infestés (groupe 2) (G2)	Rats infestés (groupe 3) (G3)	Analyse statistique (test de Student)
Poids des 2 testicules (g)	3,45 ± 0,09	3,8 ± 0,09	3,79 ± 0,06	
Nombre de récepteurs de la LH (pmol/g de testicule)	0,528 ± 0,046	0,365 ± 0,015	0,332 ± 0,025	G1/G2 : p < 0,01 G1/G3 : p < 0,001
Nombre total de récepteurs de la LH par testicule (pmol)	0,985 ± 0,087	0,677 ± 0,042	0,633 ± 0,05	G1/G2 : p < 0,01 G1/G3 : p < 0,01
Affinité des récepteurs de la LH (x10 ⁹ l/mol)	3,53 ± 0,27	4,27 ± 0,27	4,82 ± 0,31	G1/G2 : p > 0,05 G1/G3 : p < 0,01

Tableau 9 : Altérations qualitatives et quantitatives des récepteurs testiculaires de la LH au cours de la trypanosomiase aiguë

Notre étude démontre donc que la trypanosomiase Africaine induit de manière précoce des anomalies quantitatives et qualitatives des récepteurs testiculaires de la LH, anomalies sans doute à relier en partie aux anomalies fonctionnelles observées *in vivo* lors de la réalisation du test à l'hCG dans la mesure où en principe seulement 1% du nombre total des récepteurs testiculaires de la LH est suffisant pour permettre une réponse stéroïdienne normale (57).

Par contre, le stress engendré par le parasite, n'apparaît plus être le seul responsable du dysfonctionnement gonadique puisqu'il n'altère en principe ni le nombre ni l'affinité de ces récepteurs (232).

Il était donc nécessaire de pousser plus loin nos investigations de manière à expliquer les anomalies observées.

b) Recherche de l'origine de la diminution du nombre des récepteurs testiculaires de la LH au cours de la trypanosomiase

Dans la mesure où une diminution transitoire de l'expression des récepteurs testiculaires de la LH à la surface des cellules de Leydig, ainsi que leur désensibilisation, peuvent être liés à un excès transitoire de gonadotrophine circulante, nous avons étudié les variations des taux sériques de testostérone et de LH au cours des premières 24 heures d'infestation.

Des rats (témoins, $n = 7$ et infestés, $n = 6$) ont été inoculés à 10h00 le matin respectivement soit avec le tampon PSG soit avec 50×10^6 formes circulantes de *T. brucei brucei* AnTat 1.1 A dans ce même tampon. Du sang (moins de 600 μ l) a ensuite été régulièrement prélevé au niveau de la queue des animaux pendant 24 heures de manière à doser les taux sériques de testostérone et de LH.

On observe ainsi que le début de l'infestation se traduit par une augmentation précoce et temporaire des taux sériques de LH et de testostérone (Figure 9) qui pourraient expliquer la désensibilisation.

Cette observation est compatible avec la survenue d'un stress provoqué par l'infestation.

En effet, le stress, en règle générale, induit une élévation transitoire des taux de LH et de testostérone plasmatiques (181, 284), suivie d'une diminution de la testostéronémie tandis que la LH sérique revient souvent à un niveau normal (232). Ainsi, dans notre étude, l'augmentation précoce de la LH pourrait être à l'origine de la perte observée de 30 % des récepteurs ; ce résultat étant à rapprocher de celui observé lors du traitement de rats mâles par de faibles doses d'hCG (127).

Cette augmentation précoce pourrait être également responsable en partie de leur désensibilisation, objectivée par le défaut de stimulation testiculaire par l'hCG après trois jours d'infestation. Cependant, rappelons que la désensibilisation partielle des récepteurs testiculaires de la LH au cours d'un stress (59) n'entraîne pas de modification de leur capacité de fixation ou de leur affinité (232).

Par conséquent, si l'augmentation transitoire du taux de LH sérique peut en partie expliquer la diminution du nombre des récepteurs testiculaires de la LH ainsi que leur désensibilisation, les modifications qualitatives de ces récepteurs sont le signe que le stress n'est sans doute pas le seul responsable de l'hypofonctionnement gonadique.

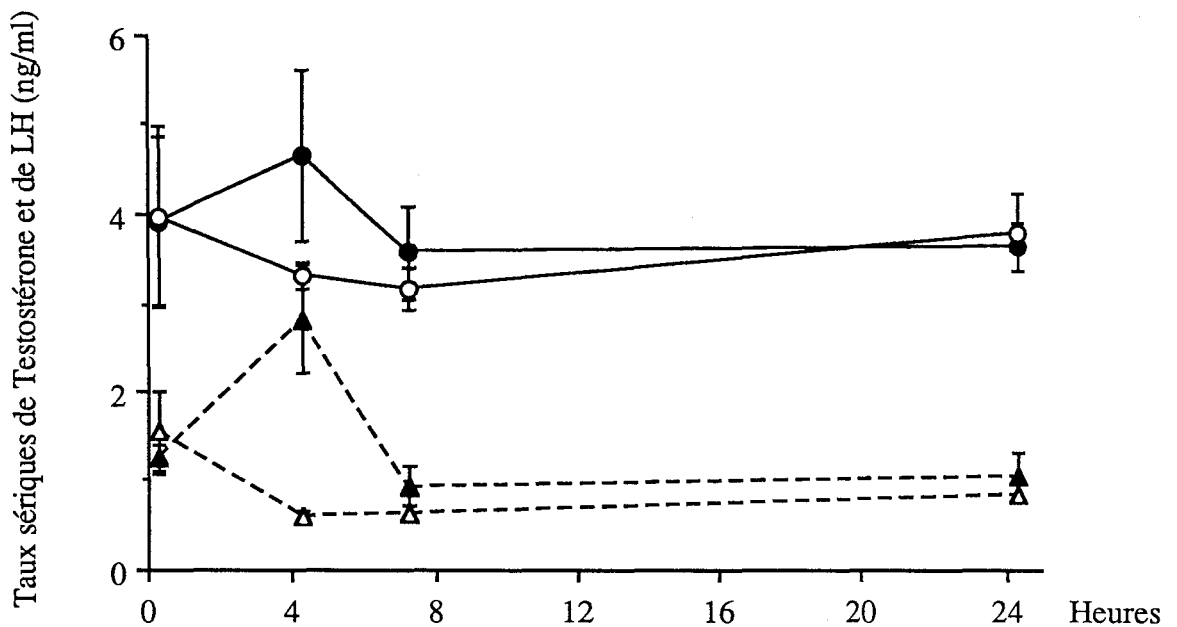


Figure 9 : Evolution des taux sériques de testostérone et de LH pendant les premières 24 heures d'une infestation aiguë.

Les ronds correspondent aux variations de la LH (ronds noirs = rats infestés et ronds blancs = rats témoins sains).

Les triangles correspondent aux variations de la testostérone (triangles noirs = rats infestés et triangles blancs = rats témoins sains).

Chaque point est la moyenne des valeurs mesurées pour chaque groupe \pm SEM.

C) EFFET DE COMPOSES D'ORIGINE PARASITAIRE SUR L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-GONADIQUE

Les études précédemment réalisées au laboratoire (130) avaient déjà suggéré l'incidence directe de composés parasitaires sur le fonctionnement gonadique dans la mesure où l'injection d'extraits parasitaires qu'ils soient préparés en l'absence ou en présence d'inhibiteurs de protéases, induisaient un hypogonadisme chez des rats sains en l'espace de 5 heures (130).

Les mécanismes responsables de l'hypogonadisme apparaissaient cependant différents dans les deux cas.

En effet, l'injection des extraits parasitaires préparés en l'absence d'inhibiteurs de protéases induisait une accumulation de LH dans l'hypophyse et une diminution des taux sériques de LH, alors que l'injection des extraits préparés en présence d'inhibiteurs de protéases entraînait une diminution du contenu hypophysaire en LH sans modification notable des taux sériques de LH.

Nous avons donc été amenés à étudier séparément et de manière plus précise l'effet des produits parasitaires préparés en absence ou en présence d'inhibiteurs de protéases.

D) ETUDE DE L'EFFET DES ENZYMES DU PARASITE SUR LES NEUROPEPTIDES

Le trypanosome, lorsqu'il est incubé une nuit en l'absence d'inhibiteurs de protéases dans un tampon PSG à 4°C, libère des composés enzymatiques qui, lorsqu'ils sont injectés à des rats sains, induisent en l'espace de 5 heures, une chute du taux sérique de testostérone (130) associé à une accumulation de LH dans l'hypophyse.

Une cible privilégiée de ces enzymes pourrait être constituée par le LHRH hypothalamique ce qui expliquerait les phénomènes décrits ci-dessus.

En effet, une dégradation accrue du LHRH entraînerait un défaut de stimulation et/ou de sécrétion de l'hypophyse et pourrait expliquer une accumulation de LH dans cette glande.

De manière à confirmer cette hypothèse, nous avons d'abord mis en évidence que les enzymes libérés par le parasite dans le plasma des rats infestés étaient effectivement capables de dégrader le LHRH et que cette dégradation était différente en partie de celle opérée par les enzymes de la fraction soluble du cerveau de rats sains.

1°) Dégradation du LHRH par les enzymes du trypanosome présents dans le sérum des rats infestés

Le trypanosome, au cours de l'infestation, libère dans le torrent circulatoire de l'hôte des composés ayant une activité enzymatique.

Nous avons démontré ce phénomène en comparant l'activité des sérums de rats sains et celle des sérums de rats infestés sur le substrat synthétique Z-Phe-Arg-AMC (Tableau 10).

	Rats sains (n = 3)	Rats infestés (n = 8)	Analyse statistique (Test de Student)
Activité enzymatique (mUI/l) Substrat = Z-Phe-Arg-AMC	4820 ± 176	163164 ± 11677	p < 0,001

Tableau 10 : Activité enzymatique des sérums de rats sains et de rats au troisième jour d'infestation aigüe par *T. b. brucei* variant AnTat 1.1 A.

Chaque valeur correspond à la moyenne des animaux testés ± SEM.

La présence des enzymes d'origine parasitaire dans le sérum des animaux infestés étant établie, nous avons étudié de manière comparative la dégradation du LHRH par ces enzymes sériques et par celles contenues dans la fraction soluble du cerveau de rats sains.

L'étude de ce dernier modèle a eu pour but de rechercher une activité de dégradation du LHRH par les enzymes parasitaires qui pourrait être différente de celles rencontrées habituellement au niveau

central, et donc qui serait susceptible d'accélérer à ce niveau la dégradation d'un médiateur peptidique à l'importance cruciale pour le fonctionnement hypophysaire.

La protéolyse *in vitro* du LHRH a été étudiée par incubation à 37°C de :

- 100 µl -de sérum (issu de rats sains ou infestés) ou
- d'extrait enzymatique de la fraction soluble du cerveau (issu de rats sains ou infestés)
- 50 µl de PBS 0,125 M pH 7,4 contenant 100 µg de LHRH (UCB)
- 50 µl de PBS

Avant utilisation, le sérum des rats infestés dont l'activité enzymatique (100 à 200 U/l) avait été déterminée contre le substrat Z-Phe-Arg-AMC (131), a été dilué de façon à tester une activité de 20-30 mU.

Les temps d'incubation retenus ont été de 0 et 30 minutes.

La Figure 10-A montre clairement que les enzymes libérés par le trypanosomes dans la circulation des animaux infestés sont capables de dégrader le LHRH et que cette dégradation est, au moins en partie, différente de celle induite par les enzymes de la fraction soluble du cerveau (Figure 10-B).

Enfin, il faut remarquer que les activités enzymatiques parasitaires n'ont pas pu être mises en évidence dans la fraction enzymatique soluble des cerveaux des rats infestés ce qui indique que l'intervention des enzymes du parasite sur le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique apparaît plus périphérique que central.

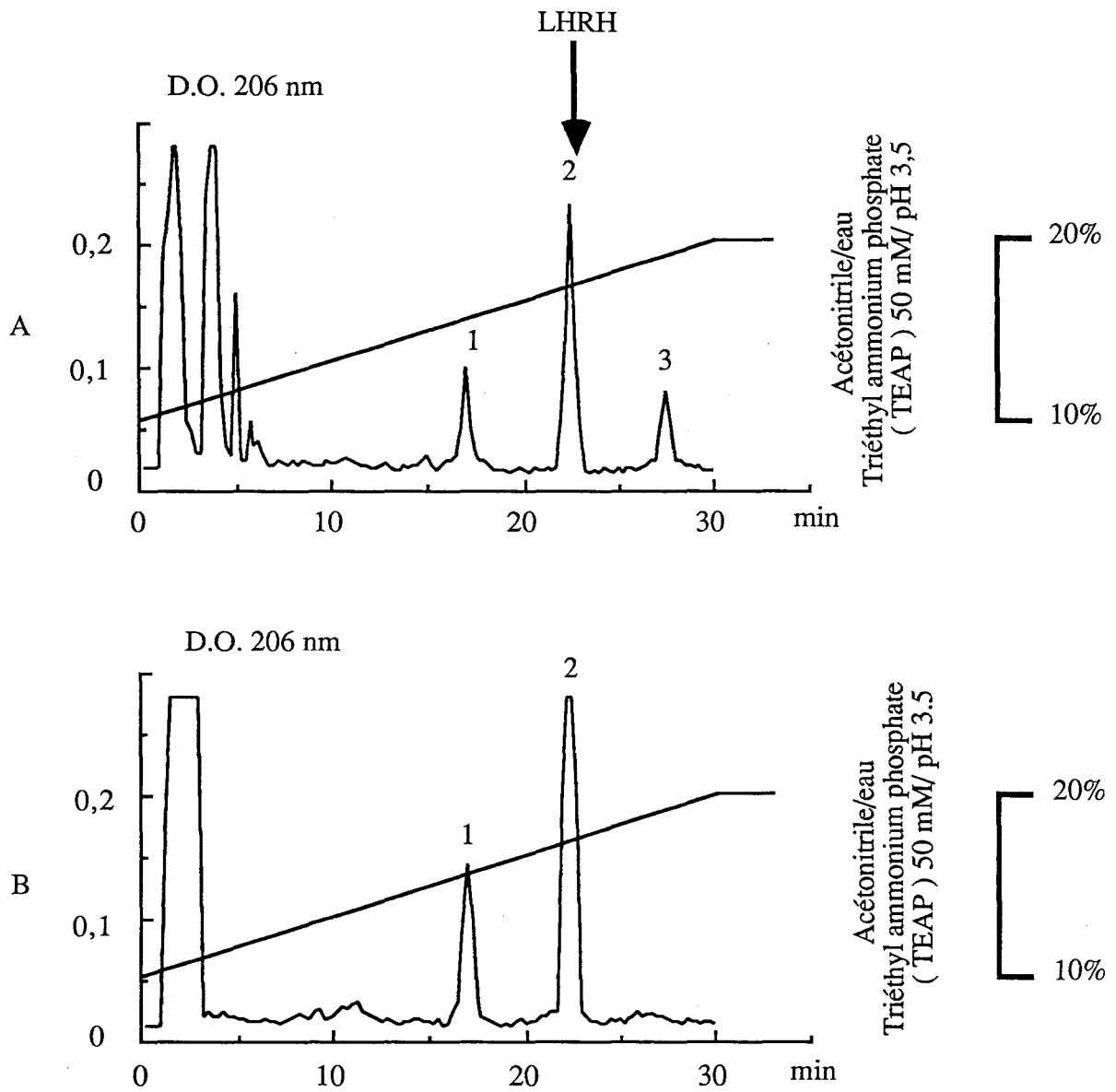


Figure 10 : Dégradation du LHRH par les enzymes libérés par le parasite dans le plasma (A), et par les enzymes de la fraction soluble du cerveau (B).

Les fractions 1, 2 et 3 de la Figure 10 ont été recueillies et caractérisées par leur composition en acides aminés (Tableau 11).

	FRACTION 1	FRACTION 2	FRACTION 3
Ser	1,3	1,2	1,2
Glu	1,3	1,4	1,1
Pro	-	0,9	0,6
Gly	0,7	2,2	1,4
Leu	-	1	0,7
Tyr	0,6	0,7	0,6
His	0,7	0,8	0,6
Arg	-	1,0	0,6
Trp	ND (non déterminé)	ND	ND
Total	6,0	9,0	-

Tableau 11 : Composition en acides aminés des fractions 1, 2 et 3 des chromatogrammes de la Figure 10 [dégradation du LHRH par les enzymes sériques (A) des rats infestés et par les enzymes de la fraction soluble du cerveau (B)].

Il apparaît dans le Tableau 11 que la fraction 2 correspond au LHRH natif dans la mesure où la composition en acides aminés après hydrolyse acide est celle attendue pour ce peptide.

Cependant, la fraction 1 apparaît hétérogène dans la mesure où le glycolle n'est retrouvé qu'à un rapport molaire de 0,7.

La fraction 3 pour sa part semble correspondre au LHRH¹⁻⁹ dépourvu de son glycinamide N-terminal (le glycolle est cependant encore retrouvé avec un rapport molaire de 1,4).

L'incertitude sur la nature des composés présents dans les différentes fractions nous a amenés à utiliser une méthode d'analyse beaucoup plus élégante et fiable, la spectrométrie de masse FAB (Fast Atom Bombardment) [Kratos Concept II HH FAB (Xe) spectrometer ; matrice : glycérol/eau/TFA (10 : 88 : 2)], dont les résultats sont présentés dans le Tableau 12.

FRACTIONS	STRUCTURES	MASSES MOLECULAIRES
1	pGlu ¹ -His ² -Trp ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ + pGlu ¹ -His ² -Trp ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ -Gly ⁶	702 + 760
2 (LHRH)	pGlu ¹ -His ² -Trp ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ -Gly ⁶ -Leu ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹ -Gly ¹⁰ -NH ₂	1182
3	pGlu ¹ -His ² -Trp ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ -Gly ⁶ -Leu ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹	1126

Tableau 12 : Identification par spectrométrie de masse des peptides contenus dans les pics 1, 2 et 3 de la Figure 10 (pics résultant de la dégradation du LHRH soit par les enzymes du trypanosome, soit par les enzymes de la fraction soluble du cerveau).

2°) Dégradation du LHRH par un extrait enzymatique "brut" parasitaire

Une étude plus fine des activités enzymatiques du parasite a ensuite été menée en analysant la dégradation du LHRH par un extrait brut parasitaire.

La protéolyse *in vitro* du LHRH a été réalisée dans les conditions décrites précédemment en remplaçant les 100 µl de sérum par 100 µl d'extrait parasitaire brut (surnageant pH 5,5) ou de PSG

de pH 5,5. Les 200 µl du mélange ont ensuite été incubés à 37°C dans un bain marie à agitation pendant 0, 10, 30 et 90 minutes.

De la même façon que pour l'étude du sérum des rats infestés, les extraits enzymatiques ont été dilués pour obtenir une activité de 20-30 mU dans les 100 µl testés.

L'étude en CLHP de la dégradation du LHRH permet d'observer 4 pics correspondant à différents produits de dégradation du décapeptide (Figure 11).

L'étude analytique des différents pics obtenus sur les chromatogrammes a ensuite été réalisée par spectrométrie de masse FAB (Tableau 13).

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que les enzymes du parasite génèrent à partir du LHRH un tétrapeptide original : le LHRH¹⁻⁴ (pic 2). L'originalité de ce tétrapeptide réside dans le fait que les activités enzymatiques habituellement décrites dans le cerveau, ne génèrent pas ce composé à partir du LHRH.

Le LHRH¹⁻⁴ est donc un peptide dont l'apparition semble spécifique à la trypanosomiase Africaine.

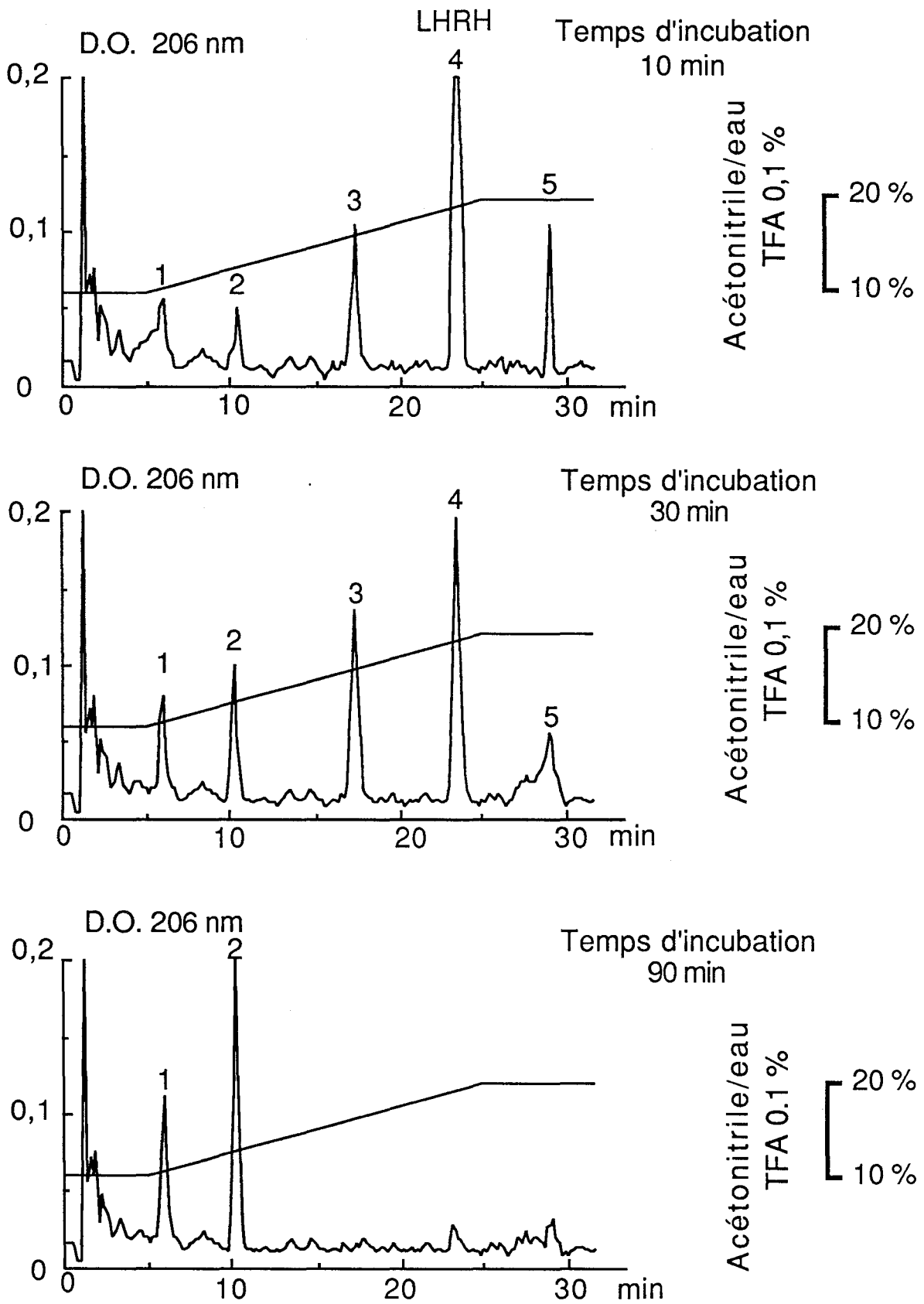


Figure 11 : Dégradation du LHRH par les enzymes contenues dans un extrait parasitaire "brut"
 ("surnageant d'extraction de pH 5,5")

PICS de la Figure 11	STRUCTURES des peptides constitutifs	MASSES MOLECULAIRES
1	Gly ⁶ -Leu ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹ -Gly ¹⁰ -NH ₂	498
2	pGlu ¹ -His ² -Trp ³ -Ser ⁴	521
3	pGlu ¹ -His ² -Trp ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ + pGlu ¹ -His ² -Trp ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ -Gly ⁶	702 + 760
4 (LHRH)	pGlu ¹ -His ² -Trp ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ -Gly ⁶ -Leu ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹ -Gly ¹⁰ -NH ₂	1182
5	pGlu ¹ -His ² -Trp ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ -Gly ⁶ -Leu ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹ -COOH	1126

Tableau 13 : Identification par spectrométrie de masse de la nature des peptides constitutifs des différents pics obtenus lors de la dégradation du LHRH par les activités enzymatiques présentes dans un extrait parasitaire "brut" ("Surnageant de pH 5,5").

3°) Caractérisation du/des enzyme(s) du trypanosome responsable(s) de la dégradation du LHRH

De manière à essayer de mieux définir la ou les activités enzymatiques libérées par le trypanosome, l'effet de différents inhibiteurs de protéases a été testé (en présence ou non d'un réducteur) sur l'activité du ou des enzymes présents dans le sérum des rats infestés et impliqués dans l'hydrolyse du LHRH.

Les conditions d'incubation du sérum ont été identiques à celles décrites précédemment avec l'introduction des différents agents testés [activateur (DTT) ou inhibiteurs] dans 50 µl de PBS (volume final d'incubation = 200 µl).

Les inhibiteurs de protéases étudiés ont été les suivants :

- inhibiteurs de sérine-protéases : PMSF et TPCK [Sigma] (0,2 mM)
DFP [Sigma] (24 μ M)
DFMO [Merrel Dow Research Institute] (5 mM)
- inhibiteurs de thiol-protéases : pCMPSA [Sigma] (0,2 mM)
E-64 [Sigma] (0,02 et 0,002 mM)
- inhibiteur de métallo-protéases : EDTA [Sigma] (2 et 3,5 mM)

L'action du DTT [Sigma] (agent réducteur) a été testée à des concentrations finales de 0,2 ; 1 ; 1,25 ; 2 et 2,5 mM.

Les pourcentages d'inhibition de dégradation du LHRH ont été appréciés en comparant les tailles du pic de LHRH obtenu en CLHP après injection d'un sérum de rat infesté incubé en présence d'une quantité donnée de LHRH, en l'absence ou en la présence de l'inhibiteur testé.

Les résultats de cette étude sont présentés dans le Tableau 14 et nous permettent de faire les constatations suivantes :

-La vitesse de protéolyse est accélérée d'un facteur 3 lorsque 2,5 mM de DTT sont introduits dans le milieu d'incubation (caractéristique des enzymes dont la fonction thiol du site actif peut être activée).

-Par ailleurs, on peut noter également qu'indépendamment de la présence ou non de DTT certains inhibiteurs de sérine-protéases (PMSF [inhibiteur trypsine-like] et TPCK [inhibiteur chymotrypsine-like]) sont sans effet alors que le DFP bloque totalement l'activité enzymatique responsable de la dégradation du LHRH de même que le DFMO [inhibiteur de l'ornithine décarboxylase dont l'utilisation en thérapeutique a apporté de grands progrès dans le traitement de la trypanosomiase Africaine (109) dans la mesure où il induit la transformation des formes "slender" en formes "stumpy"].

-Pour sa part, l'effet inhibiteur de l'EDTA (inhibiteur de métallo-protéases) est surtout marqué à haute concentration (3,5 mM) et en absence d'agent réducteur.

-En ce qui concerne les inhibiteurs de Thiol-protéases, des résultats contradictoires sont retrouvés.

En effet, l'E-64 se révèle inactif et même activateur de la/les enzyme(s) en présence d'un agent réducteur, alors qu'un inhibiteur de faible masse moléculaire, le pCMPSA inhibe complètement la/les activité(s) enzymatique(s) libérée(s) par le parasite.

En résumé, le(s) enzymes qui dégrade(nt) le LHRH est/sont activé(s) par les agents réducteurs (DTT) et inhibé(s) par le DFP à 0,2 mM, le DFMO, le pCMPSA et l'EDTA à 3,5 mM. L'activité enzymatique responsable de la dégradation du LHRH apparaît donc être une sérine, cation sensitive, thiol-dépendante endopeptidase.

Inhibiteurs testés Temps d'incubation 30 min / 37° C	Pourcentages d'hydrolyse du LHRH par le(s) enzyme(s) présents dans le sérum des rats infestés (30 mU)	
	En l'absence de DTT	En présence de DTT 2,5 mM
Aucun (Témoin)	25	60
PMSF 0,2 mM	25	59
TPCK 0,2 mM	26	49
DFMO 5 mM	0	0
DFP 0,2 mM	0	0
DFP 0,1 mM	37	40 (pas de LHRH ¹⁻⁹)
EDTA 2 mM	32	47
EDTA 3,5 mM	0	35
E-64 0,002 mM	55	70
E-64 0,2 mM	30	58
pCMPSA	0	0

Tableau 14 : Hydrolyse du LHRH par le sérum de rats le troisième jour d'une infestation aigüe en présence de différents inhibiteurs de protéases et/ou de DTT.

4°) Autres cibles peptidiques des enzymes du trypanosome

Dans les conditions déjà décrites pour le LHRH, nous avons étudié l'effet des enzymes du parasite sur d'autres peptides naturels.

Nous avons ainsi pu observer que le/les enzyme(s) présent(s) dans le sérum des rats infestés est/sont capable(s) de dégrader le TRH en l'espace de 10 minutes.

Par ailleurs, nous avons également démontré que la/les activité(s) enzymatique(s) présente(s) dans les extraits parasitaires est/sont capable(s) de dégrader d'autres neuropeptides comme la neurotensine [NT] (Figure 12-A), la substance P [SP] (Figure 12-B) et la bradykinine [Brad] (Figure 12-C) en l'espace de 60 minutes à 37°C.

La structure des peptides correspondants aux pics de dégradation observés en CLHP à été par la suite déterminée par spectrométrie de masse-FAB. Cette structure est reportée pour l'étude de la dégradation de la neurotensine dans le Tableau 15-A, pour la substance P dans le Tableau 15-B, et pour la bradykinine dans le Tableau 15-C.

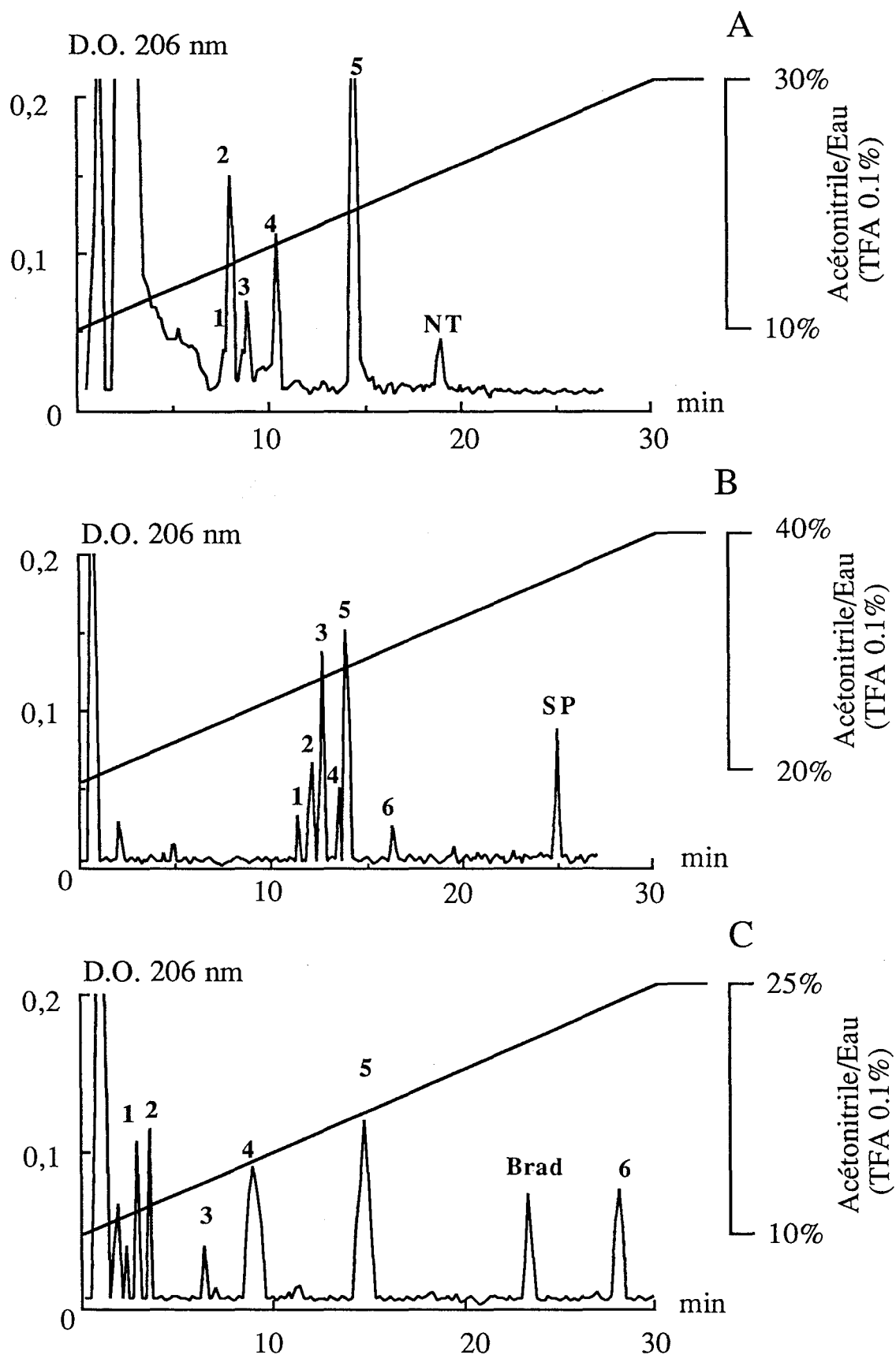


Figure 12 : Dégradation de différents neuropeptides par les enzymes du trypanosome

FRACTIONS recueillies	STRUCTURES des peptides constitutifs des fractions séparées par CLHP	MASSES MOLECULAIRES
NT (neurotensine)	pGlu ¹ -Leu ² -Tyr ³ -Glu ⁴ -Asn ⁵ -Lys ⁶ -Pro ⁷ -Arg ⁸ -Arg ⁹ -Pro ¹⁰ - Tyr ¹¹ -Ile ¹² -Leu ¹³	1673
1	Glu ¹ -Leu ²	224
2	Glu ¹ -Leu ² -Tyr ³ -Glu ⁴	535
3	Tyr ¹¹ -Ile ¹² -Leu ¹³ -COOH	407
4	Lys ⁶ -Pro ⁷ -Arg ⁸ -Arg ⁹ -Pro ¹⁰ -Tyr ¹¹ -Ile ¹² -Leu ¹³ -COOH + Leu ² -Tyr ³ -Glu ⁴ -Asn ⁵ -Lys ⁶ -Pro ⁷ -Arg ⁸ -Arg ⁹ -Pro ¹⁰	1043 + 1172
5	Asn ⁵ -Lys ⁶ -Pro ⁷ -Arg ⁸ -Arg ⁹ -Pro ¹⁰ -Tyr ¹¹ -Ile ¹² -Leu ¹³ -COOH + Glu ⁴ -Asn ⁵ -Lys ⁶ -Pro ⁷ -Arg ⁸ -Arg ⁹ -Pro ¹⁰ -Tyr ¹¹ -Ile ¹² - Leu ¹³ -COOH	1156 + 1285

Tableau 15-A : Produits de dégradation de la neurotensine par les enzymes du trypanosome.

FRACTIONS recueillies	STRUCTURES des peptides constitutifs des fractions séparées par CLHP	MASSES MOLECULAIRES
SP (substance P)	Arg ¹ -Pro ² -Lys ³ -Pro ⁴ -Gln ⁵ -Gln ⁶ -Phe ⁷ -Phe ⁸ -Gly ⁹ -Leu ¹⁰ - Met ¹¹ -CONH ₂	1347
1	Arg ¹ -Pro ²	255
2	Arg ¹ -Pro ² -Lys ³ -Pro ⁴ -Gln ⁵	625
3	Arg ¹ -Pro ² -Lys ³ -Pro ⁴ -Gln ⁵ -Gln ⁶	753
4	Phe ⁸ -Gly ⁹ -Leu ¹⁰ -Met ¹¹ -CONH ₂ + Arg ¹ -Pro ² -Lys ³ -Pro ⁴	468 + 497
5	Arg ¹ -Pro ² -Lys ³ -Pro ⁴	497
6	Arg ¹ -Pro ² -Lys ³ -Pro ⁴ -Gln ⁵ -Gln ⁶ -Phe ⁷	900

Tableau 15-B : Produits de dégradation de la substance P par les enzymes du trypanosome.

FRACTIONS recueillies	STRUCTURES des peptides constitutifs des fractions séparées par CLHP	MASSES MOLECULAIRES
BRAD (bradykinine)	Arg ¹ -Pro ² -Pro ³ -Gly ⁴ -Phe ⁵ -Ser ⁶ -Pro ⁷ -Phe ⁸ -Arg ⁹	1060
1	Phe ⁸ -Arg ⁹	322
2	Phe ⁵	166
3	Arg ¹ -Pro ² -Pro ³	366
4	Arg ¹ -Pro ² -Pro ³ -Gly ⁴ -Phe ⁵ -Ser ⁶	660
5	Arg ¹ -Pro ² -Pro ³ -Gly ⁴ -Phe ⁵ -Ser ⁶ -Pro ⁷	757
6	Arg ¹ -Pro ² -Pro ³ -Gly ⁴ -Phe ⁵ -Ser ⁶ -Pro ⁷ -Phe ⁸	905

Tableau 15-C : Produits de dégradation de la bradykinine par les enzymes du trypanosome.

En conclusion, les enzymes libérés par le parasite dans le flux circulatoire s'avèrent capables de dégrader des neuropeptides. La dégradation accrue de ces neuropeptides lors d'une infestation parasitaire pourrait ainsi limiter leur durée d'action habituelle et donc altérer le bon fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique dont ils sont des éléments de régulation importants.

Enfin, dans la mesure où les activités enzymatiques parasitaires n'ont pas été retrouvées dans la fraction soluble du cerveau des rats infestés, il est vraisemblable qu'elles n'interviennent pas au niveau central. Des sites d'action potentiels de ces activités enzymatiques parasitaires pourraient ainsi être constitués par l'éminence médiane (zone riche en neuromédiateurs et située en dehors de la barrière hématoencéphalique), la circulation porte hypophysaire, la circulation générale, l'hypophyse et le testicule.

L'éminence médiane présente en effet de fortes concentrations en neurotensine (138), atriopeptine (6), neuropeptide Y (156, 75, 205) et Galanine (qui potentialisent au niveau hypophysaire la stimulation des cellules gonadotropes par le LHRH) (190), et enfin en β -endorphine et [Met]-Enkephaline (qui ont pour effet de diminuer le "turn over" à ce niveau de la dopamine et donc d'entraîner l'augmentation de la libération hypophysaire de Prolactine) (A25').

Par ailleurs, c'est au niveau de l'éminence médiane que sont libérés dans la circulation porte hypophysaire de nombreux médiateurs ayant un rôle important sur le fonctionnement hypophysaire. Un grand nombre de ces derniers sont de nature peptidique et donc potentiellement sensibles à une dégradation accélérée par les enzymes du parasite. C'est le cas de l'atriopeptine (6), du CRF (86), de la Galanine (190), du LHRH (156), du GRF (151), de la Neurotensine (138), du Neuropeptide Y (147), de l'ocytocine (234), du TRH (1) et du VIP (271).

Enfin, différents médiateurs peptidiques intervenant dans la régulation des fonctions hypophysaires et testiculaires (278) sont également susceptibles d'être dégradés par les enzymes du trypanosome.

C'est cet effet dégradatif qui pourrait entre autre expliquer que certaines trypanosomiasés s'accompagnent de troubles gonadiques sans lésions inflammatoires testiculaires ou hypophysaires.

Par ailleurs, ce même effet pourrait expliquer l'accumulation au bout de 3 jours de la LH dans l'hypophyse des rats infestés (130), suite à une diminution de la quantité de LHRH intact pouvant se fixer sur ses récepteurs hypophysaires.

5°) Recherche des répercussions *in vivo* de la dégradation du LHRH par les enzymes du parasite

Une dégradation accélérée du LHRH *in vivo* devrait entraîner une diminution de l'amplitude des pics de sécrétion endogènes de LHRH. Cet effet va provoquer des perturbations de la synthèse et de la sécrétion de la LH.

Nous avons ainsi montré que les taux de LH sériques étaient soit diminués soit comparables à ceux de rats sains au cours d'une trypanosomiasés expérimentale aiguë. Dans la mesure où la sous-unité α de la LH semble bénéficier *in vivo* d'une régulation spécifique à long terme de sa sécrétion (252, 300) et que sa mesure pouvait apporter des informations sur les perturbations hypophysaires de la synthèse de la LH, nous avons dosé cette sous-unités alpha dans le sérum de rats témoins sains ou infestés par les variants AnTat 1.1 A ou AnTat 1.8 de *T. b. brucei*.

Les résultats de cette étude (Figure 13) montrent que si l'infestation induit une diminution importante des taux sériques de testostérone, les taux sériques de sous-unités alpha, quant à eux, ne présentent pas de modifications significatives par rapport à ceux des témoins.

La sous-unité alpha sérique résulte d'une sécrétion pulsatile hypophysaire qui est rythmée par celle du LHRH (252).

Cependant, en cas de désensibilisation hypophysaire au décapeptide, cette sécrétion est toujours stimuable par le LHRH, ce qui n'est pas le cas de la sécrétion de la LH.

L'observation conjointe au cours de la trypanosomiase Africaine

- de taux sériques bas de LH
- de taux sériques presque normaux de sous-unité alpha
- d'une accumulation hypophysaire de LH

pourrait donc témoigner de l'existence d'une désensibilisation hypophysaire au LHRH mais d'une sécrétion du décapeptide qui reste suffisante pour permettre la sécrétion de sous-unité alpha tout en étant insuffisante pour permettre celle de LH. Dans ce sens, un test de stimulation par le LHRH de rats parasités devrait sans aucun doute apporter des enseignements intéressants.

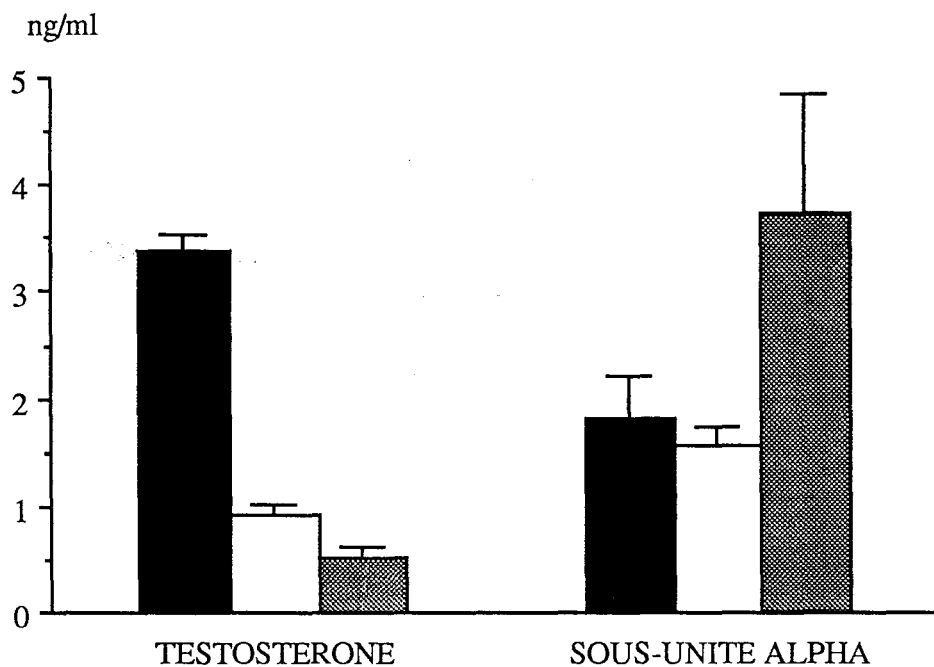


Figure 13 : Etude comparée des taux sériques de testostérone et de sous-unités alpha chez des rats sains (barres noires, n=7) ou des rats au troisième jour d'infestation par *T. b. brucei* variants AnTat 1.1 A (barres blanches, n=7) ou AnTat 1.8 (barres grises, n=7). Chaque barre correspond à la moyenne du groupe \pm SEM.

II) ETUDE DES EFFETS DU TETRAPEPTIDE LHRH¹⁻⁴ SUR LE FONCTIONNEMENT GONADIQUE

Nos études précédentes avaient révélé que les enzymes du trypanosome généraient un produit de dégradation original à partir du LHRH, le tétrapeptide LHRH¹⁻⁴.

De manière à rechercher un éventuel effet de ce tétrapeptide sur le fonctionnement de l'axe gonadotrope, nous avons procédé à différentes expériences tant *in vivo* qu'*in vitro*.

1°) Etude *in vivo* des effets du tétrapeptide LHRH¹⁻⁴ chez le rat

Le tétrapeptide LHRH¹⁻⁴ (pGlu¹-His²-Trp³-Ser⁴) est, comme nous l'avons vu précédemment, un tétrapeptide original généré spécifiquement par les enzymes du trypanosome à partir du LHRH.

De façon à mesurer l'effet de ce tétrapeptide sur le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique, nous avons étudié l'effet de son injection chez des rats sains en association ou non à l'injection de LHRH.

Le LHRH¹⁻⁴ a été obtenu pour cette étude par hydrolyse enzymatique du LHRH à 37°C pendant 90 minutes par l'extrait brut parasitaire (2 mg de LHRH dissous dans 2 ml de tampon PBS de pH 7,4 (Gibco) contenant 5 mM de DTT, et mis en contact avec 2 ml d'extrait parasitaire brut ["surnageant pH 5,5" correspondant à 600 mU d'activité enzymatique] puis purification par CLHP et lyophilisation.

L'expérience s'est adressée à 3 groupes de 3 rats sains.

Les deux premiers groupes ont été inoculés par voie ip avec une solution (100 µl) de chlorure de sodium isotonique (NSS) contenant (groupe 2) ou pas (groupe 1) le tétrapeptide (environ 10 µg soit 20 nanomoles) puis 30 minutes plus tard (t=0) par cette même NSS contenant du LHRH [Stimu-LH 50, Roussel Uclaf] (10 µg sous un volume de 200 µl).

Les rats appartenant au groupe 3 ont uniquement reçu une injection de tétrapeptide à t = 0.

Le protocole d'injection des différents groupes est représenté ci dessous :

	t = t0 - 30'	t = t0
GROUPE 1	NSS	NSS contenant 10 µg LHRH
GROUPE 2	NSS contenant 10 µg LHRH ¹⁻⁴	NSS contenant 10 µg LHRH
GROUPE 3	Rien	NSS contenant 10 µg LHRH ¹⁻⁴

Un suivi de la testostéronémie a été réalisé par ponction d'environ 600 µl de sang à la queue des rats toutes les 30 minutes pendant 3 heures.

A la fin de l'expérience, les animaux ont été sacrifiés par décapitation et le sang récupéré au tronc. Les sérums ont par la suite été conservés à -20°C jusqu'à mesure du taux de testostérone sérique.

Les effets de l'injection du tétrapeptide sur les variations du taux sérique de testostérone suite à l'injection de LHRH chez des rats sains sont représentés dans la Figure 14.

Il apparaît clairement que l'injection du tétrapeptide potentialise la réponse testostérone consécutive à l'injection de LHRH mais que le tétrapeptide seul ne stimule pas la stéroïdogénèse.

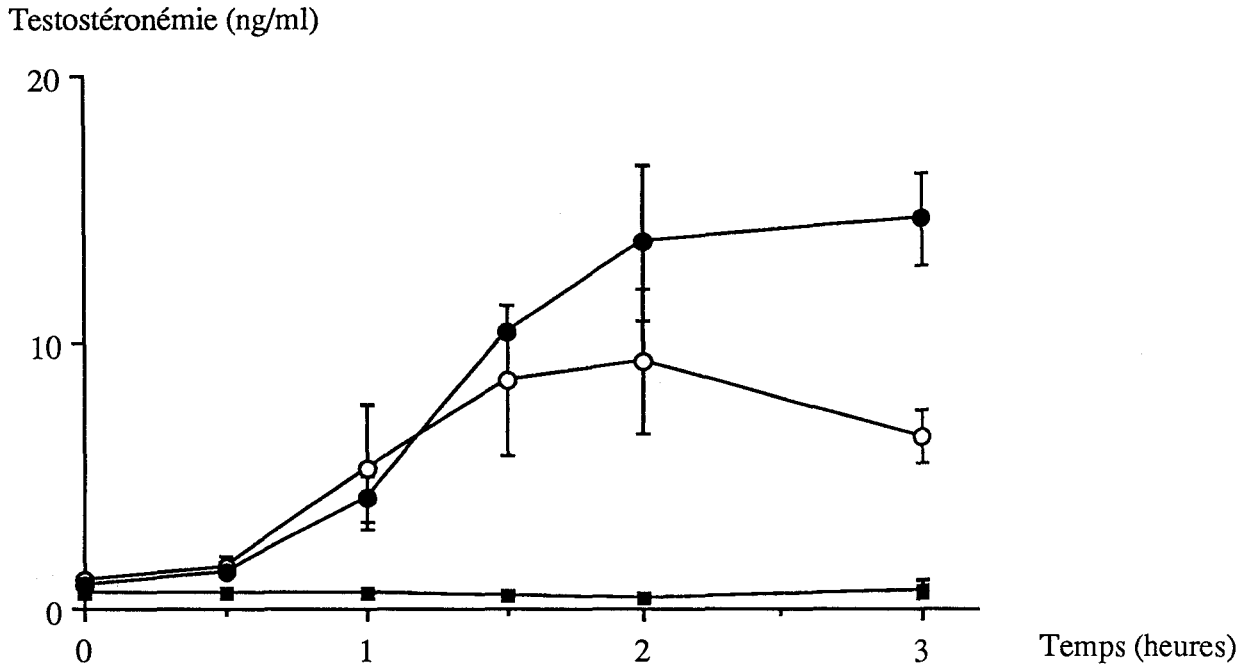


Figure 14 : Effets *in vivo* de l'injection du térapeptide LHRH¹⁻⁴ sur les taux sériques de testostérone (moyennes \pm SEM) avec ou sans stimulation ultérieure par le LHRH.

Les carrés noirs correspondent à des rats témoins inoculés uniquement par le térapeptide à $t = 0$; Les ronds blancs correspondent à des rats témoins inoculés à $t = -30$ min par du sérum physiologique et à $t = 0$ par du LHRH ; les ronds noirs correspondent à des rats inoculés à $t = -30$ min par le térapeptide et stimulés à $t = 0$ par le LHRH.

2°) Etude *in vitro* des effets du térapeptide sur la dégradation du LHRH par les enzymes du cerveau et du testicule

Les résultats de la précédente étude peuvent à priori apparaître paradoxaux dans la mesure où l'infestation par le trypanosome induit un hypogonadisme et donc une diminution des taux sériques de testostérone. Cependant, on ne peut exclure que le parasite puisse induire temporairement, et en

particulier au début de l'infestation lorsque les enzymes parasitaires libérés dans le torrent circulatoire sont encore en faibles quantités, une hyperstimulation hypophysaire-tétrapeptide dépendante par le LHRH hypothalamique, cette hyperstimulation pouvant être à l'origine d'une désensibilisation secondaire de l'hypophyse au décapeptide comme le laissent entendre les résultats du dosage de la sous-unité alpha sérique chez les rats infestés.

La mesure, dans notre étude, des taux sériques de LH aurait donc pu, si elle avait été réalisée, apporter des arguments dans ce sens.

A défaut, l'observation *in vivo* dans notre modèle expérimental d'infestation aiguë de l'augmentation précoce des taux sériques de LH et de testostérone lors du suivi cinétique de ces paramètres dans les vingt quatre premières heures d'infestation, pourrait relever, en plus de l'existence d'un stress généré par le parasite, d'une hyperstimulation hypophysaire transitoire par le LHRH endogène. Cette hyperstimulation contribuerait ainsi secondairement à la désensibilisation secondaire des récepteurs testiculaires de la LH et donc à l'hypogonadisme.

Une explication possible de l'effet du LHRH¹⁻⁴ serait, ainsi que cela a déjà été suggéré (173) pour d'autres peptides, d'agir en tant que substrat compétitif pour une peptidase qui normalement dégrade un peptide qui inhibe, soit la libération au niveau de l'éminence médiane du LHRH, soit la libération de LH au niveau hypophysaire.

Le tétrapeptide pourrait également servir de substrat compétitif vis à vis de la dégradation du LHRH endogène lui même au niveau hypophysaire ce qui potentialiserait temporairement l'effet du décapeptide. Enfin, on ne peut exclure que le LHRH¹⁻⁴ puisse, toujours de la même façon, perturber la steroïdogénèse au niveau testiculaire.

En fonction de ces réflexions, nous avons testé l'effet du tétrapeptide sur la dégradation *in vitro* du LHRH par des préparations enzymatiques réalisées à partir des fractions solubles testiculaires et cérébrales.

Cette étude a été menée dans les conditions décrites par Hui et Col. (137) et les préparations enzymatiques ont été conduites en fonction des indications décrites par Orlowski et Col. (230, 231).

Les tissus, prélevés immédiatement à la mort de l'animal, sont homogénéisés avec 4 volumes d'un tampon phosphate 0,125 M de pH 7,6 et contenant 0,32 M sucrose. L'homogénat est alors centrifugé à 800 g pendant 10 minutes puis le surnageant est centrifugé à 100 000 g pendant 60 minutes.

Avant utilisation, les surnageants préparés à partir des tissus cérébraux et testiculaires ont été dilués avec le tampon phosphate de manière à avoir une concentration en protéines de 5 g/l.

Le protocole d'étude a été le suivant :

-100 µl de préparation enzymatique ont été préincubés pendant 3 minutes avec

-50 µl de tampon phosphate seul ou contenant du tétrapeptide à une concentration de 0,75 mM soit 78 µg.

On a ajouté alors

-50 µl d'une solution contenant 100 µg de LHRH et le mélange a été incubé à 37°C pendant 0 et 15 minutes.

La réaction d'hydrolyse a été interrompue par la congélation à -80°C, aux temps définis, de 100 µl de chacun des mélanges réactionnels.

La dégradation du LHRH a été suivie par l'analyse des profils obtenus en chromatographie CLHP suite à l'injection des différents prélèvements ; le pourcentage d'inhibition de la dégradation du LHRH étant apprécié par la comparaison des hauteurs des pics correspondant au décapeptide en l'absence et en la présence du tétrapeptide.

Les conditions de chromatographie CLHP ont été les suivantes : colonne C18 (150 x 4,6 mm), débit 1,5 ml par minute, détection à 206 nm avec un gradient : 100 % d'une Solution A (0 % acétonitrile / TFA 0,1 %) pendant 5 minutes puis progressivement, de 5 à 35 minutes, 50 % de Solution A et 50 % de Solution B (40 % acétonitrile / TFA 0,1 %) et enfin 50 % A et 50 % B de 35 à 45 minutes.

Cette étude n'a pas permis la mise en évidence d'un effet inhibiteur du tétrapeptide LHRH¹⁻⁴ sur l'activité protéolytique vis à vis du LHRH des enzymes contenus aussi bien dans les extraits testiculaires que les extraits cérébraux.

La [Figure 15](#) témoigne de cette absence d'inhibition, en présence de LHRH¹⁻⁴, de la dégradation du LHRH par les enzymes de la fraction soluble du cerveau.

L'effet du térapeptide observé *in vivo* n'est donc pas une potentialisation de l'action du LHRH par inhibition compétitive du LHRH¹⁻⁴ vis à vis d'enzymes de dégradation du décapeptide. Néanmoins, on ne peut exclure que ce type d'activité puisse s'exercer vis à vis d'un peptide de régulation de la sécrétion du LHRH ou de la LH.

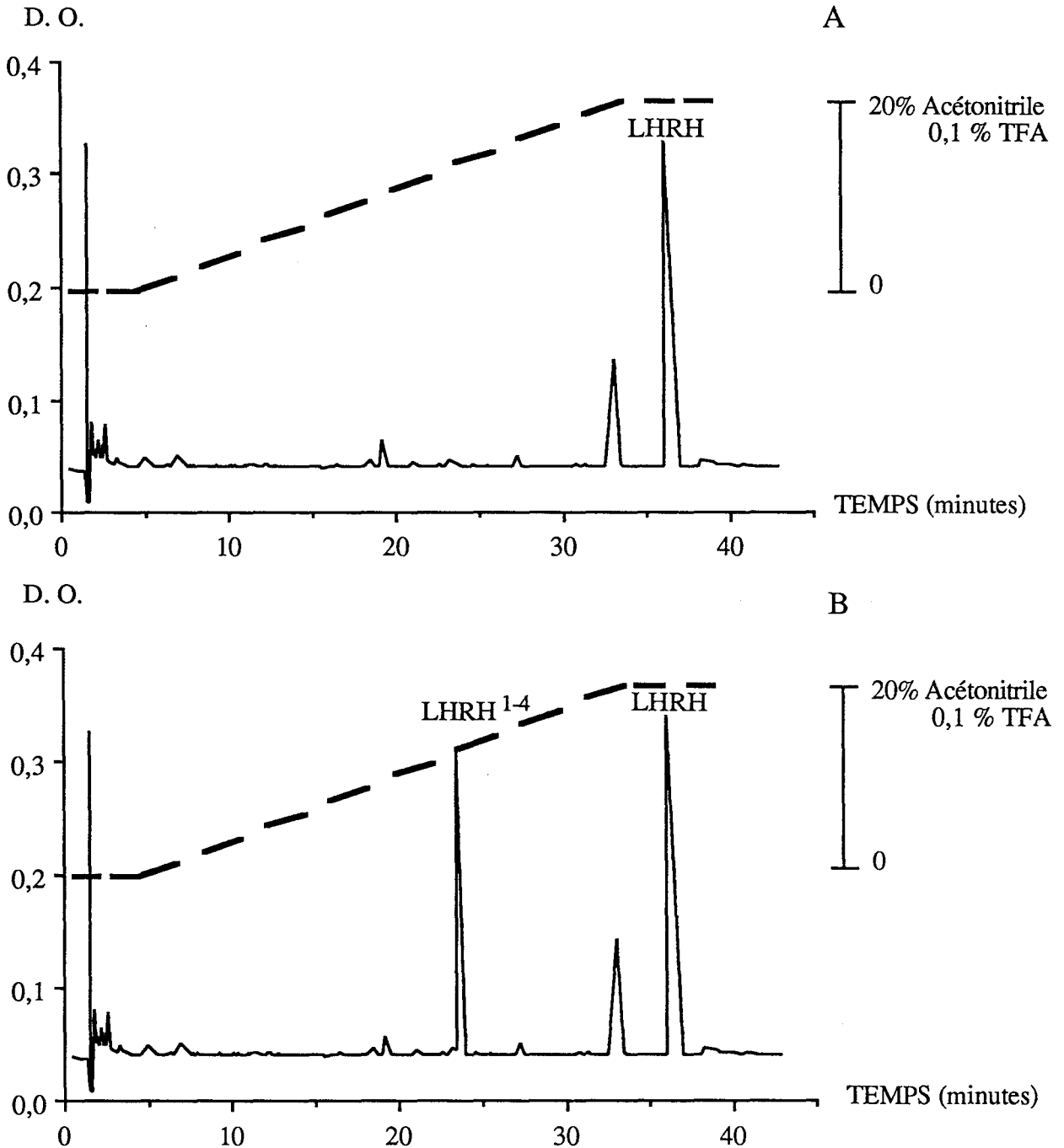


Figure 15 : Dégradation du LHRH par les enzymes de la fraction soluble du cerveau après 15 minutes d'incubation en absence (A) ou en présence (B) de térapeptide.

3°) Exploration de l'effet du tétrapeptide sur les cellules testiculaires de rat *in vitro*

Si le mode d'action du LHRH reste à définir, l'étage de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique dont le fonctionnement est altéré l'est également.

Nous avons donc, dans un deuxième temps, testé *in vitro* l'effet du tétrapeptide sur le fonctionnement de cellules testiculaires de rat ; cet animal étant particulièrement intéressant dans la mesure où il possède des récepteurs pour le LHRH à la surface de ses cellules de Leydig (263).

Dans ce sens, une préparation hétérogène de cellules testiculaires a été entreprise par digestion par la collagénase de testicules de rats de 90 jours (39). Cette préparation contenait 97 % de cellules vivantes (pourcentage mesuré par la coloration au Bleu Trypan) et 25 % de cellules de Leydig (pourcentage déterminé par la réaction mettant en évidence la 3 β HydroxyStéroïde Deshydrogénase : coloration positive).

Les incubations se sont ensuite effectuées à 32 °C dans un milieu Ham F12/DMEM (1/1) contenant 0,1 Unité d'insuline (Sigma) par ml comme préconisé par Browning et col. (48).

a) Effet de différents composés sur la production de testostérone des cellules de Leydig

Cette étude a consisté à mesurer les effets sur la production de testostérone par 10^6 cellules totales (volume final d'incubation de 1 ml) :

- du tétrapeptide (concentrations de 10^{-4} [T-4], 10^{-5} [T-5] et 10^{-6} M [T-6]).
- d'un agoniste du LHRH ; le des-Gly¹⁰, [D-Ala⁶]-Luteinizing Hormone Releasing Hormone éthylamide (Sigma) ; à des concentrations de 10^{-5} [LHRHa-5], 10^{-6} [LHRHa-6], 10^{-8} [LHRHa-8] et 10^{-10} M [LHRHa-10]
- de la LH ovine (NIH, Bethesda) à des concentrations de 0,5 [LH 0,5], 5 [LH 5] et 10 ng/ml [LH 10]
- du N⁶,2'-O- dibutyryladénosine 3':5'monophosphate cyclique (Sigma) à une concentration de 1 mM [db AMPC].

Le protocole d'étude était le suivant . On a incubé pendant 5 heures :

- 10^6 cellules apportées sous un volume de 50 μ l
- 0,1U d'insuline apportée sous un volume de 100 μ l
- différentes quantités de tétrapeptide, LHRHa ou LH apportées sous un volume de 200 μ l
- 650 μ l de milieu

Les résultats sont présentés dans la Figure 16 et les Tableaux 16-A et 16-B.

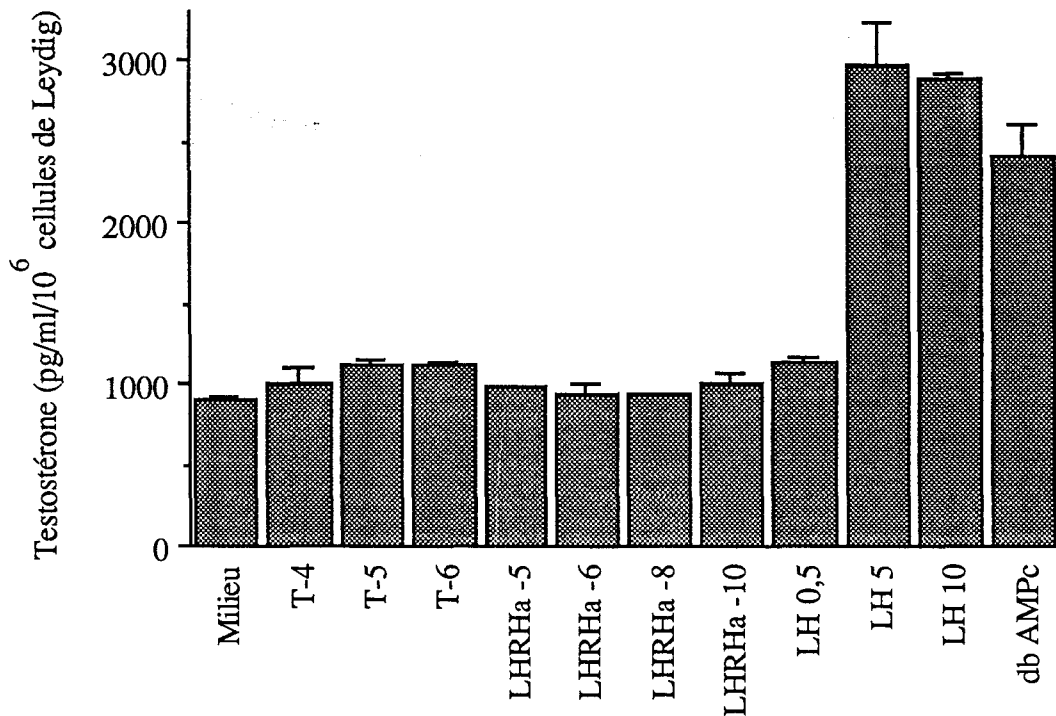


Figure 16 : Production de testostérone par les cellules de Leydig après 5 heures d'incubation en l'absence (Milieu) ou en présence de différents composés : tétrapeptide (concentrations de 10^{-4} [T-4], 10^{-5} [T-5] et 10^{-6} M [T-6]), agoniste du LHRH (concentrations de 10^{-5} [LHRHa-5], 10^{-6} [LHRHa-6], 10^{-8} [LHRHa-8] et 10^{-10} M [LHRHa-10]), LH ovine (concentrations de 0,5 [LH 0,5], 5 [LH 5] et 10 ng/ml [LH 10]), dibutyryl AMP cyclique [db AMPc] (concentration de 1 mM).

	CONCENTRATIONS EN TETRAPEPTIDE APPORTEES LORS DE LA PREINCUBATION																			
	0 M					10 ⁻⁴ M					10 ⁻⁵ M					10 ⁻⁶ M				
	X	G10	G8	G6	G5	X	G10	G8	G6	G5	X	G10	G8	G6	G5	X	G10	G8	G6	G5
NP	904	1002	928	936	978	996					1114					1118				
	±8	±62	±12	±64	±14	±100					±38					±14				
P	908	904	942	874	888	926	898	1054	922	888	1034	982	962	920	968	1078	898	828	896	832
	±112	±8	±34	±122	±104	±30	±6	±6	±70	±68	±62	±18	±2	±68	±68	±174	±34	±92	±8	±44

Tableau 16-A : Effet du tétrapeptide sur la production Leydigienne de testostérone *in vitro* en présence d'un agoniste du LHRH.

(les résultats sont exprimés en pg/ml/10⁶ cellules ± SEM).

NP = résultats obtenus lors d'une incubation de 5 heures des cellules.

P = résultats relevés lors d'une préincubation pendant 30 minutes des cellules en présence de différentes concentrations en tétrapeptide (0, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ M) puis addition soit de milieu (X), soit d'agoniste LHRH (LHRHa) à différentes concentrations (G10 = LHRHa 10⁻¹⁰ M ; G8 = LHRHa 10⁻⁸ M ; G6 = LHRHa 10⁻⁶ M ; G5 = LHRHa 10⁻⁴ M) et incubation pendant 4 heures 30.

	CONCENTRATIONS EN TETRAPEPTIDE APPORTEES LORS DE LA PREINCUBATION																			
	0 M					10 ⁻⁴ M					10 ⁻⁵ M					10 ⁻⁶ M				
	X	LH	LH	LH	dbc	X	LH	LH	LH	dbc	X	LH	LH	LH	dbc	X	LH	LH	LH	dbc
	0,5	5	10			0,5	5	10			0,5	5	10			0,5	5	10		
NP	904 ±8	1140 ±20	2964 ±264	2892 ±28	2414 ±198	996 ±100					1114 ±38					1118 ±14				
P	908 ±112	1016 ±8	2760 ±12	2438 ±46	2016 ±128	926 ±30	1024 ±112	2890 ±54	2644 ±92	2550 ±266	1034 ±62	1024 ±112	2742 ±10	2300 ±208	2180 ±24	1078 ±174	1138 ±62	2992	2746 ±138	2544 ±196

Tableau 16-B : Effet du tétrapeptide sur la production Leydigienne de testostérone *in vitro* en présence de LH ovine.

(les résultats sont exprimés en pg/ml/10⁶ cellules ± SEM).

NP = résultats obtenus lors d'une incubation de 5 heures des cellules.

P = résultats relevés lors d'une préincubation pendant 30 minutes des cellules en présence de différentes concentrations en tétrapeptide (0, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ M) puis addition, soit de milieu (X), soit de LH à différentes concentrations (0,5 ng/ml = LH 0,5 ; 5 ng/ml = LH 5 ; 10 ng/ml = LH 10), soit de dibutyryl AMP cyclique (dbc) et incubation pendant 4 heures 30.

Les résultats montrent que dans nos conditions expérimentales, l'agoniste du LHRH utilisé n'entraîne pas de stimulation aussi nette de la production de testostérone par les cellules de Leydig que celle décrite par Lin (186). La LH stimule pour sa part de manière importante la production de testostérone avec une certaine désensibilisation des cellules qui est observée pour une concentration de 10 ng/ml. Quant au tétrapeptide, ces premiers résultats montrent qu'il entraîne une légère stimulation de la production basale de testostérone.

b) Effet du tétrapeptide sur la réponse des cellules de Leydig à la LH et au LHRH

Dans le but de rechercher une altération de la réponse stéroïdogène des cellules de Leydig par le tétrapeptide dans des conditions de stimulation soit par le LHRHa, soit par la LH, nous avons préincubé pendant 30 minutes 10^6 cellules totales avec différentes concentrations du tétrapeptide. On a ajouté ensuite dans le milieu d'incubation, soit du LHRHa, soit de la LH aux concentrations précédemment décrites et l'incubation a été poursuivie pendant 4h30.

Les résultats, présentés dans les Figures 17-A et 17-B et les Tableaux 16-A et 16-B, ne font pas apparaître d'effet net du tétrapeptide sur la synthèse de testostérone par les cellules de Leydig avec cependant peut être une exception lorsque la stimulation est réalisée par le db AMPC, la synthèse d'androgène apparaissant alors majorée.

Quoi qu'il en soit, des études complémentaires utilisant notamment des cellules de Leydig purifiées, devraient permettre de préciser la cible, si elle existe, du tétrapeptide, ainsi que son mode d'action.

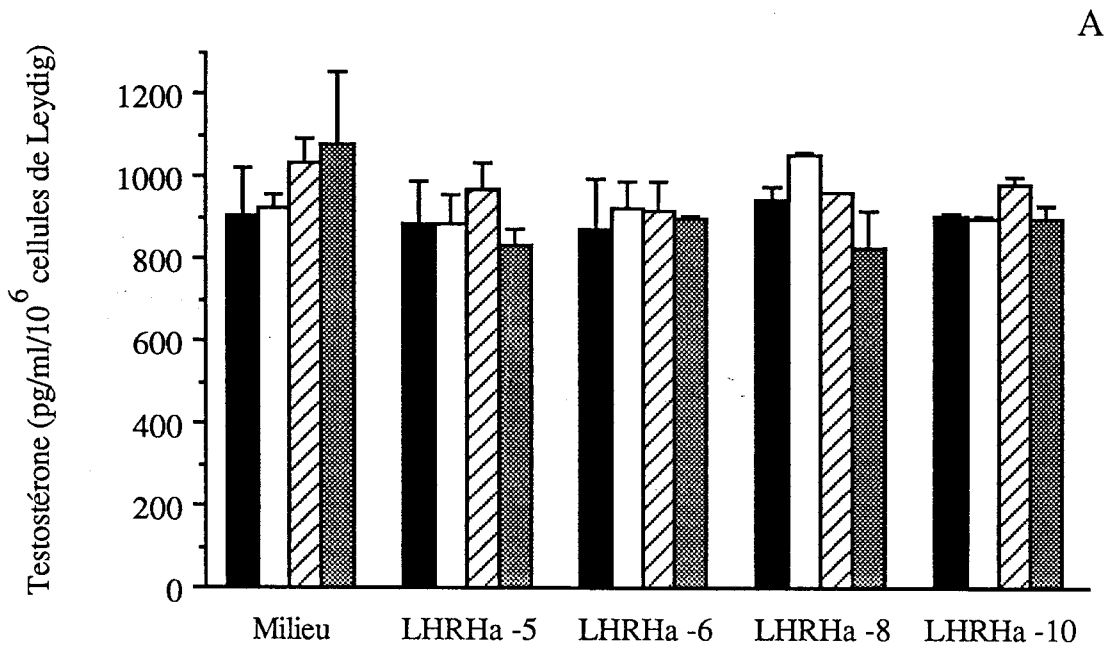


Figure 17-A : Effets de différentes concentrations en LHRHa [10^{-5} M = LHRHa -5 ; 10^{-6} M = LHRHa -6 ; 10^{-8} M = LHRHa -8 et 10^{-10} M = LHRHa -10] sur la production de testostérone par les cellules de Leydig après une préincubation de 30 minutes en présence du tétrapeptide à une concentration de 0 M (barres noires), 10^{-4} M (barres blanches), 10^{-5} M (barres hachurées) et 10^{-6} M (barres grises).

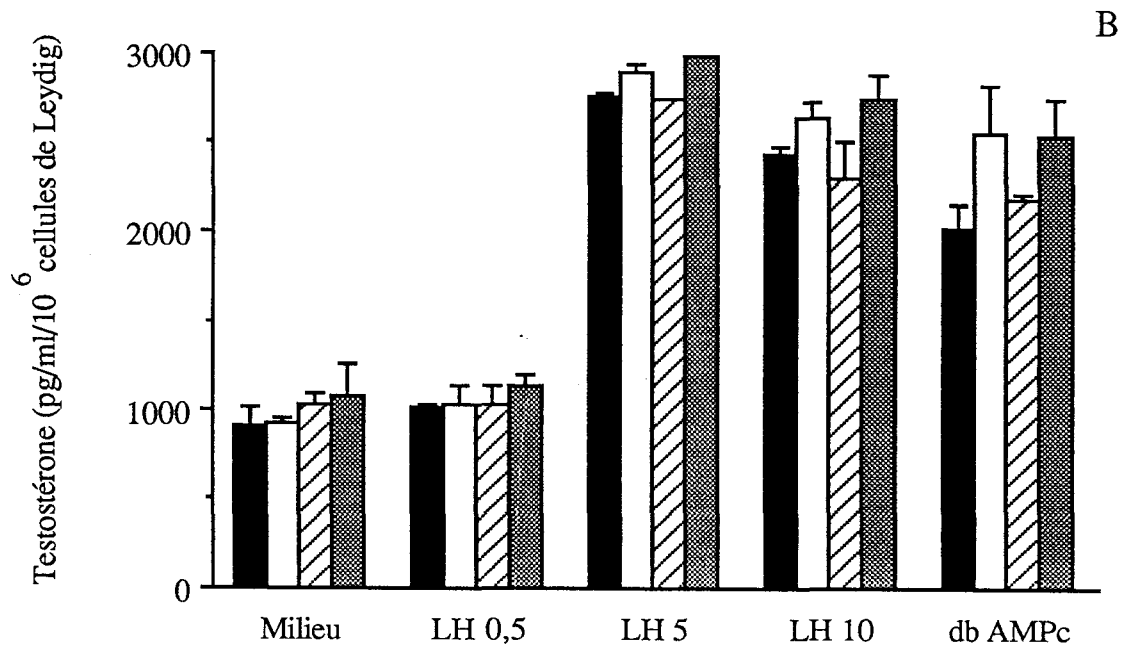


Figure 17-B : Effets de différentes concentrations en LH [0 ng/ml = Milieu ; 0,5 ng/ml = LH 0,5 ; 5 ng/ml = LH 5 ; 10 ng/ml = LH 10] sur la production de testostérone par les cellules de Leydig après une préincubation de 30 minutes en présence du tétrapeptide à une concentration de 0 M (barres noires), 10⁻⁴ M (barres blanches), 10⁻⁵ M (barres hachurées) et 10⁻⁶ M (barres grises).

III) EFFETS DE COMPOSES PARASITAIRES DE NATURE NON ENZYMATIQUE SUR LE FONCTIONNEMENT GONADIQUE DU RAT SAIN

Des études préliminaires réalisées au laboratoire avaient mis en évidence que l'injection de préparations parasitaires réalisées en présence d'inhibiteurs de protéases entraînaient l'apparition d'un hypogonadisme en l'espace de 5 heures sans modifications significatives du taux de LH sérique et du contenu hypophysaire en LH (130).

Les mécanismes responsables de l'hypofonctionnement gonadique apparaissaient donc différents de ceux observés lors de l'injection de préparations réalisées en l'absence d'inhibiteurs de protéases dans la mesure où dans ce dernier cas l'hypotestostéronémie s'accompagnait d'une diminution du taux sérique de LH avec accumulation de LH dans l'hypophyse.

L'antigène Variable de Surface (AVS) du trypanosome étant le constituant quantitativement majeur des extraits parasitaires, il convenait donc d'étudier ses effets sur le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

Nous avons donc réalisé une purification de l'AVS par chromatographie d'affinité sur Concanavaleine A-Sepharose (Con A-Sepharose) dans les conditions décrites par Baltz et col. (18) ce qui nous a permis d'obtenir 2 fractions, Con A-F1 et Con A-F2, à partir d'un extrait brut parasitaire préparé en présence d'inhibiteurs de protéases (PMSF, NEM et TLCK).

La fraction Con A-F1 correspond à la fraction non retenue par la lectine alors que la fraction Con A-F2 correspond à la fraction éluée spécifiquement par le méthyl α -D-mannopyranoside (Sigma) et est essentiellement constituée par l'AVS.

Les effets de l'injection des 2 fractions sur le taux de testostérone sérique (témoin de l'activité gonadique) a alors été testé.

1°) Etude préliminaire du rythme circadien de la testostérone chez les rats de 10 mois

Pour étudier l'effet des fractions parasitaires sur le fonctionnement gonadique, nous avons décidé d'utiliser les conditions employées précédemment au laboratoire lors de l'étude des effets des extraits parasitaires "bruts"(130), soit l'injection des préparations à t=0 et observation des effets après 5 heures.

Une étude préliminaire des variations circadiennes des taux sériques de la testostérone chez les rats *Sprague-Dawley* âgés de 10 mois a donc été nécessaire de façon à définir une période de prélèvement (et donc d'injection) où ces taux seraient stables. En conséquence, des groupes de 5 rats ont été prélevés toutes les 4 heures pendant 24 heures. Par la suite d'autres groupes de 3 rats du même âge ont été prélevés toutes les 30 minutes entre 15h00 et 16h30 de manière à affiner la connaissance des variations des taux sériques de testostérone dans cette tranche horaire.

L'observation des variations circadiennes de la testostéronémie met en évidence une certaine stabilité du taux sérique de la testostérone entre 15h00 et 16h00 avec 2 pics plasmatiques journaliers de ce stéroïde (Figure 18) comme cela avait déjà été décrit par Keel (157).

C'est en nous basant sur cette observation que nous avons défini la période d'injection (10h00 le matin) de composés parasitaires chez des rats sains afin d'apprécier leurs effets sur l'axe gonadotrope.

Testostéronémie

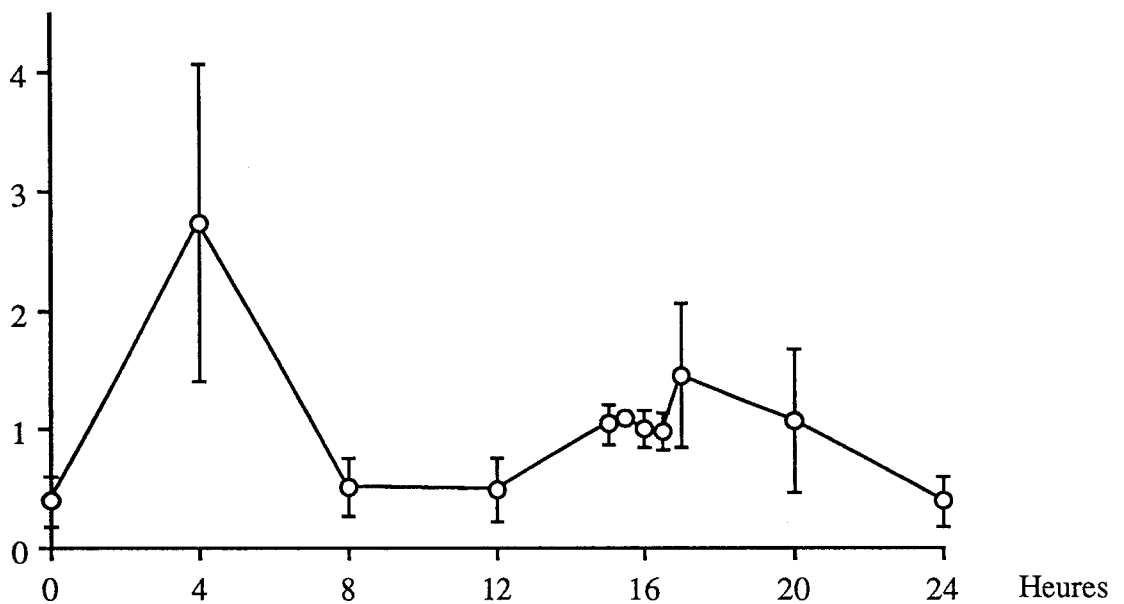


Figure 18 : Variations circadiennes des taux sériques de testostérone

2°) Conséquences sur la fonction gonadique de l'injection chez le rat sain d'un matériel parasitaire partiellement purifié

Deux groupes de rats ont été inoculés par voie ip par 5 ml de PSG contenant du matériel trypanosomal purifié préparé à partir de 4 animaux présentant une parasitose aiguë à *T. brucei brucei* AnTat 1.1 A (soit 9,2 mg par rat pour la fraction Con A-F1 [groupe 2 = G2, n=7] et 18,3 mg par rat pour la fraction Con A-F2 [groupe 3 = G3, n=6]). 13 rats témoins [groupe 1 = G1] ont pour leur part été inoculés uniquement par le tampon PSG.

L'injection du matériel a été réalisée à 10h00 le matin et les rats décapités 5 heures plus tard. Le sang a été récupéré à partir du tronc et les sérums conservés à -20°C pour les dosages hormonaux.

Il apparaît clairement (Figure 19 et Tableau 17) que l'injection des fractions Con A-F1 (groupe 2) et Con A-F2 (groupe 3) induit en l'espace de 5 heures une diminution significative de la testostéronémie (T) et donc un dysfonctionnement gonadique.

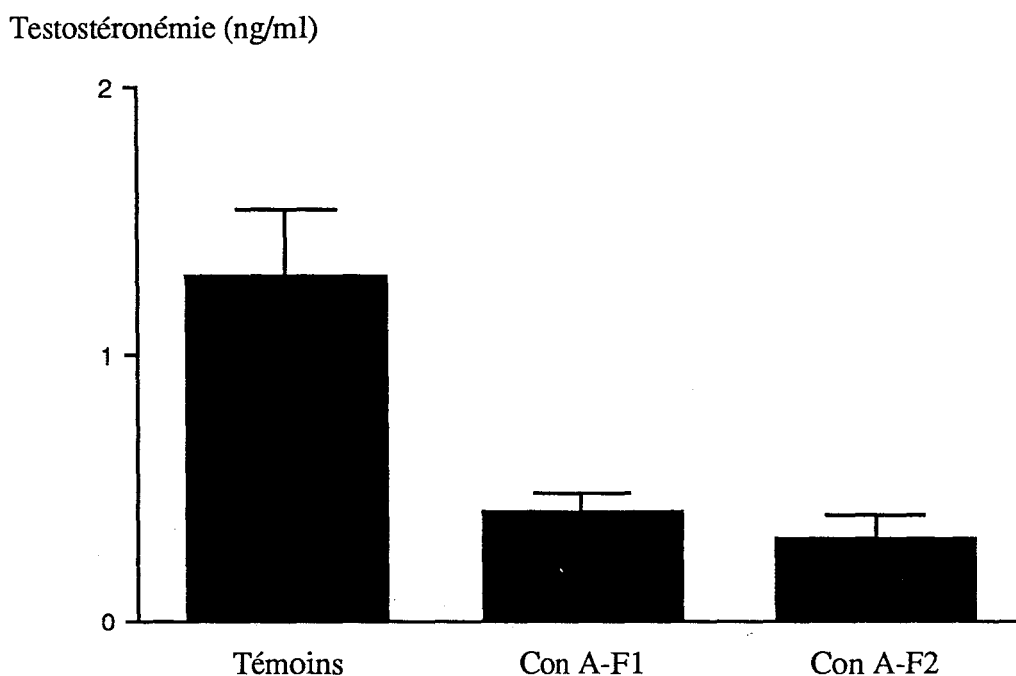


Figure 19 : Taux sériques de testostérone 5 heures après l'injection des fractions Con A-F1 ou Con A-F2.

	Rats Témoins (G1)	groupe 2 (G2)	groupe 3 (G3)	Analyse statistique (test de Student)
Testostérone (ng/ml)	1,29 ± 0,25	0,45 ± 0,07	0,31 ± 0,09	G1/G2 : p < 0,05 G1/G3 : p < 0,05

Tableau 17 : Effet des fractions Con A-F1 et Con A-F2 sur les taux sériques de testostérone 5 heures après leur injection chez des rats mâles sains.

Dans la mesure où les inhibiteurs de protéases employés pour la préparation des fractions auraient éventuellement pu, par eux mêmes, induire un dysfonctionnement de l'axe gonadotrope, nous avons comparé les taux sériques de testostérone (T) de rats sains inoculés avec une solution d'inhibiteurs de

protéases (TLCK, PMSF et NEM à une concentration de 0,2 mM) dans le PSG à ceux de rats uniquement inoculés par du PSG. Nos résultats indiquent que les inhibiteurs de protéases utilisés lors de la préparation des fractions n'interviennent pas dans la diminution observée des taux sériques de testostérone.

-Rats inoculés par du PSG seul : $T = 0,93 \pm 0,2 \text{ ng/ml}$; $n = 7$

-Rats inoculés par du PSG contenant
des inhibiteurs de protéases: $T = 0,90 \pm 0,2 \text{ ng/ml}$; $n = 7$

La différence existant entre les valeurs de testostéronémie des 2 groupes témoins présentés dans cette étude est liée à au fait que les 2 expérimentations ont été réalisées à des périodes différentes de l'année.

Un ou des composés parasitaires de nature non enzymatique semblent donc jouer un rôle dans la survenue des troubles de la stéroïdogénèse gonadique au cours de la trypanosomiase.

En effet, l'injection des fractions Con A-F1 et Con A-F2 induit en 5 heures une hypotestostéronémie. Dans la mesure où ces 2 fractions diffèrent uniquement par leur capacité à être retenues ou non sur une colonne de Concanavaline A-sepharose, elles contiennent soit des formes différemment glycosylées du même composé (223, 17), soit différentes protéines et/ou fragments associés qui pourraient avoir le même effet sur le fonctionnement gonadique sinon la même cible.

3°) Etude approfondie des effets endocriniens de la fraction Con A-F2

La préparation Con A-F2, essentiellement constituée par l'AVS (43), induit un hypogonadisme en l'espace de 5 heures.

Cependant il faut relever que les quantités de matériel parasitaire injectées étaient très importantes dans l'étude précédente. Il convenait donc d'apprécier l'effet sur le fonctionnement gonadique de l'injection de quantités moindres d'AVS.

Par ailleurs, de manière à étudier plus précisément l'origine de la diminution du taux sérique de testostérone, les taux sériques de corticostérone et de LH ont été également mesurés.

Des dilutions au 1/20 (groupe 2 = G2) et 1/40 (groupe 3 = G3) de la solution de Con A-F2 utilisée dans l'expérience précédente ont donc été injectées à des groupes de 6 rats. Onze rats témoins (groupe 1 = G1) ont pour leur part été inoculés uniquement par du PSG sous un volume de 5 ml. Cinq heures plus tard, tous les rats ont été décapités et le sang du tronc récupéré de façon à mesurer les taux sériques de testostérone, LH et corticostérone.

Les résultats font apparaitre globalement une diminution significative des taux sériques de testostérone et de corticostérone des rats inoculés, associée à une augmentation de la LH (Figure 20 et Tableau 18).

	Témoins (G1)	"Con A-F2" dilution 1/20 (915 µg) (G2)	"Con A-F2" dilution 1/40 (460 µg) (G3)	Analyse statistique (Test de Student)
Testostérone (ng/ml)	1,31 ± 0,14	0,91 ± 0,25	0,50 ± 0,08	G1/G3 : p < 0,01
LH (ng/ml)	5,28 ± 1,84	7,91 ± 1,63	7,18 ± 3,03	
Corticostérone (µg/l)	212,1 ± 19,5	143,4 ± 20,2	131 ± 17,6	G1/G2 : p < 0,05 G1/G3 : p < 0,02

Tableau 18 : Valeurs des paramètres endocriniens relevées 5 heures après l'injection de différentes dilutions de la fraction Con A-F2.

Chaque résultat est la moyenne de chaque groupe ± SEM.

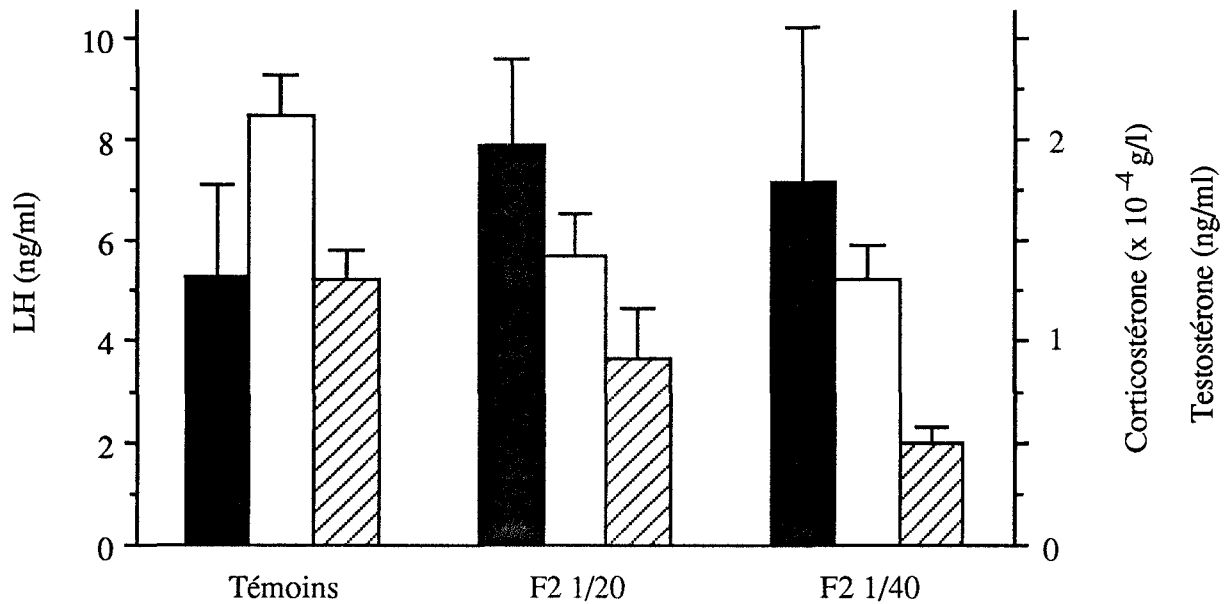


Figure 20 : Perturbations endocriniennes relevées 5 heures après l'injection à des rats mâles sains de la fraction Con A-F2. Les barres noires correspondent aux valeurs de LH sérique, les barres blanches aux valeurs de corticostéronémie, et les barres hachurées aux valeurs de testostéronémie.

L'activité apparemment moindre de la dilution 1/20 par rapport à la dilution 1/40 sur la testostéronémie est en fait liée à la présence dans le groupe des rats testés avec la dilution 1/20 d'un animal présentant un taux sérique de testostérone anormalement élevé (2,15 ng/ml).

L'étude approfondie des effets de la fraction Con A-F2 montre que la diminution du taux sérique de testostérone est associée à une augmentation de la LH sérique.

Si le matériel parasite injecté entraînait primitivement une augmentation de sécrétion de LH, une hypotestostéronémie secondaire à la désensibilisation des cellules de Leydig ne pourrait pas être observée dans un délai aussi bref (128). Ainsi, il apparaît que la fraction Con A-F2 renferme un ou des composants qui semblent inhiber la synthèse des stéroïdes avec une influence plus marquée vis à vis de celle des androgènes.

IV) EFFET D'UN MATERIEL PARASITAIRE SUR LE MAINTIEN DE L'INTEGRITE DES RECEPTEURS TESTICULAIRES DE LA LH

Dans la mesure où les expériences précédentes orientaient vers une action directe de produits parasitaires sur le fonctionnement gonadique, nous avons étudié l'effet d'extraits parasitaires réalisés en l'absence d'inhibiteurs de protéases à partir des variants AnTat 1.1 A et AnTat 1.8 sur l'intégrité dans le temps des récepteurs testiculaires de la LH. La source de récepteurs était constituée d'un homogénat testiculaire réalisé à partir de 6 rats sains et l'intégrité des récepteurs de la LH dans le temps était appréciée par leur capacité à fixer une dose fixe d'hCG marquée à l'Iode 125 dans les conditions déjà décrites.

Cette étude a nécessité une mise au point des conditions de "binding" qui a fait écarter l'utilisation dans les protocoles expérimentaux de l'EDTA et du DTT dans la mesure où ces composés altéraient la fixation du ligand radiomarqué sur son récepteur.

Ces composés auraient en effet pu être intéressants à tester pour étudier le comportement des récepteurs testiculaires de la LH en présence d'un activateur de thiol-protéases (DTT) ou d'un inhibiteur de métallo-protéases (EDTA).

1°) Interférences de l'EDTA et du DTT sur la fixation de la gonadotrophine chorionique sur les récepteurs testiculaires de la LH

a) Effets de l'EDTA sur le "binding"

Dans chaque tube à hémolyse en polystyrène cristal on introduit :

- 100 µl d'homogénat Hom1 réalisé à partir de 6 rats
- 50 µl de Tris 1 contenant ou pas de l'EDTA à une concentration finale de 0,2 ; 1 ou 5 mM

On réalise alors une préincubation de 0 ou 1 heure à 34 °C au bain marie avant d'ajouter au mélange réactionnel :

- 50 µl d'une solution dans le Tris 1 du traceur hCG* (300 000 cpm)
- 50 µl de Tris 1 seul ou contenant le compétiteur froid (hCG⁰)

Les tubes ont alors été incubés pendant 2 heures à 34 °C.

La Figure 21 montre que l'EDTA diminue le "binding" du traceur sur les récepteurs testiculaires de la LH.

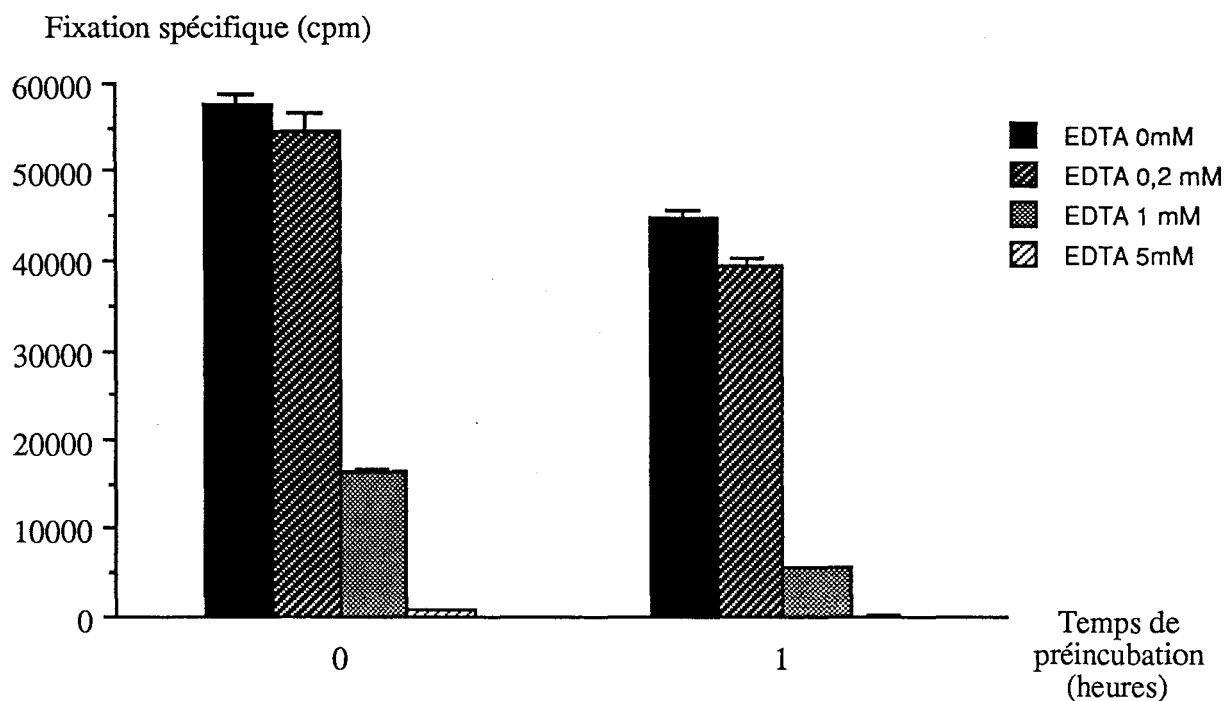


Figure 21 : Effet de l'EDTA sur la fixation spécifique de l'hCG* sur les récepteurs testiculaires de la LH

b) Effets du DTT sur le "binding"

Les conditions d'incubation ont été les suivantes :

-100 µl de Tris 1

-100 µl de Hom 1 préparé à partir de 6 rats

-50 µl de Tris 1 seul ou contenant du DTT à une concentration finale de 1,25 mM

-50 µl de Tris 1

On réalise une préincubation de 0 ou 1 heure à 34 °C au bain marie, puis on ajoute dans les tubes :

-50 µl de la solution du traceur dans le Tris 1 (280 000 cpm)

-50 µl de Tris 1 seul ou contenant le compétiteur froid

L'incubation est de 2 heures à 34 °C.

Après lavage et centrifugation on réalise le comptage des culots.

Les résultats, présentés sur la Figure 22 mettent en évidence un effet inhibiteur du DTT sur le binding de l'hCG* sur les récepteurs testiculaires de la LH ce qui confirme les travaux de Sojar et Col. qui montraient que les agents réducteurs déstabilisent la conformation du récepteur de la LH et donc de ce fait altèrent la fixation de son ligand spécifique (268).

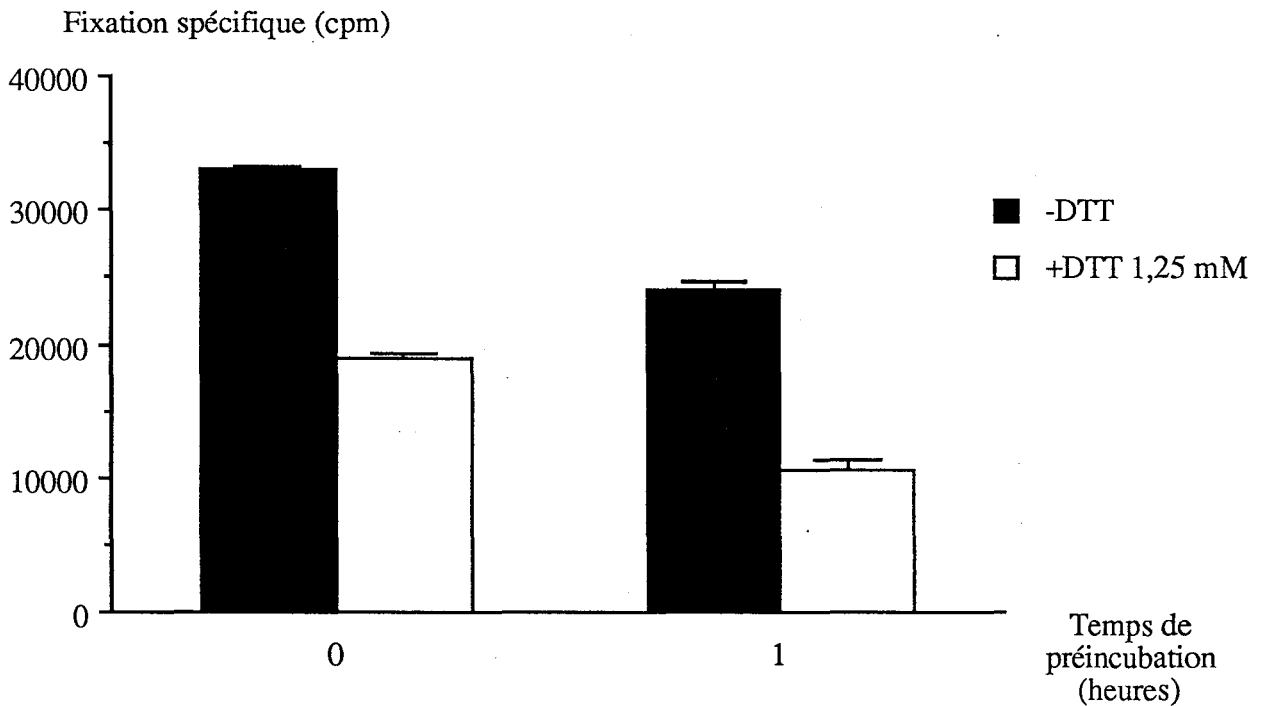


Figure 22 : Effet du DTT sur la fixation spécifique de l'hCG* sur les récepteurs testiculaires de la LH en fonction du temps de préincubation des homogénats avec le réducteur.

2°) Effet d'un extrait parasitaire sur la capacité des récepteurs testiculaires de la LH à fixer l'hCG

Des surnageants d'extraction parasitaire réalisés en l'absence d'inhibiteurs de protéases à pH 5,5 à partir des variants *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1.1 A et 1.8 ont été ajustés à un pH de 7,4 avec du phosphate disodique 0,125 M.

L'activité enzymatique (mesurée en utilisant le substrat synthétique Z-Phe-Arg-AMC) et la concentration en protéines de chacune des préparations a été déterminée. Les résultats étaient les suivants :

Solutions ajustées à pH 7,4	Activité enzymatique (UI/l)	Concentration en protéines (g/l)
Variant AnTat 1.1 A	13,8	0,65
Variant AnTat 1.8	17,1	0,52

Le protocole expérimental a alors été le suivant :

Dans des tubes à hémolyse de 5 ml en polystyrène cristal on introduit :

- 100 µl d'homogénat H2 préparé en l'absence d'inhibiteurs de protéases
- 100 µl du surnageant d'extraction ajusté à pH 7,4 ou de tampon phosphate 0,125 M de pH 7,4 contenant 0,3% de glucose (tampon P).
- 50 µl de tampon Tris 1 seul ou contenant PMSF et E-64 à une concentration de 0,2 mM final.

On réalise ou non une préincubation à 34°C pendant 0, 1 ou 2 heures, puis on ajoute au mélange réactionnel :

- 50 µl d'une solution d'hCG* (300 000 cpm) dans le tampon P
- 50 µl de tampon Tris 1 ou d'une solution d'hCG froid (correspondant à 1000 fois la quantité d'hormone apportée sous 300 000 cpm) dans ce tampon Tris 1 de manière à mesurer le "binding" non spécifique.

Les tubes sont alors incubés pendant 2 heures à 34°C. Le lavage et le comptage de la radioactivité sont réalisés comme décrit précédemment.

Les résultats de la mise en contact des extraits parasitaires avec les récepteurs de LH sont présentés sur la Figure 23.

Ils font apparaître un effet protecteur des extraits étudiés sur l'altération dans le temps des récepteurs de la LH par des enzymes tissulaires.

En effet, en l'absence d'inhibiteurs de protéases (Figure 23-A), on observe que la capacité des récepteurs de la LH à fixer l'hCG diminue de manière importante après 2 heures d'incubation alors qu'en présence d'extraits parasitaires cette diminution est fortement atténuée.

Par contre, lorsque des inhibiteurs de protéases sont introduits dans le milieu d'incubation (Figure 23-B), on observe que l'altération de l'intégrité des récepteurs de la LH incubés en l'absence d'extrait parasitaire est fortement réduite dans le temps et qu'elle devient pratiquement comparable à celle observée lorsque les homogénats sont incubés avec les extraits parasitaire en présence des mêmes inhibiteurs de protéases.

L'étude comparée des résultats relevés en présence et en l'absence d'inhibiteurs de protéases suggère donc un effet protecteur de composés parasitaires de nature non enzymatique vis à vis de l'altération du récepteur gonadique de la LH par les enzymes testiculaires.

Dans la mesure où ces derniers enzymes interviennent dans les processus de "Down-régulation" des récepteurs testiculaires de la LH on peut penser qu'une entrave à ce phénomène pourrait être à l'origine d'une stimulation trop prolongée des cellules de Leydig avec une désensibilisation précoce de celles-ci.

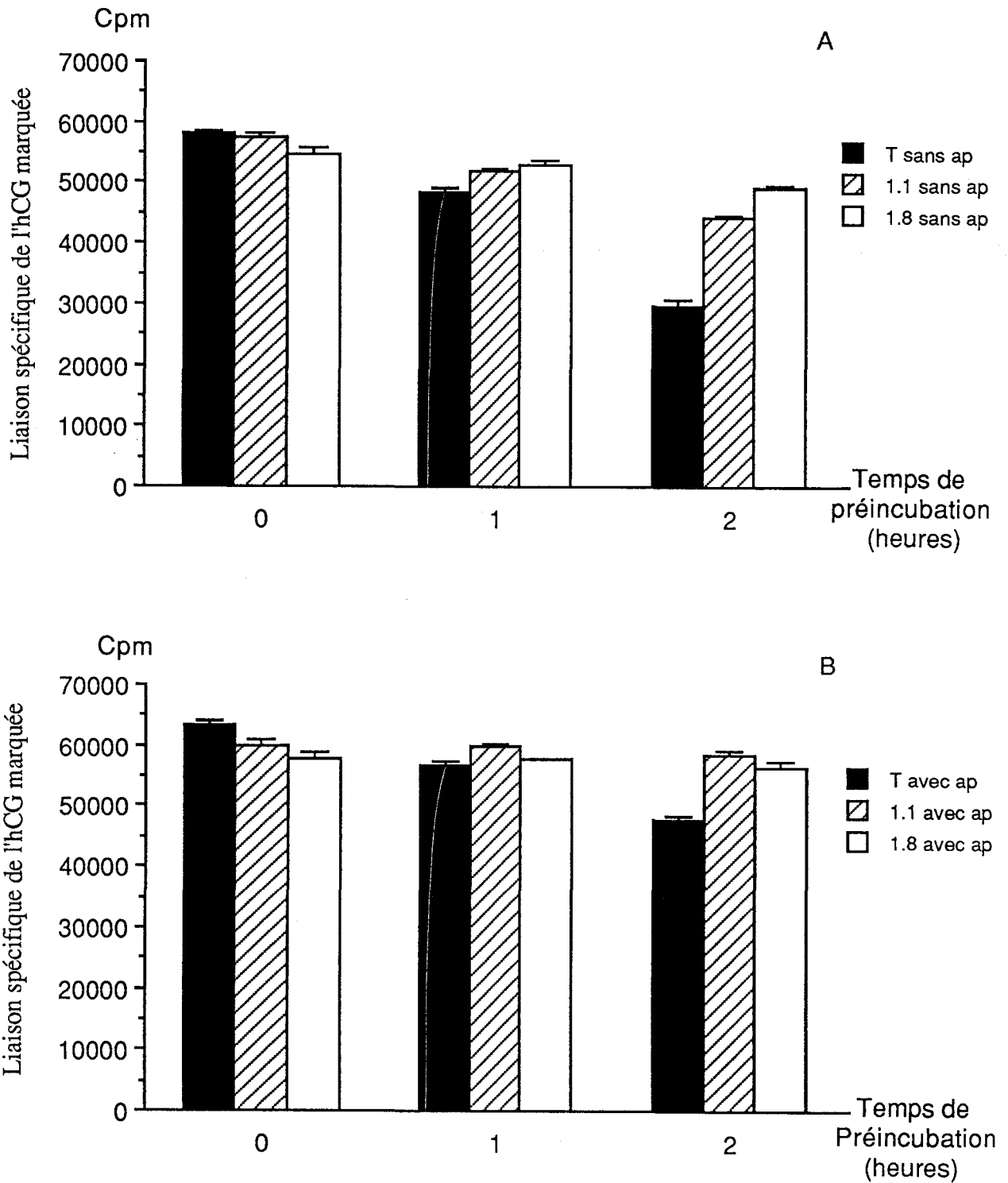


Figure 23 : Evolution en fonction du temps de la capacité des récepteurs testiculaires de la LH à fixer l'hCG marquée à l'Iode 125 en présence ou non (T=témoins) d'extraits parasitaires bruts préparés à partir des variants AnTat 1.1 A ou AnTat 1.8. A : Etudes réalisées en l'absence d'antiprotéases (ap) ; B: Etudes réalisées en présence d'antiprotéases

3°) Interactions de l'AVS avec le récepteur testiculaire de la LH

L'Antigène Variable de Surface (AVS) constitue l'élément quantitativement majeur des extraits parasitaires et il est en grande partie sous forme purifiée dans la fraction Con A-F2 (42).

Nous avons donc recherché un site de fixation spécifique de l'AVS sur des homogénats testiculaires.

Deux formes d'AVS ont été étudiées après marquage à l'Iode 125 : une forme monomère (extraite du variant AnTat 1.8) et une forme dimère (extraite du variant AnTat 1.1 A).

La source d'AVS employée a été constituée de la fraction Con A-F2 obtenue par chromatographie d'affinité sur Concanavaleine A-Sepharose d'un extrait parasitaire "brut" préparé en présence d'inhibiteurs de protéases. Deux protocoles d'études ont été engagés :

a) Recherche d'un récepteur spécifique de l'AVS ainsi qu'une inhibition de sa fixation par un excès d'hCG

On a, pour cette étude, incubé pendant 3 heures à 20°C :

- 100 µl d'homogénat H2
- 50 µl d'une solution de Con A-F2* (Con A-F2 marquée) à différentes dilutions dans le Tris 1
- 50 µl de Tris 1 seul ou contenant une concentration molaire 1000 fois plus importante en AVS non marqué ou en hCG non marqué

La Figure 24 montre que l'AVS ne possède pas de récepteur testiculaire spécifique et que l'état dimère (Figure 24-A) ou monomère (Figure 24-B) de l'AVS ne joue aucun rôle sur sa fixation spécifique testiculaire.

On a par ailleurs testé la fixation de l'AVS dimère sur un homogénat préparé à partir des testicules prélevés chez un rat au troisième jour d'infestation par *T. b. brucei* Variant AnTat 1.1 A. Les résultats (Figure 25) montrent une fixation testiculaire toujours non spécifique de l'AVS avec cependant, à la différence de ce qui est observé lorsque les études sont réalisées sur des homogénats testiculaires de rats sains, une fixation apparemment accrue de l'AVS marqué lorsque le milieu d'incubation contient un excès d'AVS non marqué, ce qui est sans doute lié aux modifications inflammatoires des tissus.

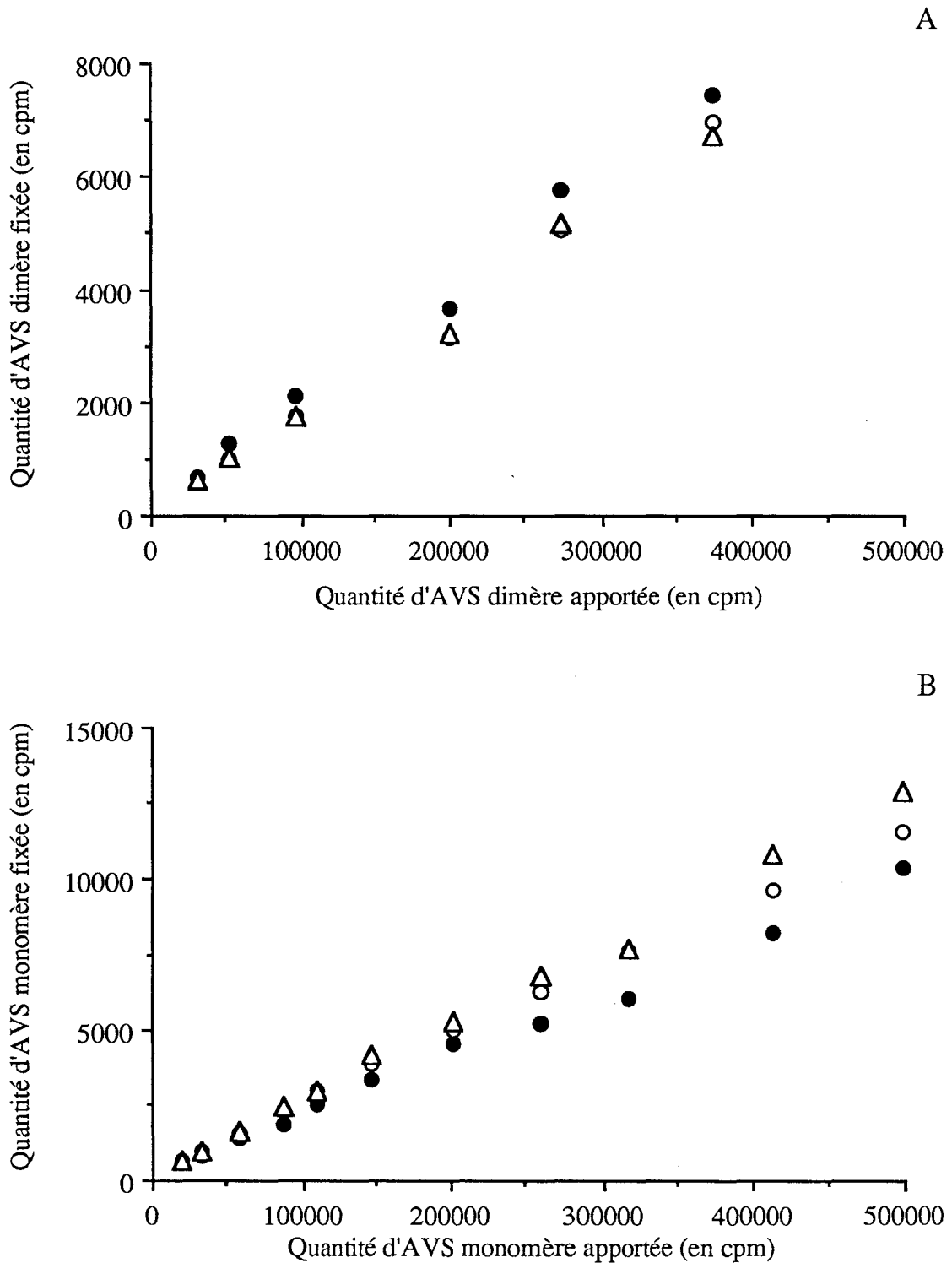


Figure 24 : Recherche d'un récepteur testiculaire spécifique de l'AVS. Les ronds blancs = fixation de l'AVS seul, les ronds noirs = fixation de l'AVS marqué en présence d'un excès d'AVS non marqué, et les triangles blancs = fixation de l'AVS marqué en présence d'un excès d'hCG non marqué.

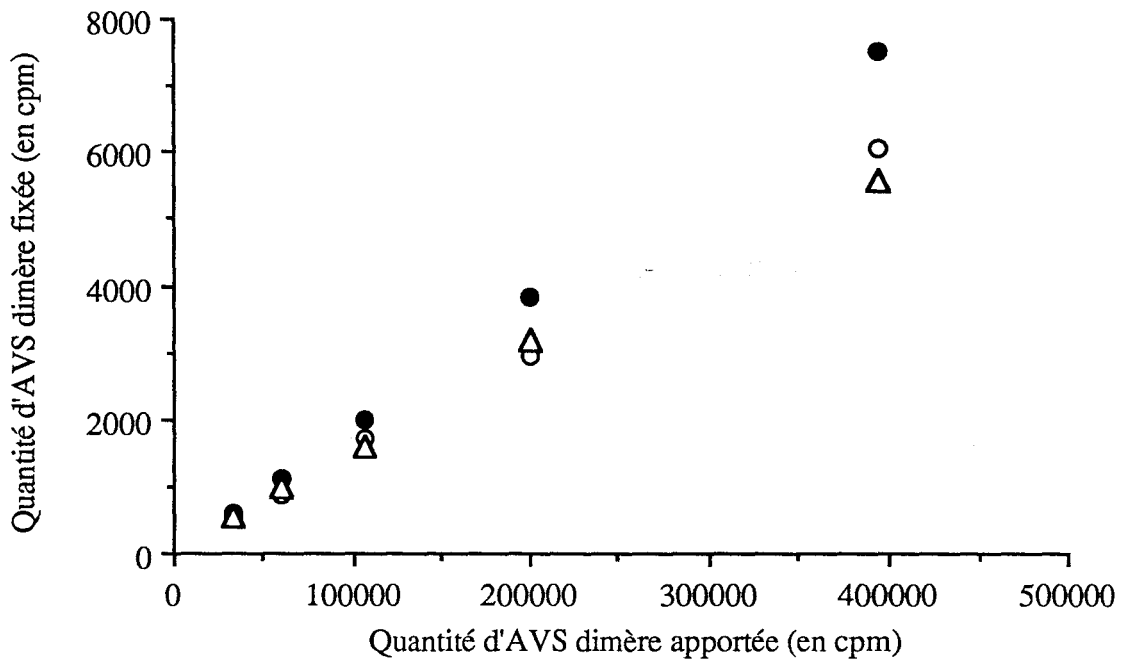


Figure 25 : Etude de la fixation de l'AVS dimère sur un homogénat préparé à partir des testicules d'un rat infesté par *T. b. brucei* Variant AnTat 1.1 A. Les ronds blancs = fixation de l'AVS seul, les ronds noirs = fixation de l'AVS marqué en présence d'un excès d'AVS non marqué, et les triangles blancs = fixation de l'AVS marqué en présence d'un excès d'hCG non marqué.

b) Recherche d'une inhibition de la fixation de l'hCG* sur les récepteurs testiculaires de la LH par la fraction Con A-F2

On a, pour cette étude, incubé pendant 3 heures à 20°C :

-100 µl d'homogénat H2

-50 µl d'une solution d'hCG* à différentes dilutions dans le Tris 1

-50 µl de Tris 1 seul ou contenant une concentration molaire 1000 fois plus importante en AVS non marqué (fraction F2) ou en hCG non marqué

Il apparaît (Figure 26) que l'AVS, qu'il soit sous forme monomère ou dimère, n'inhibe pas la fixation de l'hCG* sur les récepteurs testiculaires de la LH.

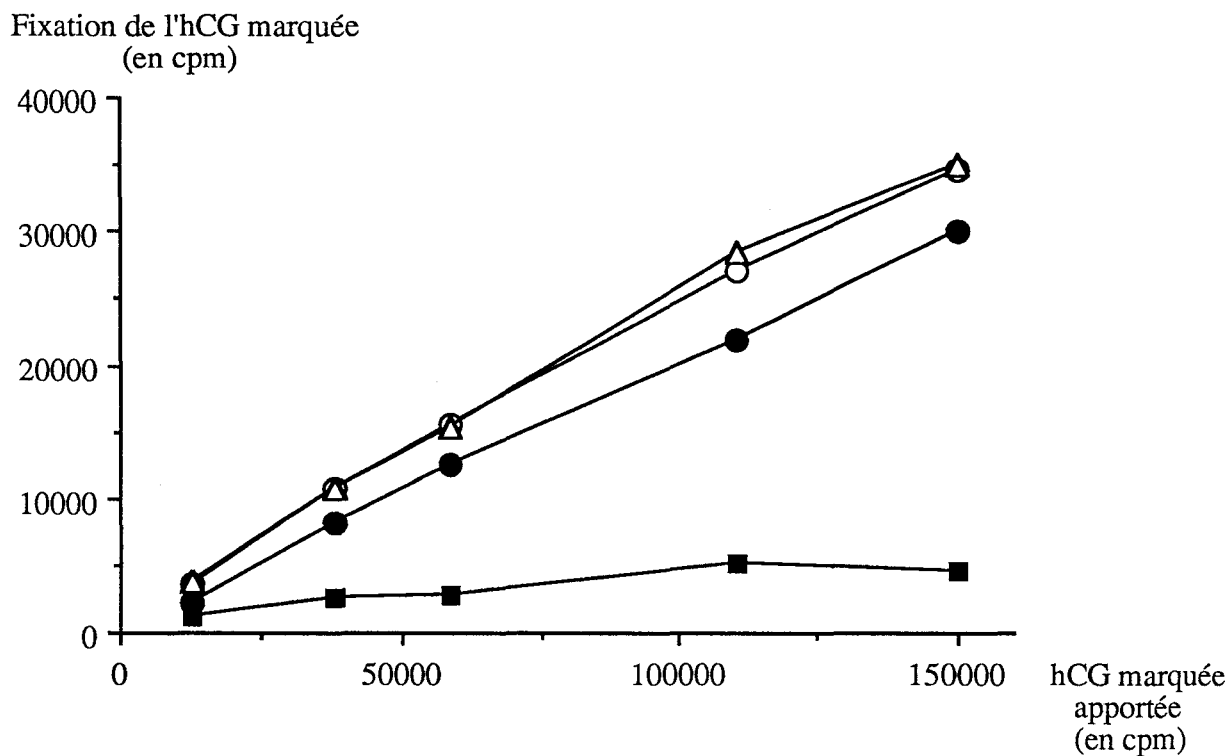


Figure 26 : Essai d'inhibition de la fixation de l'hCG* sur les récepteurs testiculaires de la LH par l'AVS dimère préparé à partir du variant AnTat 1.1 A. Les ronds blancs correspondent à la fixation de la gonadotrophine marquée en l'absence de compétiteur, les ronds noirs correspondent à la fixation spécifique de cette même gonadotrophine marquée, les carrés noirs correspondent à la fixation non spécifique de l'hormone, et les triangles blancs correspondent à la fixation de l'hCG* en présence d'un excès (1000 fois molaire) d'AVS (Con A-F2).

c) Essai de mise en évidence de la fixation d'un produit parasitaire sur le récepteur testiculaire de la LH

L'AVS ne possède pas de récepteur spécifique testiculaire et n'empêche pas la fixation de la LH sur son récepteur. Cependant, nos expériences *in vitro* ont mis en évidence qu'un produit parasitaire présent dans les extraits de trypanosomes était capable de "protéger" le récepteur de la LH de l'action protéolytique des enzymes testiculaire sans altérer la reconnaissance de ce récepteur par la gonadotrophine. Un composé issu du parasite doit donc interagir avec le récepteur testiculaire de la LH, et pourrait par exemple se fixer sur un site du récepteur différent de celui reconnaissant la LH.

Nous avons donc essayé de mettre en évidence une telle fixation en répétant l'expérience d'incubation d'homogénats testiculaires avec des extraits parasitaires et de l'hCG marquée à l'iode 125.

Nous avons ensuite stabilisé par le glutaraldéhyde les complexes [hCG* - récepteur de la LH - composé parasitaire] qui auraient pu se former et la révélation de ceux-ci s'est effectué par autoradiographie après électrophorèse en gel de polyacrylamide des mélanges réactionnels.

Le protocole d'étude employé a été le suivant :

- 100 µl d'homogénat H2 sont préincubés pendant 1 heure à 34°C avec
- 100 µl de surnageant d'extraction parasitaire préparé en l'absence d'inhibiteurs de protéases à partir des variants AnTat 1.1 A ou AnTat 1.8 et ajusté à pH 7,4 ou 100 µl de tampon phosphate 0,125 M de pH 7,4 contenant 1% de glucose.

Après la préincubation, on ajoute dans chaque tube

- 50 µl d'une solution d'hCG* (2 700 000 cpm) ainsi que
- 50 µl de tampon Tris 1 ou 50 µl d'hCG° (compétiteur "froid" apporté à une concentration molaire 1000 fois plus importante que l'hCG*).

Le mélange est alors incubé au bain marie pendant 2 heures à 34°C puis centrifugé à 3000 g pendant 15 minutes.

Après ces opérations, les culots sont lavés 2 fois par

-4 ml d'un tampon phosphate de sodium 10 mM de pH 7 contenant 5 mM de NEM (tampon A), de façon à éliminer le Tris (161).

Les complexes [hCG*-récepteur] sont ensuite solubilisés par addition au culot de

-300 µl du tampon A, contenant 140 mM NaCl et 1% (v/v) Triton X-100 [Sigma], et agitation 30 minutes dans la glace avec le bout d'une pipette pasteur fermée (163).

A la fin de la réaction, on ajoute au milieu réactionnel

-500 µl de tampon A et on centrifuge l'ensemble à 100 000 g pendant 60 minutes à +4°C.

Aux 800 µl de surnageant on ajoute alors 6,4 µl d'une solution de glutaraldéhyde [TAAB laboratories equipment limited] diluée au 1/10 dans le tampon A (concentration finale 2 mM) et on incube 60 minutes à 20°C. La réaction est finalement arrêtée par addition de 100 µl d'un tampon 1 M Tris/HCl de pH 7,4 à +4°C (242).

Les 900 µl obtenus sont ensuite dialysés pendant 20 heures à +4°C contre 9 ml d'un tampon 125 mM Tris/HCl de pH 6,8 et contenant 2% SDS (p/v) [Interchim], 10 % (v/v) glycérol [Merck] et 0,001% (p/v) de bleu de bromophénol [Merck]. Le produit obtenu a été concentré au speed-vac de façon à avoir une concentration suffisante en hCG* dans le mélange (environ 2000 cpm/10 µl).

Les échantillons ont ensuite été chauffés à ébullition pendant 2 minutes en présence de β-mercaptoéthanol puis déposés sur un gel de polyacrylamide + SDS avec un gel de concentration à 5 % d'acrylamide et un gel de séparation à 7,5 % d'acrylamide (159).

L'autoradiogramme de la Figure 27 montre clairement qu'il n'existe pas de différence de masse moléculaire entre les complexes [récepteurs-¹²⁵I-hCG] qu'ils aient été préalablement mis en contact ou pas avec un extrait brut parasitaire.

Cette absence de différence de la masse moléculaire des complexes hormone-récepteur, que l'incubation ait été réalisée en présence ou non de surnageant d'extraction du parasite, infirme donc l'hypothèse de la fixation directe sur le récepteur de la LH d'un composé parasitaire de haut poids moléculaire comme l'AVS.

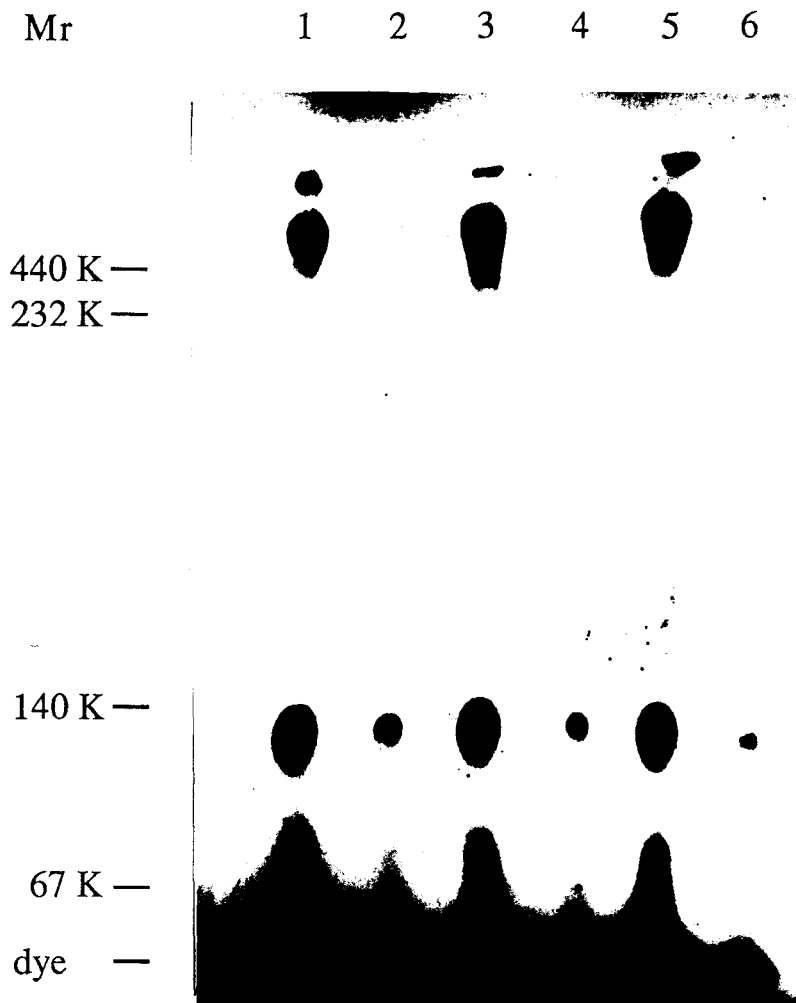


Figure 27 : Autoradiogramme mettant en évidence les complexes hCG* -Récepteur de la LH (masse moléculaire environ 130 kDa).

Ligne 1 : Homogénat testiculaire incubé sans extrait parasitaire

Ligne 2 : Homogénat testiculaire incubé sans extrait parasitaire mais en présence d'un excès d'hCG non marqué.

Ligne 3 : Homogénat testiculaire incubé avec un extrait parasitaire réalisé à partir du variant AnTat 1.8

Ligne 4 : Homogénat testiculaire incubé avec un extrait parasitaire réalisé à partir du variant AnTat 1.8 mais en présence d'un excès d'hCG non marqué.

Ligne 5 : Homogénat testiculaire incubé avec un extrait parasitaire réalisé à partir du variant AnTat 1.1. A

Ligne 6: Homogénat testiculaire incubé avec un extrait parasitaire réalisé à partir du variant AnTat 1.1. A mais en présence d'un excès d'hCG non marqué.

DISCUSSION

L'altération de la fonction gonadique chez le rat mâle au cours de la trypanosomiase est révélée par la diminution des taux sériques de testostérone.

Cette diminution apparaît avoir des origines multiples :

- 1°) - inactivation du récepteur testiculaire de la LH
- 2°) - stress induit par l'infestation
- 3°) - intervention directe du trypanosome (par exemple, inflammation des tissus)
- 4°) - dégradation de médiateurs peptidiques par des enzymes parasitaires
- 5°) - intervention de composés parasitaires de nature non enzymatique

Nos travaux ont montré que la trypanosomiase Africaine induit une altération du fonctionnement gonadique.

L'infestation induit en effet une diminution des taux sériques de testostérone ainsi qu'une inaptitude des testicules à répondre *in vivo* à la stimulation par une gonadotrophine exogène, l'hCG.

Le parasite induit également en l'espace de 3 jours, dans notre "modèle expérimental aigu", une diminution de la quantité des récepteurs testiculaires de la LH ainsi qu'une apparente augmentation de leur affinité.

La diminution du nombre de ces récepteurs n'est pas liée à une simple "down-régulation" exagérée de ceux-ci dans la mesure où cette dernière ne s'accompagne pas d'une modification de leur affinité (136). L'altération du fonctionnement gonadique par le trypanosome apparaît donc résulter de mécanismes multiples.

L'un de ces mécanismes est le stress (86) survenant lors de l'infestation, une des causes de ce stress étant constituée par les perturbations du métabolisme glucidique (hypoglycémie) induites par le parasite.

Nous avons mis en évidence ce stress par l'augmentation des taux sériques de la corticostérone des rats infestés ainsi que par l'élévation transitoire au début de l'infestation des taux de LH et de testostérone plasmatiques comme cela a été rapporté par d'autres équipes (181, 284).

Cependant, le stress, s'il entraîne une désensibilisation partielle des récepteurs de la LH (59), ne provoque pas de modification de leur capacité de fixation ou de leur affinité (232).

Par ailleurs, la prolactine, qui est une hormone sécrétée de façon importante dans les situations de stress, n'est sans doute pas responsable de l'atteinte gonadique car elle augmente la fixation de la LH au niveau testiculaire et n'affecte pas la stéroïdogénèse basale (201, 279) ce qui ne cadre pas avec nos résultats.

Le stress n'est donc pas à lui seul responsable de l'altération du fonctionnement gonadique au cours de la trypanosomiase Africaine.

L'hypofonctionnement gonadique pourrait être aussi le résultat de l'inflammation testiculaire induite par le parasite.

Nous avons démontré dans notre modèle expérimental que l'infestation par *T. b. brucei* induit effectivement un processus inflammatoire objectivé par l'augmentation du taux sérique d' α_2 -macroglobuline (139, 318). L'activation des cellules macrophagiques testiculaires qui en découle entraîne la libération de grandes quantités d'interleukine-1 (IL-1) et de prostaglandine E2 (PGE2) (13) qui sont des composés qui induisent un hypofonctionnement gonadique (51, 117, 213, 259).

Le processus inflammatoire n'est cependant pas une constante des trypanosomioses Africaines. En effet, les trypanosomes strictement circulants comme *T. vivax*, *T. congolense* et *T. simiae* n'induisent pas ou peu de phénomènes inflammatoires à la différence des trypanosomes appartenant au groupe *T. brucei* qui sont capables d'envahir les liquides intersticiels (141).

Ainsi, comme toutes les trypanosomioses africaines induisent un déséquilibre du fonctionnement de l'axe gonadotrope, cela démontre que si le processus inflammatoire peut participer à la survenue de ce déséquilibre, il n'est pas le seul facteur en cause.

Les protéases parasitaires jouent sans doute également un rôle très important dans la survenue des déséquilibres endocriniens observés.

Ces protéases, qui sont libérées dans le sang circulant de l'hôte (133), interviennent vraisemblablement dans le dérèglement du fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique dans la mesure où nous avons montré qu'elles sont capables de dégrader de nombreux peptides biologiques régulateurs, et en particulier le LHRH.

Cet effet dégradatif pourrait expliquer que certaines trypanosomiasés s'accompagnent de troubles gonadiques sans lésions inflammatoires testiculaires ou hypophysaires et permettrait de comprendre l'origine de l'accumulation de LH dans l'hypophyse des rats (130) après 3 jours d'infestation aigüe.

Il faut par ailleurs noter que les activités enzymatiques parasitaires semblent n'avoir pour cible que des structures peptidiques dans la mesure où nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet dégradatif de ces enzymes sur les gonadotrophines elles mêmes (LH humaine, LH de rat, FSH humaine et hCG).

Enfin, certains produits de dégradations peptidiques spécifiquement induits par les protéases parasitaires pourraient également jouer un rôle dans la survenue des désordres gonadiques.

Nous avons ainsi montré que le LHRH¹⁻⁴, peptide original issu de la dégradation du LHRH par les enzymes du trypanosome, est susceptible de perturber le fonctionnement de l'axe gonadotrope suite à l'injection de LHRH.

Un ou des composés parasitaires de nature non enzymatique semblent également jouer un rôle dans les troubles de la stéroïdogénèse gonadique au cours de la trypanosomiase.

Nous avons ainsi montré que l'injection de produits parasitaires préparés en présence d'inhibiteurs de protéases induisent en l'espace de 5 heures une diminution des taux sériques de testostérone chez le rat sain.

L'étude approfondie des effets d'un de ces produits (fraction ayant une affinité par la Concanavalline A = Con A-F2) a révélé que la diminution des taux sériques de testostérone était associée à une augmentation de la LH sérique ce qui laisse supposer la présence d'un ou plusieurs composants qui inhibent la synthèse des androgènes.

Dans la mesure où l'Antigène Variable de Surface (AVS) constitue l'élément quantitativement majeur de la fraction Con A-F2 (42), nous avons recherché un site de fixation spécifique de ce composé sur des homogénats testiculaires.

Nous n'avons ainsi pu mettre en évidence ni récepteur spécifique de l'AVS sur les testicules, ni fixation en général de composé parasite de haute masse moléculaire sur le récepteur de la LH. Enfin, il est apparu que l'AVS, qu'il soit sous forme de monomère ou de dimère, n'entraîne pas de modification de la fixation de l'hCG sur les récepteurs testiculaires de la LH. Il semble donc que la glycoprotéine de surface n'intervienne pas, au moins directement, sur les troubles gonadiques observés.

Notre travail a cependant montré qu'un composé parasite de nature non enzymatique, protège *in vitro* les récepteurs testiculaires de la LH de leur dégradation par les enzymes testiculaires. Cet effet est potentiellement susceptible de perturber *in vivo* la "Down régulation" de ces récepteurs à la surface des cellules de Leydig, ce qui pourrait jouer un rôle dans leur désensibilisation précoce au cours de l'infestation.

Des études *in vitro* sur des cultures de cellules de Leydig isolées pourraient sans aucun doute nous apporter des renseignements intéressants sur l'existence d'un tel mécanisme.

CONCLUSION

Avant que les travaux de notre laboratoire débutent, la description des anomalies gonadiques survenant chez les mammifères atteints de trypanosomiase Africaine était essentiellement histologique, et les rapports faisant état de modification des taux sériques de paramètres endocriniens étaient rares.

La première approche des mécanismes responsables de l'hypogonadisme fut le fait de Hublart et Col. (130) qui indiquaient qu'au moins deux types de composés d'origine parasitaire, de nature enzymatique et non enzymatique, étaient capables d'induire une atteinte fonctionnelle testiculaire en l'espace de 5 heures chez des rats sains ; les mécanismes responsables de cette atteinte apparaissant différents.

Notre travail a donc consisté à approfondir cette étude préliminaire en déterminant la nature des facteurs responsables de l'hypogonadisme ; que ce soit *in vivo*, lors d'une infestation expérimentale de rats mâles et lors de l'injection de composés parasitaires partiellement purifiés à des rats sains ; ou *in vitro*, lors de l'étude de l'effet de produits libérés par le parasite sur des homogénats testiculaires ou des cellules de Leydig en culture.

Nous avons montré que les mécanismes à l'origine de l'hypogonadisme sont nombreux et agissent vraisemblablement à chaque étage de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

Nous avons ainsi pu incriminer le stress provoqué par l'infestation ; les modifications inflammatoires des tissus liées à l'envahissement de ces derniers par les trypanosomes ; des composés parasitaires de nature enzymatique qui sont capables de dégrader des neuropeptides (comme le LHRH) indispensables au bon fonctionnement de l'axe ; et enfin des composés parasitaires de nature non enzymatique dont la cible pourrait être la gonade elle même.

Les études ultérieures devraient permettre d'isoler la/les enzyme(s) responsables de la dégradation du LHRH de manière à en déterminer ultérieurement la structure.

Il conviendra en outre de rechercher l'origine de l'hypersensibilité au LHRH induite *in vivo* par l'injection du térapeptide LHRH¹⁻⁴, composé spécifiquement généré par les enzymes du parasite à partir du LHRH. Dans ce sens, le dosage de la LH sérique au cours d'une répétition de notre expérience d'injection conjointe du térapeptide et du LHRH, apportera certainement des éclaircissements, de même que des études *in vitro* sur des cellules de Leydig ou des cellules gonadotropes en culture.

Enfin, l'évaluation de l'effet sur des cellules de Leydig *in vitro* des fractions parasitaires non enzymatiques Con A-F1 et Con A-F2, toutes deux responsables de l'apparition rapide *in vivo* d'un hypogonadisme chez le rat sain, pourra sans aucun doute apporter des indications précieuses sur le mode d'action/l'identité des éléments constitutifs de ces fractions qui sont responsables de la diminution de la synthèse de testostérone.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abe H., Engler D., Molitch M.E., Bollinger-Gruber J. and Reichlin S. Vasoactive Intestinal Peptide is a physiological mediator of Prolactin release in the rat. *Endocrinology* (1985), 116, 1383-1390.
2. Abou Samra A.B., Loras B., Pugeat M., Tourniaire j. and Bertrand J. Demonstration of an antiglucocorticoid action of progesterone on the corticosterone inhibition of β -endorphin release by rat anterior pituitary in primary culture. *Endocrinology* (1984), 115, 1471-1475.
3. Acker G.R., Molineaux C. and Orlowski M. Synaptosomal membrane-bound form of Endopeptidase-24.15 generates Leu-Enkephalin from Dynorphin₁₋₈, α - and β -Neoendorphin, and Met-Enkephalin from Met-Enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸. *J. Neurochem.* (1987), 48, 284-292.
4. Almenoff J., Wilk S. and Orlowski M. Membrane bound pituitary Metalloendopeptidase: apparent identity to Enkephalinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1981), 102, 206-214.
5. Anosa V.O. and Isoun T.T. Further observations on the testicular pathology in *Trypanosoma vivax* infection of sheep and goats. *Res. Vet. Sci.* (1980), 28, 151-160.
6. Antoni F.A., Hunter E.F.M., Lowry P.J., Noble J.M. and Seckl J.R. Atriopeptin: an endogenous corticotropin-release inhibiting hormone. *Endocrinology* (1992), 130, 1753-1755.

7. Aparecida Cicilini M., Fonseca Ribeiro M.J., De Oliveira E.B., Arruda Mortara R. and De Camargo A.C.M. Endooligopeptidase A activity in rabbit heart: generation of Enkephalin from Enkephalin containing peptides. *Peptides* (1988), 9, 945-955.
8. Aronin N., Coslovsky R. and Leeman S.E. Substance P and Neurotensin: their roles in the regulation of anterior pituitary function. *Ann. Rev. Physiol.* (1986), 48, 537-549.
9. Ascoli M. and Segaloff D.L. On the fates of receptor-bound ovine Luteinizing Hormone and human Chorionic Gonadotropin in cultured Leydig tumor cells. Demonstration of similar rates of internalization. *Endocrinology* (1987), 120, 1161-1172.
10. Ascoli M. Regulation of gonadotropin receptors and gonadotropin responses in a clonal strain of Leydig tumor cells by Epidermal Growth Factor. *J. Biol. Chem.* (1981), 256, 179-183.
11. Ashall F., Angliker H. and Shaw E. Lysis of trypanosomes by peptidyl fluoromethyl ketones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1990), 170, 923-929.
12. Ashall F. Characterisation of an alkaline peptidase of *Trypanosoma cruzi* and other trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1990), 38, 77-88.
13. Askonas B.A. and Bancroft G.J. Interaction of African trypanosomes with the immune system. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* (1984), B307, 41-50.
14. Association Française des professeurs de Parasitologie. *Parasitologie-Mycologie* (1987), 3^{ème} édition, Editions C. et R. 59110 La Madeleine, France.
15. Aten R.F., Williams A.T. and Behrman H.R. Ovarian Gonadotropin-Releasing Hormone-like protein(s): demonstration and characterization. *Endocrinology* (1986), 118, 961-967.

16. Bacsy E., Ivan E., Moi V.D. and Rappay G. Lysosomes in anterior pituitary corticotrophs of the rat. *Histochemistry* (1983), 78, 231-239.
17. Baenziger J.U. and Fiete D. Structural determinants of Concanavalin A specificity for oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* (1979), 254, 2400-2407.
18. Baltz T., Baltz D. and Pautrizel R. Affinité de la Concanavaline A pour *Trypanosoma equiperdum*. Applications à l'isolement de la fraction glycoprotéique spécifique du type antigénique. *Ann. Immunol. (Institut Pasteur)* (1976), 127c, 761-774.
19. Baltz T., baltz D. and Pautrizel R. Affinité de la Concanavaline A pour *Trypanosoma equiperdum*. Applications à l'isolement de la fraction glycoprotéique spécifique du type antigénique. *Ann. Immunol. (Institut Pasteur)* (1976), 127c, 761-774.
20. Barna I., Graf L., Makara G.B. and Rappay G. A serine-proteinase inhibitor (Boc-D-Phe-Pro-Arg-H) inhibits the secretion of Adrenocorticotropin- and β -Endorphin-immunoreactive peptides *in vitro*. *Neuropeptides* (1982), 3, 65-70.
21. Barnes K. and Kenny A.J. Endopeptidase-24.11 in the adenohipophysis of the pig is localized in the gonadotrophic cells. *Peptides* (1988), 9, 55-63.
22. Barrett A.J. and Kirschke H. Cathepsin B, Cathepsin H, and Cathepsin L. *in Methods in Enzymology* (1981), 80, 535-561.
23. Barrett A.J. and Rawlings N.D. Proteinases. Types and families of endopeptidases. *Biochem. Soc. Trans.*, 19, 707-715.
24. Barrett A.J. and Tisljar U. The activities of "Pz-peptidase" and "Endopeptidase 24.15" are due to a single enzyme. *Biochem. J.* (1989), 261, 1047-1050.

25. Bauer K. Adenohypophyseal degradation of Thyrotropin Releasing Hormone regulated by thyroid hormones. *Nature* (1987), 330, 375-377.
26. Bauer K. and Nowak P. Characterization of a Thyroliberin-degrading serum-enzyme catalyzing the hydrolysis of Thyroliberin at the pyroglutamyl-Histidine bond. *Eur. J. Biochem.* (1979), 99, 239-246.
27. Bauer K. and Schulz M. Inactivation of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) by a hormonally regulated ectoenzyme of the anterior pituitary. *Biol. Chem. Hoppe-seyler* (1988), 369, 1195-1217.
28. Berga S.L., Loucks A.B., Rossmann W.G., Kettel L.M., Laughlin G.A. and Yen S.S.C. Acceleration of Luteinizing Hormone pulse frequency in functional hypothalamic amenorrhea by dopaminergic blockade. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1991), 72, 151-156.
29. Bernstein K.E., Martin B.M., Edwards A.S. and Bernstein E.A. Mouse angiotensin-converting enzyme is a protein composed of two homologous domains. *J. Biol. Chem.* (1989), 264, 11945-11951.
30. Bernton E.W., Beach J.E., Holaday J.W., Smallridge R.C. and Fein H.G. Release of multiple hormones by a direct action of Interleukin-1 on pituitary cells. *Science* (1987), 238, 519-521.
31. Berry S.A. and Pescovitz O.H. Identification of a rat GnRH-like substance and its messenger RNA in rat testis. *Endocrinology* (1988), 123, 661-663.

32. Berry S.A. and Pescovitz O.H. Ontogeny and pituitary regulation of testicular growth hormone-releasing hormone-like messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* (1990), 127, 1404-1411.
33. Bhasin S. and Swerdloff R.S. Testicular GnRH-like factors: characterization of biologic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1984), 122, 1071-1075.
34. Birnbaumer L., Shahabi N., Rivier J. and Vale W. Evidence for a physiological role of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) or GnRH-like material in the ovary. *Endocrinology* (1985), 116, 1367-1370.
35. Blank M.S., Fabbri A., Catt K.J. and Dufau M.L. Inhibition of Luteinizing Hormone release by morphine and endogenous opiates in cultured pituitary cells. *Endocrinology* (1986), 118, 2097-2101.
36. Boersma A., Noireau F., Hublart M., Boutignon F., Lemesre J.L., Racadot A. and Degand P. Gonadotropic axis and *Trypanosoma brucei gambiense* infection. *Ann. Soc. belg. Med. trop.* (1989), 69, 127-35.
37. Boly H., Thombiano D., Humblot P. et Thibier M. Influence de *Trypanosoma congolense* sur la fonction sexuelle de taurins Baoulé. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays trop.* (1991), 44 (4), 475-480.
38. Boothroyd J.C. Antigenic variation in African trypanosomes. *Ann. Rev. Microbiol.* (1985), 39, 475-502.
39. Boujrad N., Guillaumin J.M., Bardos P., Hochereau De Reviers M.T., Drosdowsky M.A. and Carreau S. Germ cell-Sertoli cell interactions and production of testosterone by purified Leydig cells from mature rat. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* (1992), 41, 677-681.

40. Boujrad N., Papadopoulos V., Drosowsky M.A. and Carreau S. Rôle d'une protéine Sertolienne purifiée (CMB-21) dans la biosynthèse de testostérone Leydigienne chez le rat immature. *Path. Biol.* (1989), 37 (7), 819-823.
41. Bourguignon J.P., Gérard A. and Franchimont P. Maturation of the hypothalamic control of pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone secretion at onset of puberty: II. Reduced potency of an inhibitory autofeedback. *Endocrinology* (1990), 127, 2884-2890.
42. Boutignon F., Hublart M., Gomes V., Mendonca-Previato, Tetaert D., Huet-Duvillier G. and Degand P. Molecular heterogeneity of the isolated surface glycoprotein variant AnTat 1.1 of *Trypanosoma brucei brucei*. *Biol. Cell* (1988), 64, 131-135.
43. Boutignon F., Huet-Duvillier G., Demeyer D., Richet C. and Degand P. Study of proteolytic activities released by incubation of trypanosomes (*Trypanosoma brucei brucei*) in pH 5.5 and pH 7.0 phosphate/glucose buffers. *Biochim. Biophys. Acta* (1990), 1035, 369-377.
44. Bradbury A.F., Finnie M.D.A. and Smyth D.G. Mechanism of C-terminal amide formation by pituitary enzymes. *Nature* (1982), 298, 686-688.
45. Braden T.D., Farnworth P.G., Burger H.G. and Conn P.M. Regulation of the synthetic rate of Gonadotropin-Releasing Hormone receptors in rat pituitary cell cultures by inhibin. *Endocrinology* (1990), 127, 2387-2392.
46. Browne P. and O'Cuinn G. An evaluation of the role of a pyroglutamyl peptidase, a post-proline cleaving enzyme and a post-proline dipeptidyl amino peptidase, each purified from the soluble fraction of guinea-pig brain, in the degradation of thyroliberin *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* (1983), 137, 75-87.

47. Browning J.Y., D'Agata R. and Grotjan H.E. Isolation of purified rat Leydig cells using continuous Percoll gradients. *Endocrinology* (1981), 109, 667-669.
48. Browning J.Y., D'Agata R., Steinberger A., Grotjan jr H.E. and Steinberger E. Biphasic effect of Gonadotropin-Releasing Hormone and its analog (HOE766) on *in vitro* testosterone production by purified rat Leydig cells. *Endocrinology* (1983), 113, 985-991.
49. Burger H.G. and Igarashi M. Inhibin : definition and nomenclature, including related substances. *Endocrinology* (1988), 122, 1701-1702.
50. Cacicedo L. and Sanchez Franco F. Direct action of opioid peptides and naloxone on gonadotropin secretion by cultured rat anterior pituitary cells. *Life Sciences* (1986), 38, 617-625.
51. Calkins J.H., Sigel M.M., Nankin H.R. and Lin T. Interleukin-1 inhibits Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Endocrinology* (1988), 123, 1605-1610.
52. Calvo J.J., Burnet P.W.J., Gonzalez R., Ghatel M.A. and Bloom S.R. The effect of ACTH on pituitary VIP and Galanin secretion. *J. Endocrinol.* (1989), 121(supplement), 141.
53. Camargo A.C.M., Oliveira E.B., Toffoletto O., Metters K.M. and Rossier J. Brain Endo-Oligopeptidase A, a putative Enkephalin converting enzyme. *J. Neurochem.* (1987), 48, 1258-1263.
54. Carreau S. and Drosdowsky M.A. La fonction Leydigienne : incidence des facteurs du tube séminifère. *Contracept. Fertil. sex.* (1991), 19 (11), 959-967.
55. Carreau S., Papadopoulos V. and Drosdowsky M.A. Régulation paracrine de l'aromatase Leydigienne chez le rat : évolution avec l'âge. *Path. Biol.* (1988), 36 (8), 1002-1006.

56. Carreau S., Papadopoulos V. and Drosdowsky M.A. Stimulation of adult rat Leydig cell aromatase activity by a Sertoli cell factor. *Endocrinology* (1988), 122, 1103-1109.
57. Catt K.J., Harwood J.P., Clayton R.N., Davies J.F., Chan V., Katikineni M., Nozu K. and Dufau M.L. Regulation of peptide hormone receptors and gonadal steroidogenesis. *Rec. Prog. Horm. Res.* (1980), 36, 557-622.
58. Chai S.Y., Mendelsohn F.A.O. and Paxinos G. Angiotensin Converting Enzyme in rat brain visualized by quantitative *in vitro* autoradiography. *Neuroscience* (1987), 20, 615-627.
59. Charpenet G., Tache Y., Forest M.G., Haour F., Saez J.M., Bernier M., Ducharme J.R. and Collu R. Effects of chronic intermittent immobilization stress on rat testicular androgenic function. *Endocrinology*.(1981), 109, 1254-8.
60. Cheng C.Y., Morris P.L., Zwain I., Papadopoulos V., Carreau S., Drosdowsky M.A. and Bardin C.W. A Leydig cell stimulator from Sertoli cells. *In Sexual precocity : aetiology, diagnostic and management*. Raven Press (1992), sous presse.
61. Chiwakata C., Brackmann B., Hunt N., Davidoff M., Schulze W. and Ivell R. Tachykinin (substance-P) gene expression in Leydig cells of the human and mouse testis. *Endocrinology* (1991), 128, 2441-2448.
62. Choi H.S., Lesser M., Cardozo C. and Orłowski M. Immunohistochemical localization of Endopeptidase 24.15 in rat trachea, lung tissue, and alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*(1990), 3, 619-624.

63. Chu T.G. and Orlowski M. Soluble metalloendopeptidase from rat brain: action on Enkephalin-containing peptides and other bioactive peptides. *Endocrinology* (1985), 116, 1418-1425.
64. Cigorraga S.B., Sorrell S., Bator J., Catt K.J. and Dufau M.L. Estrogen dependence of a gonadotropin-induced steroidogenic lesion in rat testicular Leydig cells. *J. Clin. Invest.* (1980), 65, 699-705.
65. Clarke I.J., Horton R.J.E. and Doughton B.W. Investigation of the mechanism by which insulin-induced hypoglycemia decreases Luteinizing Hormone secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* (1990), 127, 1470-1476.
66. Clayton R.N., Katikineni M., Chan V., Dufau M.L. and Catt K.J. Direct inhibition of testicular function by gonadotropin-releasing hormone: mediation by specific gonadotropin-releasing hormone receptors in interstitial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1980), 77, 4459-4463.
67. Clayton R. N. Gonadotrophin-releasing hormone : its actions and receptors. *J. Endocrinol.* (1989), 120, 11-19.
68. Conne B.S., Scaglioni S., Lang U., Sizonenko P.C. and Aubert M.L. Pituitary receptors sites for Gonadotropin-Releasing Hormone: effect of castration and substitutive therapy with sex steroids in the male rat. *Endocrinology* (1982), 110, 70-79.
69. Conn P.M. and Venter J.C. Radiation inactivation (target size analysis) of the Gonadotropin-Releasing Hormone receptor: evidence for a high molecular weight complex. *Endocrinology* (1985), 116, 1324-1326.

70. Conn P. M., Staley D., Harris C., Andrews W. V., Gorospe W. C., McArdle C. A., Huckle W. R. and Hansen J. Mechanism of action of gonadotropin releasing hormone. *Ann. Rev. Physiol.* (1986), 48, 495-513.
71. Conn P. M. The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone action. *Endocrine Reviews* (1986), 7, 3-11.
72. Coslovsky R., Evans R.W., Leeman S.E., Braverman L.E. and Aronin N. The effects of gonadal steroids on the content of Substance P in the rat anterior pituitary. *Endocrinology* (1984), 115, 2285-2289.
73. Counis R. and Jutisz M. Regulation of pituitary gonadotropin gene expression. Outline of intracellular signaling pathways. *Trends Endocrinol. Metab.* (1991), 2, 181-187.
74. Cross G.A.M. Identification, purification and properties of clone specific glycoproteins antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* (1975), 71, 393-417.
75. Crowley W.R., Hassid A. and Kalra S.P. Neuropeptide Y enhances the release of Luteinizing Hormone (LH) induced by LH-Releasing Hormone. *Endocrinology* (1987), 120, 941-945.
76. Culler M.D. and Negro-Vilar A. Evidence that pulsatile Follicle-Stimulating Hormone secretion is independent of endogenous Luteinizing Hormone-Releasing Hormone. *Endocrinology* (1986), 118, 609-612.
77. Culler M.D. In vivo evidence that inhibin is a gonadotropin surge-inhibiting/attenuating factor. *Endocrinology* (1992), 131, 1556-1558.

78. Danzo B.J. and Bell B.W. The microheterogeneity of androgen-binding protein in rat serum and epididymis is due to differences in glycosylation of their subunits. *J. Biol. Chem.* (1987), 263, 2402-2408.
79. Danzo B. J., Pavlou S. N. and Anthony H. L. Hormonal regulation of Androgen-Binding protein in the rat. *Endocrinology* (1990), 127, 2829-2838.
80. Demoulin A. et Franchimont P. Regulation paracrine des fonctions testiculaires. *Acta Urologica Belgica* (1989), 57, 47-58.
81. De Kretser D.M. Germ cell-Sertoli cell interactions. *Reprod. Fertil. Dev.*(1990), 2, 225-35.
82. Dewinter J.P., Vanderstichele H.M.J., Timmerman M.A., Blok L.J., Themmen A.P.N. and Dejong F.H. Activin is produced by rat Sertoli cells *in vitro* and can act as an autocrine regulator of Sertoli cell function. *Endocrinology* (1993), 132, 975-982.
83. Dix C.J., Schumacher M. and Cooke B.A. Desensitization of tumour Leydig cells by Lutropin: evidence for uncoupling of the Lutropin receptor from the guanine nucleotide-binding protein. *Biochem. J.* (1982), 202, 739-745.
84. Donoso A.O., Lopez F.J. and Negro-Vilar A. Cross-talk between excitatory and inhibitory amino acids in the regulation of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone secretion. *Endocrinology* (1992), 131, 1559-1561.
85. Drummond A.E., Risbridger G.P. and de Kretser D.M. The involvement of Leydig cells in the regulation of inhibin secretion by the testis. *Endocrinology* (1989), 125, 510-515.
86. Dufau M.L., Tinajero J.C. and Fabbri A. Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. *FASEB J.* (1993), 7, 299-307.

87. Dutlow C.M. and Millar R.P. Rat testis immunoreactive LH-RH differs structurally from hypothalamic LH-RH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1981), 101, 486-494.
88. Dyer R.G. and Robinson J. E. The LHRH pulse generator. *J. Endocrinol.* (1989), 123, 1-2.
89. Eakin A.E., Bouvier J., Sakanari J.A., Craik C.S. and McKerrow J.H. Amplification and sequencing of genomic DNA fragments encoding cysteine proteases from protozoan parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1990), 39, 1-8.
90. Ehlers M.R., Fox E.A., Strydom D.J. and Riordan J.F. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989), 86, 7741-7745.
91. Eipper B.A. and Mains R.E. The role of ascorbate in the biosynthesis of neuroendocrine peptides. *Am. J. Clin. Nutr.* (1991), 54, 1153S-1156S.
92. Eipper B.A., Mains R.E. and Glembotski C.C. Identification in pituitary tissue of a peptide α -amidation activity that acts on glycine-extended peptides and requires molecular oxygen, copper, and ascorbic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983), 80, 5144-5148.
93. Ekwall H., Jansson A., Sjöberg P. and Plöen L. Differentiation of the rat testis between 20 and 120 days of age. *Arch. Androl.* (1984), 13, 27-36.
94. Emeh J.K. and Nduka E.U. Circulating serum levels of gonadotropins in gambian sleeping sickness. *IRCS Medical* (1983), 11, 411.

95. Engelhardt R.P. Opioides gonadiques et fonction testiculaire. *Ann. Endocrinol.* (1989), 50, 64-72.
96. Enjalbert A., Sladeczek F., Guillon G., Bertrand P., Shu C., Epelbaum J., Garcia-Sainz A., Jard S., Lombard C., Kordon C. and Bockaert J. Angiotensin II and dopamin modulate both cAMP and inositol phosphate productions in anterior pituitary cells. *J. Biol. Chem.* (1986), 261, 4071-4075.
97. Eskeland N.L., Lugo D.I., Pintar J.E. and Schachter B.S. Stimulation of β -endorphin secretion by corticotropin-releasing factor in primary rat Leydig cell cultures. *Endocrinology* (1989), 124, 2914-2919.
98. Eskeland N.L., Molineaux C.J. and Schachter B.S. Regulation of β -endorphin secretion by Corticotropin-Releasing Factor in the intact rat testis. *Endocrinology* (1992), 130, 1173-1179.
99. Euzeby I. *Protozoologie médicale comparée Vol 1. Collection Fondation Marcel Merieux* (1986).
100. Fabbri A., Knox G., Buczko E. and Dufau M.L. β -endorphin production by the fetal Leydig cell: regulation and implications for paracrine control of Sertoli cell function. *Endocrinology* (1988), 122, 749-755.
101. Fabbri A., Tinajero J.C. and Dufau M.L. Corticotropin-Releasing Factor is produced by rat Leydig cells and has a major local antireproductive role in the testis. *Endocrinology* (1990), 127, 1541-1543.
102. Fauconnet M. and Rochemont J. A single column amino acid analysis method which resolves hexosamines and several cysteine derivatives. *Anal. Biochem.* (1978), 91, 403-409.

103. Freeman D.A. and Ascoli M. Desensitization to gonadotropins in cultured Leydig tumor cells involves loss of gonadotropin receptors and decreased capacity for steroidogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981), 78, 6309-6313.
104. Fricker L.D., Adelman J.P., Douglass J., Thompson R.C., von-Strandmann R.P. and Hutton J. Isolation and sequence analysis of cDNA for rat carboxypeptidase E (EC 3.4.17.10), a neuropeptide processing enzyme. Mol. Endocrinol. (1989), 3, 666-673.
105. Friker L.D. Neuropeptide biosynthesis: focus on the carboxypeptidase processing enzyme. Trends NeuroSci. (1985), 8, 210-214.
106. Geffroy-Roisne S., Duval J. and Thieulant M.L. Multiple forms of affinity-labeled estrogen receptors in rat distinct pituitary cells. Endocrinology (1992), 131, 1503-1510.
107. Geithövel F., Brabant G., Wickings E.J. and Nieschlag E. Changes in testicular hCG binding and Leydig cell function in rats throughout life. Hormone Res. (1981), 14, 47-55.
108. Gérard N., Syed V., Bardin C.W., Genetet N. and Jégou B. Sertoli cells are the site of interleukin-1 α synthesis in rat testis. Mol. Cell. Endocrinol. (1991), 82, R13-R16.
109. Giffin B.F., McCann P.P., Bitonti A.J. and Bacchi C.J. Polyamine depletion following exposure to DL- α -Difluoromethylornithine both *in vivo* and *in vitro* initiates morphological alterations and mitochondrial activation in a monomorphic strain of *Trypanosoma brucei brucei*. J. Protozool. (1986), 33, 238-243.
110. Giguere V., Lefebvre F.A. and Labrie F. Androgens decrease LHRH binding sites in rat anterior pituitary cells in culture. Endocrinology (1981), 108, 350-352.

111. Griffin L. and Allonby E.W. Disease syndromes in sheep and goats naturally infected with *Trypanosoma congolense*. J. Comp. Path. (1979), 89, 457-464.
112. Griffiths E.C. and McDermott J.R. Biotransformation of neuropeptides. Neuroendocrinology (1984), 39, 573-581.
113. Habberfield A.D., Dix C.J. and Cooke B.A. Evidence for the rapid internalization and recycling of lutropin receptors in rat testis Leydig cells. Biochem. J. (1986), 233, 369-376.
114. Haisenleder D.J., Dalkin A.C., Ortolano G.A., Marshall J.C. and Shupnik M.A. A pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency *in vivo*. Endocrinology (1991), 128, 509-517.
115. Hall F.H. Testicular steroid synthesis: organization and regulation. *in* The Physiology of Reproduction, edited by Knobil E. and Neill J. Raven Press, Ltd, New York (1988), chapter 22, 975-995.
116. Hall M.E., Miley F. and Stewart J.M. The role of enzymatic processing in the biological actions of Substance P. Peptides (1989), 10, 895-901.
117. Haour F., Kouznetzova B., Dray F. and Saez J.M. hCG-induced-prostaglandin E₂ and F_{2α} release in adult rat testis: Role in Leydig cell desensitization to hCG. Life Sci. (1979), 24, 2151-2158.
118. Hatala M.A. and Powers C.A. Dynamics of estrogen induction of glandular kallikrein in the rat anterior pituitary. Biochem. Biophys. Acta (1987), 926, 258-263.

119. Hedger M.P., Robertson D.M., Browne C.A. and de Kretser D.M. The isolation and measurement of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) from the rat testis. *Mol. Cell. Endocrinol.* (1985), 42, 163-174.
120. Hedger M.P., Robertson D.M., Tepe S.J., Browne C.A. and De Kretser D.M. Degradation of Luteinizing Hormone-Releasing hormone (LHRH) and an LHRH agonist by the rat testis. *Mol. Cell. Endocrinol.* (1986), 46, 59-70.
121. Hoffman Y.M., Pee gel H., Sprock M.J.E., Zhang Q.Y. and Menon K.M.J. Evidence that human Chorionic Gonadotropin/Luteinizing Hormone receptor Down-regulation involves decreased levels of receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* (1991), 128, 388-393.
122. Holtzman E.J., Pillay G., Rosenthal T and Yaron A. Aminopeptidase P activity in rat organs and human serum. *Anal. Biochem.* (1987), 162, 476-484.
123. Hooper N.M. Angiotensin converting enzyme: implications from molecular biology for its physiological functions. *Int. J. Biochem.* (1991), 23, 641-647.
124. Horsthemke B. and Bauer K. Substrate specificity of an adenohipophyseal endopeptidase capable of hydrolyzing Luteinizing Hormone-Releasing Hormone: Preferential cleavage of peptide bonds involving the carboxyl terminus of hydrophobic and basic amino acids. *Biochemistry* (1982), 21, 1033-1036.
125. Horsthemke B., Leblanc P., Kordon C., Wattiaux-de Coninck S., Wattiaux R. and Bauer K. Subcellular distribution of particle-bound neutral peptidases capable of hydrolyzing gonadoliberin, thyroliberin, enkephalin and substance P. *Eur. J. Biochem.* (1984), 139, 315-320.

126. Ho T.W.C., Balden E., Chao J. and Walker A.M. Prolactin (PRL) processing by Kallikrein: production of the 21-23.5 PRL-like molecules and interferences about PRL storage in mature secretory granules. *Endocrinology* (1991), 129, 184-192.
127. Hsueh A.J.W., Dufau M.L. and Catt K.J. Gonadotropin-induced regulation of Luteinizing Hormone receptors and desensitization of testicular 3':5'-cyclic AMP and testosterone responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1977), 74, 592-5.
128. Hsueh A.J.W., Dufau M.L. and Catt K.J. Regulation of Luteinizing Hormone receptors in testicular interstitial cells by gonadotropin. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* (1976), 72, 1145-1152.
129. Huang H.F.S., Pogach L.M., Nathan E., Giglio W. and Seebode J.J. Synergistic effects of Follicle-Stimulating Hormone and testosterone on the maintenance of spermiogenesis in hypophysectomized rats: relationship with the Androgen-Binding Protein status. *Endocrinology* (1991), 128, 3152-3161.
130. Hublart M., Tetaert D., Croix D., Boutignon F., Degand P. and Boersma A. Gonadotropic dysfunction produced by *Trypanosoma brucei brucei* in the rat. *Acta Trop.* (1990), 47, 177-84.
131. Huet G., Richet C., Demeyer D., Bisiau H., Soudan B., Tetaert D., Han K.k. and Degand P. Characterization of different proteolytic activities in *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochim. Biophys. Acta* (1992), 1138, 213-221.
132. Huet-Duvillier G., Gomes V., Tetaert D., Mathon P., Boersma A. and Degand P. *Trypanosoma brucei brucei*: variability in the association of some Variant Surface Glycoproteins. *Exp. Parasitol.* (1988), 67, 31-38.

133. Huet G., Richet C., Demeyer D., Bisiau H., Soudan B., Tetaert D., Han K.K. and Degand P. Characterization of different proteolytic activities in *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochim. Biophys. Acta* (1992), 1138, 213-221.
134. Huhtaniemi I.T. and Catt K.J. Differential binding affinities of rat testis Luteinizing Hormone (LH) receptors for human Chorionic Gonadotropin, human LH, and ovine LH. *Endocrinology* (1981), 108, 1931-1938.
135. Huhtaniemi I.T., Katikineni M., Chan V. and Catt K.J. Gonadotropin-induced positive regulation of testicular Luteinizing Hormone receptors. *Endocrinology* (1981), 108, 58-65.
136. Huhtaniemi I.T., Nozu K., Waren D.W., Dufau M.L. and Catt K.J. Acquisition of regulatory mechanisms for gonadotropin receptors and steroidogenesis in the maturing rat testis. *Endocrinology* (1982), 111, 1711-20.
137. Hui K. S. , Laszlo G. and Lajtha A. β -Endorphin inhibits Met-enkephalin breakdown by a brain aminopeptidase: structure-activity relationships. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1982), 105, 1482-1487.
138. Hyde J.F. and Keller B.K. Galanin secretion from anterior pituitary cells *in vitro* is regulated by dopamine, somatostatine, and Thyrotropin-Releasing Hormone. *Endocrinology* (1991), 128, 917-922.
139. Ikawa M. and Shozen Y. Quantification of acute phase proteins in rat serum and in the supernatants of a cultured rat hepatoma cell line and cultured primary hepatocytes by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods* (1990),134, 101-106.
140. Ikede B.O., Elhassan E.and Akpavie S.O. Reproductive disorders in african trypanosomiasis: a review. *Acta Trop.* (1988), 45, 5-10.

141. Ikede B.O. Genital lesions in experimental chronic *Trypanosoma brucei* infection in rams. *Res. Vet. Sci.* (1979), 26, 145-151.
142. Iliff-Sizemore S.A., Ortolano G.A., Haisenleder D.J., Dalkin A.C., Krueger K.A. and Marshall J.C. Testosterone differentially modulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid responses to gonadotropin-releasing hormone pulse amplitude. *Endocrinology* (1990), 127, 2876-2883.
143. Ishikawa H., Nogami H. and Shirasawa N. Novel clonal strains from adult rat anterior pituitary producing S-100 protein. *Nature* (1983), 303, 711-713.
144. Ji I., Slaughter R.G. and Ji T.H. N-linked oligosaccharides are not required for hormone binding of the Lutropin receptor in a Leydig tumor cell line and rat granulosa cells. *Endocrinology* (1990), 127, 494-496.
145. Jonassen J.A., Mullikin-Kilpatrick D., McAdam A. and Leeman S.E. Thyroid hormone status regulates preprotachykinin-A gene expression in male rat anterior pituitary. *Endocrinology* (1987), 121, 1555-1561.
146. Jones P.B.C. and Hsueh A.J.W. Direct inhibitory effect of Gonadotropin-Releasing Hormone upon Luteal Luteinizing Hormone receptor and steroidogenesis in hypophysectomized rats. *Endocrinology* (1980), 107, 1930-1936.
147. Jones P.M., Ghatel M.A., Steel J., O'Halloran D., Gon G., Legon S., Burrin J.M., Leonhardt U., Polak J.M. and Bloom S.R. Evidence for neuropeptide Y synthesis in the rat anterior pituitary and the influence of Thyroid hormone status: comparison with Vasoactive Intestinal Peptide, substance P, and Neurotensin. *Endocrinology* (1989), 125, 334-341.

148. Jones P.M., O'halloran D.J., Ghatei M.A., Domin J. and Bloom S.R. Adrenal hormone regulation of Neuropeptide synthesis in the rat anterior pituitary gland. *J. Endocrinol.* (1990), 124 (supplement), 57.
149. Jones T.H., Brown B.L. and Dobson P.R.M. Paracrine control of anterior pituitary hormone secretion. *J. Endocrinol.* (1990), 127, 5-13.
150. Jones T.H., Price A., Munro D.S. and Cullen D.R. Angiotensin II, a human pituitary paracrine agent in the control of Prolactin and Growth Hormone secretion. *J. Endocrinol.* (1989), 121 (supplement), 145.
151. Jones T.J., Brown B.L. and Dobson P.R.M. Review : Paracrine control of anterior pituitary hormone secretion *J. Endocrinol.* (1990), 127, 5-13.
152. Kaaya G.P. and Oduor-Okelo D. The effects of *Trypanosoma congolense* infection on the testis and epididymis of the goat. *Bull. Anim. Hlth Prod. Afr.* (1980), 28, 1-5.
153. Kaler W.L. and Neaves W.B. The androgen status of aging male rats. *Endocrinology* (1981), 108, 712-719.
154. Kalra P.S., Sahu A., Bonavera J.J. and Kalra S.P. Diverse effects of tachykinins on Luteinizing Hormone release in male rats: mechanism of action. *Endocrinology* (1992), 131, 1195-1201.
155. Kasson B.G. and Hsueh A.J.W. Arginine vasopressin as an intragonadal hormone in Brattleboro rats: presence of a testicular vasopressin-like peptide and functional vasopressin receptors. *Endocrinology* (1986), 118, 23-31.

156. Kaynard A.H. and Spies H.G. Immunoneutralization of Neuropeptide Y suppresses Luteinizing Hormone secretion in rabbits. *Endocrinology* (1991), 128, 2769-2775.
157. Keel B.A. Effects of aging on biologically active pituitary LH in rats. *Arch Androl.* (1988), 20, 203-209.
158. Keene W.E., Petitt M.G., Allen S. and McKerrow J.H. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* (1986), 163, 536-549.
159. Keinänen K.P., Kellokumpu S., Metsikkö M.K. and Rajaniemi H.J. Purification and partial characterization of rat ovarian lutropin receptor. *J. Biol. Chem.* (1987), 262, 7920-7926.
160. Kellokumpu S. and Rajaniemi H. Dissociation of receptor-bound human Chorionic Gonadotropin from rat testicular membranes *in vitro* as a high molecular weight complex and its inhibition by heavy metals and alkylating agents. *Biochim. Biophys. Acta* (1982), 718, 26-34.
161. Kellokumpu S. and Rajaniemi H. Generation of two water-soluble components from particulate receptor-human chorionic gonadotropin complex by endogenous proteolysis of the receptor. *Biochim. Biophys. Acta* (1983), 759, 176-183.
162. Kellokumpu S. and Rajaniemi H. Hormone binding modifies endogenous proteolysis of LH/hCG receptors in rat ovarian plasma membranes. *Mol. Cell. Endocrinol.* (1985), 42, 157-162.
163. Kellokumpu S. and Rajaniemi H. Involvement of plasma membrane enzymes in the proteolytic cleavage of Luteinizing Hormone receptor. *Endocrinology* (1985), 116, 707-714.

164. Kellokumpu S. Different processing of LH/hCG receptors in cultured rat luteal cells and murine Leydig tumour cells (MLTC-1). *Exp. Cell. Res.* (1987), 168, 299-308.
165. Khachaturian H., Sherman T.G., Lloyd R.V., Civelli O., Douglass J., Herbert E., Akil H. and Watson S.J. Pro-dynorphin is endogenous to the anterior pituitary and is co-localized with LH and FSH in the gonadotrophs. *Endocrinology* (1986), 119, 1409-1411.
166. Khan S.A., Teerds K. and Dorrington J. Steroidogenesis-inducing protein promotes deoxyribonucleic acid synthesis in Leydig cells from immature rats. *Endocrinology* (1992), 130, 599-606.
167. Kitahara S., Kotsuji F., Keeping H.S., Oshima H., Troen P. and Winters S.J. Interrelationship between the actions of testosterone and primate Sertoli cell inhibin in the control of gonadotropin secretion by cultured pituitary cells. *Endocrinology* (1991), 128, 710-716.
168. Knowles G., Abebe G. and Black S.J. Detection of parasite peptidase in the plasma of heifers infected with *Trypanosoma congolense*. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1989), 34, 25-34.
169. Knowles G., Black S.J. and Whitelaw D.D. Peptidase in the plasma of mice infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasitology* (1987), 95, 291-300.
170. Kotsuji F., Winters S.J., Attardi B., Keeping H.S., Oshima H. and Troen P. Effects of gonadal steroids on gonadotropin secretion in males: studies with perfused rat pituitary cells. *Endocrinology* (1988), 123, 2683-2689.
171. Kovacs K., Horvath E. and Ezrin C. Anatomy and histology of the normal and abnormal pituitary gland. *in* *Endocrinology* (1989), second edition, volume 1, edited by DeGroot L. J. (W. B. Saunders Company), chapter 22, 264-283.

172. Kühn-Velten N., Bos D., Schermer R. and Staib W. Age-dependence of the rat Leydig cell and Sertoli cell function. *Acta Endocrinol. (Copenh)* (1987), 115, 275-81.
173. LaBella F.S., Geiger J.D. and Glavin G.B. Administered peptides inhibit the degradation of endogenous peptides. The dilemma of distinguishing direct from indirect effects. *Peptides* (1985), 6, 645-660.
174. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* (1970), 227, 680-681.
175. Lanham S.M. and Godfrey D.G. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.* (1970), 28, 521-534.
176. Leblanc P., L'Heritier A., Kordon C., Horsthemke B., Bauer K., Wattiaux-de Coninck S., Dubois F. and Wattiaux R. Characterization of a neutral Endopeptidase localized in the mitochondrial matrix of rat anterior pituitary tissue with GnRH as a substrate. *Neuroendocrinology* (1984), 38, 476-483.
177. Lebouille J.L.M., Burbach J.P.H., De Kloet E.R. and Rommerts F.F.G. γ -endorphin-generating endopeptidase: distribution in body tissues and cellular localization in rat testis. *Endocrinology* (1986), 118, 372-376.
178. Lee L.R., Haisenleder D.J., Marshall J.C. and Smith M.S. Effect of progesterone on pulsatile Luteinizing Hormone (LH) secretion and LH subunit messenger ribonucleic acid during lactation in the rat. *Endocrinology* (1989), 124, 2128-2134.

179. Lee V.W.K., De Kretser D.M., Hudson B. and Wang C. Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. *J. Reprod. Fert.* (1975), 42, 121-26.
180. Lefèvre A., Saez J.M. and Finaz C. hCG responsiveness of purified Leydig cells from immature and mature rats. *Hormone Res.* (1983), 17, 114.
181. Lescoat G., Lescoat D. and Garnier D. Dynamic changes in plasma luteinizing hormone and testosterone after stress in the male rat. Influence of adrenalectomy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* (1984), 62, 1231-3.
182. Liebmann J.E. and Matsumoto A.M. Acute selective withdrawal of testosterone negative feedback increases Luteinizing Hormone secretion without altering hypothalamic catecholaminergic neuronal activity. *Endocrinology* (1990), 126, 555-564.
183. Lincoln D. W. Luteinizing hormone-releasing hormone. Chapter 11 *in* *Endocrinology* (1989), second edition, volume 1, edited by DeGroot L. J. (W. B. Saunders Company), 142-151.
184. Lin T., Blaisdell J. and Haskell J.F. Transforming growth factor- β inhibits Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1987), 146, 387-394.
185. Lin T., Haskell J., Vinson N. and Terracio L. Characterization of insulin-like growth factor I receptors of purified Leydig cells and their role in steroidogenesis in primary culture: a comparative study. *Endocrinology* (1986), 119, 1641-1647.
186. Lin T. Mechanism of action of Gonadotropin-Releasing Hormone stimulated Leydig cell steroidogenesis. III. The role of arachidonic acid and calcium/phospholipid dependent protein kinase. *Life Sci.* (1985), 36, 1255-1264.

187. Lin T., Wang D., Nagpal M.L., Chang W. and Calkins J.H. Down-regulation of Leydig cell Insulin-like Growth Factor-I gene expression by Interleukin-1. *Endocrinology* (1992), 130, 1217-1224.
188. Lonsdale-Eccles J.D. and Grab D.J. Lysosomal and non-lysosomal peptidyl hydrolases of the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei*. *Eur. J. Biochem.* (1987), 169, 467-475.
189. Lonsdale-Eccles J.D. and Grab D.J. Proteases in african trypanosomes. *in* Cysteine proteinases and their inhibitors (Turk, V., ed.) (Walter de Gruyter & Co., Berlin) (1986), 189-197.
190. Lopez F.J., Merchenthaler I., Ching M., Wisniewski M.G. and Negro-Vilar A. Galanin: a hypothalamic -hypophysiotropic hormone modulating reproductive functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991), 88, 4508-4512.
191. Makara I.N., Horvath G., Rappay G., Kurcz M. and Bajusz S. Tripeptide aldehyde protease inhibitors may depress *in vitro* Prolactin and Growth Hormone release. *Endocrinology* (1985), 116, 1426-1432.
192. Makumyaviri A., Mehlitz D., Kageruka P., Kazyumba G.L. et Molisho D. Le réservoir animal de *Trypanosoma brucei gambiense* au Zaïre : Infections trypanosomiennes dans deux foyers du Bas-Zaïre. *Trop. Med. Parasit.* (1989), 40, 258-262.
193. Margioris A.N., Koukoulis G., Grino M. and Chrousos G.P. *In vitro*-perfused rat testes secrete β -endorphin and dynorphin: their effect on testosterone secretion. *Biol. Reprod.* (1989), 40, 776-784.

194. Mather J.P., Saez J.M. and Haour F. Regulation of gonadotropin receptors and steroidogenesis in cultured porcine Leydig cells. *Endocrinology* (1982), 110, 933-940.
195. Mather J.P., Woodruff T.K. and Krummen L.A. Minireview : Paracrine regulation of reproductive function by inhibin and activin. *P.S.E.B.M.* (1992), 201, 1-15.
196. Matsas R., Kenny A.J. and Turner A.J. The metabolism of neuropeptides. The hydrolysis of peptides, including enkephalins, tachykinins and their analogues by endopeptidase-24.11. *Biochem. J.* (1984), 223, 433-440.
197. Matsuba H., Watanabe T., Watanabe M., Ishii Y., Waguri S., Kominami E. and Uchiyama Y.J. Immunocytochemical localization of prorenin, renin, and cathepsins B, H, and L in juxtaglomerular cells of rat kidney. *J. Histochem. Cytochem.* (1989), 37, 1689-1697.
198. Matsumoto A.M. and Bremner W.J. Modulation of pulsatile gonadotropin secretion by testosterone in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1984), 58, 609-614.
199. Matsuzawa T. and Hatsugai M. Effect of age on the activity of rat testicular arginine aminopeptidase. *Experientia* (1983), 39, 388-389.
200. Matsuzawa T., Hatsugai M. and Moriguchi K. Increase of methionine-aminopeptidase activity in hyperplastic Leydig cells of rat cryptorchid testis. *Acta. Eur. Fertil.* (1991), 22, 91-97.
201. Mazzocchi G., Cavallini L., Kasprzak A., Rebuffat P. and Nussdorfer G.G. Effects of prolactin on the morphology and function of rat Leydig cells: short-term versus long-term administration. *Cell Tissue Res.* (1990), 262, 41-46.

202. Mbulamberi D.B. Possible causes leading to an epidemic outbreak of sleeping sickness : facts and hypotheses. *Ann. Soc. Belge Med.Trop.* (1989), 69-suppl. 1, 173-179.
203. McCann S.M. and Krulich L. Role of transmitters in control of anterior pituitary hormone release. *in* *Endocrinology* (1989), second edition, volume 1, edited by DeGroot L. J. (W. B. Saunders Company), chapter 9, 117-130.
204. McDermott J.R., Gibson A.M. and Turner J.D. Involvement of Endopeptidase 24.15 in the inactivation of Bradykinin by rat brain slices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1987), 146, 154-158.
205. McDonald J.K., Lumpkin M.D., Samson W.K. and McCann S. Neuropeptide Y affects secretion of Luteinizing hormone and Growth Hormone in ovariectomized rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985), 82, 561-564.
206. McKerrow J.H. Parasite proteases. *Exp. Parasitol.* (1989), 68, 111-115.
207. McNicol A.M., Smith S., Graham D.I. and Teasdale G.M. Alpha-1-antichymotrypsin in the normal pituitary gland and its tumour. *J. Endocrinol.* (1990), 124 (supplement), 110.
208. Metsikkö M.K., Petäjä-Repo U.E., Lakkakorpi J.T. and Rajaniemi H.J. Structural features of the LH/CG receptor. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* (1990), 122, 545-552.
209. Mock E.J. and Niswender G.D. Differences in the rates of internalization of ¹²⁵I-labeled human Chorionic Gonadotropin, Luteinizing Hormone, and Epidermal Growth Factor by ovine luteal cells. *Endocrinology* (1983), 113, 259-264.

210. Mock E.J., Papkoff H. and Niswender G.D. Internalization of ovine Luteinizing Hormone/human Chorionic Gonadotropin recombinants: differential effects of the α - and β -subunits. *Endocrinology* (1983), 113, 265-269.
211. Moenter S.M., Brand R.M., Midgley A.R. and Karsch F.J. Dynamics of gonadotropin-releasing hormone release during a pulse. *Endocrinology* (1992), 130, 503-510.
212. Moi V.D., Bacsy E., Gaal G. and Rappay G. Lysosomal enzyme activities in hypo- and hypersecretory anterior pituitary cells. *Histochemistry* (1984), 81, 79-85.
213. Molcho J., Eli Y., Zakut H. and Naor Z. Stimulation of prostaglandin E and testosterone production in rat interstitial cells by a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Endocrinology* (1984), 114, 2382-2387.
214. Molineaux C.J., Lasdun A., Michaud C. and Orłowski M. Endopeptidase-24.15 is the primary enzyme that degrades Luteinizing Hormone Releasing Hormone both *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurochem.* (1988), 51, 624-633.
215. Morera A.M., Esposito G., Ghiglieri C., Chauvin M.A., Hartmann D.J. and Benahmed M. Transforming growth factor β_1 inhibits gonadotropin action in cultured porcine Sertoli cells. *Endocrinology* (1992), 130, 831-836.
216. Morris P.L., Vale W.W., Cappel S. and Bardin C.W. Inhibin production by primary Sertoli cell-enriched cultures: regulation by Follicle-Stimulating Hormone, androgens, and Epidermal Growth Factor. *Endocrinology* (1988), 122, 717-725.
217. Mottram J.C., North M.J., Barry J.D. and Coombs G.H. A cysteine proteinase cDNA from *Trypanosoma brucei* predicts an enzyme with an unusual C-terminal extension. *FEBS lett.* (1989), 258, 211-215.

218. Murphy B.E.P. Some studies of the protein-binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein-binding radioassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1967), 27, 973-90.
219. Mutayoba B.M. and Gombe S. Effect of African trypanosomiasis on plasma cortisol and thyroxine concentration in goats. *Res. Vet. Sci.* (1989), 47, 315-318.
220. Mutayoba B.M., Gombe S., Kaaya G.P. and Waindi E.N. Effect of chronic experimental *Trypanosoma congolense* infection on the ovaries, pituitary, thyroid and adrenal glands in female goats. *Res. Vet. Sci.* (1988), 44, 140-146.
221. Mutayoba B.M., Gombe S., Waindi E.N. and Kaaya G.P. Depression of ovarian function and plasma progesterone and estradiol-17 β in female goats chronically infected with *Trypanosoma congolense*. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* (1988), 117, 477-484.
222. Mutayoba B.M., O'hara-Ireri H.B. and Gombe S. Trypanosome-induced depression of plasma thyroxine levels in prepubertal and adult female goats. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* (1988), 119, 21-26.
223. Narasimham S., Wilson J.R., Martin E. and Schachter H. A structural basis for four distinct elution profiles on Concanavalin A-sepharose affinity chromatography of glycopeptides. *Can. J. Biochem.* (1979), 57, 83-96.
224. Nieman R.E., Kelly J.J. and Waskin H.A. Severe african trypanosomiasis with spurious hypoglycemia. *J. Infect. Dis.* (1989), 159, 360-362.
225. North M.J., Mottram J.C. and Coombs G.H. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitology* (1990), 6, 270-275.

226. Nwagwu M., Okenu D.M.N., Olusi T.A. and Molokwu R.I. *Trypanosoma brucei* releases proteases extracellularly. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* (1988), 82, 577.
227. O'Cuinn G., O'Connor B. and Elmore M. Degradation of Thyrotropin-Releasing Hormone by enzymes of brain tissue. *J. Neurochem.* (1990), 54, 1-13.
228. O'Halloran D.J., Jones P.M., Steel J.H., Gon G., Giaid A., Ghatei M.A., Polak J.M. and Bloom S.R. Effect of endocrine manipulation on anterior pituitary galanin in the rat. *Endocrinology* (1990), 127, 467-475.
229. Orawski A.T. and Simmons W.H. Degradation of Bradykinin and its metabolites by rat brain synaptic membranes. *Peptides* (1989), 10, 1063-1073.
230. Orłowski M., Michaud C. and Chu T.G. A soluble metalloendopeptidase from rat brain. Purification of the enzyme and determination of specificity with synthetic and natural peptides. *Eur. J. Biochem.* (1983), 135, 81-88.
231. Orłowski M., Reznik S., Ayala J. and Pierotti A.R. Endopeptidase 24.15 from rat testes. Isolation of the enzyme and its specificity toward synthetic and natural peptides, including Enkephalin-containing peptides. *Biochem. J.* (1989), 261, 951-958.
232. Orr T.E. and Mann D.R. Effects of restraint stress on plasma LH and testosterone concentrations, Leydig cell LH/hCG receptors, and *in vitro* testicular steroidogenesis in adult rats. *Horm. Behav.* (1990), 24, 324-341.
233. Ortmann O., Stojilkovic S.S., Cesnjaj M., Emons G. and Catt K.J. Modulation of cytoplasmic calcium signaling in rat pituitary gonadotrophs by estradiol and progesterone. *Endocrinology* (1992), 131, 1565-1567.

234. Page S.R., Ang V.T.Y., White A. and Jenkins J.S. Oxytocin and adenohipophyseal function in man. *J. Endocrinol.* (1989), 121 (supplement), 37.
235. Pamer E.G., So M. and Davis C.E. Identification of a developmentally regulated cysteine protease of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1989), 33, 24-32.
236. Papadopoulos V., Carreau S., Szerman-Joly E., Drosdowsky M.A., Dehennin L. and Scholler R. Rat testis 17 β -Estradiol: identification by gas chromatography-mass spectrometry and age related cellular distribution. *J. Steroid. Biochem.* (1986), 24, 1211-1216.
237. Papadopoulos V., Carreau S. and Drosdowsky M.A. Effects of seminiferous tubule secreted factor(s) on Leydig cell cyclic AMP production in mature rat Leydig cells. *FEBS lett.* (1986), 202, 74-78.
238. Papadopoulos V., Drosdowsky M.A. and Carreau S. *In vitro* effects of prolactin and dexamethasone on rat Leydig cell aromatase activity. *Andrologia* (1986), 18, 79-83.
239. Penke B., Ferenczi R. and Kowacs K. A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins. *Anal. Biochem.* (1984), 60, 45-50.
240. Perez-Montfort R., Ostoa-Saloma P., Velazquez-Medina L., Montfort I. and Becker I. Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1987), 26, 87-98.
241. Petäjä-Repo U.E. and Rajaniemi H.J. Subunit interaction of human Chorionic Gonadotropin (hCG) with rat ovarian Luteinizing Hormone (LH)/CG receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* (1990), 72, 43-53.

242. Petäjä-Repo U.E., Merz W.E. and Rajaniemi H.J. Significance of the glycan moiety of the rat ovarian Luteinizing Hormone/Chorionic Gonadotropin (CG) receptor and human CG receptor for receptor-hormone interaction. *Endocrinology* (1991), 128, 1209-1217.
243. Rebois R.V. and Fishman P.H. Down-regulation of gonadotropin receptors in a murine Leydig tumor cell line. *J. Biol. Chem.* (1984), 259, 3096-3101.
244. Redding T. W. and Schally A. V. The distribution, half life, and excretion of tritiated luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in rats. *Life Sci.* (1973), 12, 23-32.
245. Reeves P. G. Zinc deficiency and dipeptidyl carboxypeptidase activity. Comparative effects on epididymis and testis of rats. *Biol. Trace Elem. Res.* (1990), 24 (1), 1-11.
246. Riegler G.D. Chronic stress effects on adrenocortical responsiveness in young and aged rats. *Neuroendocrinology* (1973), 11, 1-10.
247. Rivier C. and Vale W. In the rat, interleukin-1 α acts at the level of the brain and the gonads to interfere with gonadotropin and sex steroid secretion. *Endocrinology* (1989), 124, 2105-2109.
248. Robertson C.D., North M.J., Lockwood B.C. and Coombs G.H. Analysis of the proteinases of *Trypanosoma brucei*. *J. Gen. Microbiol.* (1990), 136, 921-925.
249. Roberts K. P., Awoniyi C. A., Santulli R. et Zirkin B. R. Regulation of Sertoli cell transferrin and sulfated glycoprotein-2 messenger ribonucleic acid levels during the restoration of spermatogenesis in the adult hypophysectomized rat. *Endocrinology* (1991), 129, 3417-3423.

250. Rodriguez M.C. and Segaloff D.L. The orientation of the Lutropin/Choriogonadotropin receptor in rat luteal cells as revealed by site-specific antibodies. *Endocrinology* (1990), 127, 674-681.
251. Rogers D.J. and Randolph S.E. Mortality rates and population density of tsetse flies correlated with satellite imagery. *Nature* (1991), 351, 739-741.
252. Roger M., Lahlou N., Couzinet B., Chaussain J.L. et Sholler R. La sous-unité alpha libre des hormones glycoprotéiques : données physiologiques et pathologiques. *J. Steroid Biochem.* (1989), 33 (4B), 763-769.
253. Rökaeus A. Galanin: a newly isolated biologically active neuropeptide. *Trends Neurosci.* (1987), 10, 158-164.
254. Rommerts F.F.G., Molenaar R.D.G. and Van Der Molen H.J. Preparation of isolated Leydig cells. *Methods in Enzymology* (1985), 275-288.
255. Rosenthal P.J., McKerrow J.H., Rasnick D. and Leech J.H. *Plasmodium falciparum*: inhibitors of lysosomal cysteine proteinases inhibit a trophozoite proteinase and block parasite development. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1989), 35, 177-184.
256. Sabatino F.D., Collins P. and McDonald J.K. Neuropeptide-Y stimulation of Luteinizing Hormone Releasing Hormone secretion from the median eminence *in vitro* by estrogen-dependent and extracellular Ca²⁺ -independent mechanisms. *Endocrinology* (1989), 124, 2089-2098.
257. Sacks D.L., Selkirk M., Ogilvie. M. and Askonas B.A. Intrinsic immunosuppressive activity of different trypanosome strains varies with parasite virulence. *Nature* (1980), 283, 476-478.

258. Saint-Pol P., Peyrat J.P., Engelhardt R.P. and Leroy-Martin B. Immunohistochemical localization of enkephalins in adult rat testis: evidence for a gonadotrophin control. *Andrologia* (1986), 18, 485-488.
259. Saksena S.K., Lau I.F. and Bartke A. Prostaglandins A₁ and A₂ decrease testosterone levels in mice and rats. *Endocrinology* (1974), 95, 311-314.
260. Salesse R., Dacheux F., Genty N. and Garnier J. Dual internalization for Lutropin and Choriogonadotropin in porcine Leydig cells in primary culture. *Biol. Cell.* (1989), 66, 297-306.
261. Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1949), 51, 660-672.
262. Seed J.R., Sechelski J. and Hall J.E. Further biochemical characterization of chronic *Trypanosoma brucei gambiense-Microtus montanus* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (1987), 37, 314-319.
263. Sharpe R.M., Fraser H.M., Cooper I. and Rommerts F.F.G. Sertoli-Leydig cell communication via an LHRH-like factor. *Nature* (1981), 290, 785-787.
264. Sheth A.R., Vanage G.R. and Bandivdekar A.H. Evidence for mutually antagonistic actions of Thyroid Releasing Hormone and inhibin at pituitary-gonadal-prostate-spermatzoal axis. *Medical Hypotheses* (1988), 25, 69-75.
265. Shuja S., Sheahan K. and Murnane M.J. Cysteine endopeptidase activity levels in normal human tissues, colorectal adenomas and carcinomas. *Int. J. Cancer* (1991), 49, 341-346.
266. Skinner M.K. Cell-cell interactions in the testis. *Endocr. Rev.* (1991), 12, 45-77.

267. Skinner M.K., Schlitz S.M. and Tananis Anthony C. Regulation of Sertoli cell differentiated function: testicular transferrin and androgen-binding protein expression. *Endocrinology* (1989), 124, 3015-3024.
268. Sojar H.T. and Bahl O.P. Characterization of rat ovarian Lutropin receptor. Role of thiol groups in receptor association. *J. Biol. Chem.* (1989), 264, 2552-2559.
269. Sordoillet C., Chauvin M.A., Hendrick J.C., Franchimont P., Morera A.M. and Benahmed M. Sites of interaction between Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor- β 1 in the control of steroidogenesis in cultured porcine Leydig cells. *Endocrinology* (1992), 130, 1352-1358.
270. Soubrier F., Alhenc-Gelas F., Hubert C., Allegrini J. John M., Tregear G. and Corvol P. Two putative active centers in human Angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988), 85, 9386-9390.
271. Spangelo B.L., Isakson P.C. and MacLeod R.M. Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells is stimulated by increased intracellular adenosine 3', 5'-monophosphate and Vasoactive Intestinal Peptide. *Endocrinology* (1990), 127, 403-409.
272. Steel J.H., Gon G., O'Halloran D.J., Ishikawa H., Bloom S.R. and Polak J.M. Galanin and vasoactive Intestinal Polypeptide are colocalised in specific cell types of rat anterior pituitary and their expression is influenced by oestrogen. *J. Endocrinol.* (1989), 121 (supplement), 205.
273. Steel J.H., Van Noorden S., Ballesta J., Gibson S.J., Ghatei M.A., Leonhardt U., Domin J., Bloom S.R. and Polak J.M. Localization of 7B2, Neuromedin B, and Neuromedin U in

specific cell types of rat, mouse, and human pituitary, in rat hypothalamus, and in 30 human pituitary and extrapituitary tumors. *Endocrinology* (1988), 122, 270-282.

274. Stubbs S.C., Hargreave T.B. and Habib F.K. Localization and characterization of Epidermal Growth Factor receptors on human testicular tissue by biochemical and histochemical techniques. *J. Endocrinol.* (1990), 125, 485-492.
275. Sun X.R., Hedger M.P. and Risbridger G.P. The effect of testicular macrophages and Interleukine-1 on testosterone production by purified adult rat Leydig cells cultured under *in vitro* maintenance conditions. *Endocrinology* (1993), 132, 186-192.
276. Sun Y.T., Wreford N.G., Robertson D.M. and Kretser D.M. Quantitative cytological studies of spermatogenesis in intact and hypophysectomized rats : identification of androgen-dependent stages. *Endocrinology* (1990), 127, 1215-1223.
277. Syed V., Gerard N., Kaipia A., Bardin C.W., Parvinen M. and Jégou B. Identification, ontogeny, and regulation of an Interleukin-6-like factor in the rat seminiferous tubule. *Endocrinology* (1993), 132, 293-299.
278. Tahri-Joutei A., Fillion C., Bedin M., Hugues J.N. and Pointis G. Local control of Leydig cell arginine vasopressin receptor by naloxone. *Mol. Cell. Endocrinol.* (1991), 79, R21-R24.
279. Takase M., Tsutsui K. and Kawashima S. Effects of PRL and FSH on LH binding and number of Leydig cells in hypophysectomized mice. *Endocrinol. Jpn.* (1990), 37, 193-203.
280. Taugner R., Yokota S., Bührle C.P. and Hackenthal E. Cathepsin D coexists with renin in the secretory granules of juxtaglomerular epithelioid cells. *Histochemistry* (1986), 84, 19-22.

281. Tilbrook A.J., de Kretser D.M. and Clarke I.J. Studies on the testicular source of inhibin and its route of secretion in rams : failure of the Leydig cell to secrete inhibin in response to a human chorionic gonadotrophin/LH stimulus. *J. Endocrinol.* (1991), 130, 107-114.
282. Tisljar U. and Barrett A.J. Thiol-dependent metallo-endopeptidase characteristics of Pz-peptidase in rat and rabbit. *Biochem. J.* (1990), 267, 531-533.
283. Toffoletto O., Metters K.M., Oliveira E.B., Camargo A.C.M. and Rossier J. Enkephalin is liberated from metorphamide and dynorphin A₁₋₈ by endo-oligopeptidase A, but not by metalloendopeptidase EC 3.4.24.15. *Biochem. J.* (1988), 252, 35-38.
284. Turpen C., Johnson D.C. and Dunn J.D. Stress-induced gonadotropin and prolactin secretory patterns. *Neuroendocrinology* (1976), 20, 339-51.
285. Uchiyama Y., Nakajima M., Munro D., Watanabe T., Ishii Y., Waguri S., Sato N. and Kominami E. Immunocytochemical localization of Cathepsins B and H in Corticotrophs and Melanotrophs of rat pituitary gland. *J. Histochem. Cytochem.* (1990), 38, 633-639.
286. Uchiyama Y., Nakajima M., Watanabe T., Waguri S., Sato N., Yamamoto M., Hashizume Y. and Kominami E. Immunocytochemical localization of cathepsin B in rat anterior pituitary endocrine cells, with special reference to its co-localization with renin and prorenin in gonadotrophs. *J. Histochem. Cytochem.* (1991), 39, 1199-1205.
287. Uchiyama Y., Watanabe M., Watanabe T., Ishii Y., Matsuba H., Waguri S. and Kominami E. Variations in immunocytochemical localization of Cathepsin B and Thyroxine in follicular cells of the rat thyroid gland and plasma TSH concentrations over 24 hours. *Cell Tissue Res.* (1989), 256, 355-360.

288. Uribe R.M., Joseph-Bravo P., Pasten J., Ponce G., Méndez M., Covarrubias L. and Charli J.L. Some events of Thyrotropin-Releasing Hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinology* (1991), 54, 493-498.
289. Valenca M.M. and Negro-Vilar A. Proopiomelanocortin-derived peptides in testicular interstitial fluid: characterization and changes in secretion after human Chorionic Gonadotropin or Luteinizing Hormone-Releasing Hormone analog treatment. *Endocrinology* (1986), 118, 32-37.
290. Vale W., Vaughan J., Corrigan A., Sawchenko P., Roberts V., Plotsky P., Schubert D., Yu J., Hsueh A., Rivier J. and Rivier C. Diverse roles of the Activin/Inhibin family of hormones and growth factors. *J. Endocrinol.* (1990), 124 (supplement), 4.
291. Van vugt D.A. and Meites J. Influence of endogenous opiates on anterior pituitary function. *Fed. Proc.* (1980), 39, 2533-2538.
292. Vickerman K. and Luckins A.G. Localization of variable antigens in the surface coat of *Trypanosoma brucei* using ferritin conjugated antibody. *Nature* (1969), 224, 1125-1126.
293. Wada K., Yokotani N., Hunter C., Doi K., Wenthold R.J. and Shimasaki S. Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992), 89, 197-201.
294. Waindi E.N., Gombe S. and Oduor-Okelo D. Plasma testosterone in *Trypanosoma congolense*-infected Toggerburg goats. *Arch. Androl.* (1986), 17, 9-17.
295. Wang D., Nagpal M.L., Calkins J.H., Chang W., Sigel M.M. and Lin T. Interleukin-1 β induces interleukin-1 α messenger ribonucleic acid expression in primary cultures of Leydig cells. *Endocrinology* (1991), 129, 2862-2866.

296. Wang H., Segaloff D.L. and Ascoli M. Epidermal growth factor and phorbol esters reduce the levels of the cognate mRNA for the LH/CG receptor. *Endocrinology* (1991), 128, 2651-2653.
297. Wang H., Segaloff D.L. and Ascoli M. Lutropin/Choriogonadotropin down-regulates its receptor by both receptor-mediated endocytosis and a cAMP-dependent reduction in receptor mRNA. *J. Biol. Chem.* (1991), 266, 780-785.
298. Watanabe M., Watanabe T., Ishii Y., Matsuba H., Kimura S., Fujita T., Kominami E., Katunuma N. and Uchiyama Y. Immunocytochemical localization of Cathepsins B, H, and their endogenous inhibitor, Cystatin β , in islet endocrine cells of rat pancreas. *J. Histochem. Cytochem.* (1988), 36, 783-791.
299. Watanabe T., Watanabe M., Ishii Y., Matsuba H., Kimura S., Fujita T., Kominami E., Katunuma N. and Uchiyama Y. An immunocytochemical study on co-localization of Cathepsin B and Atrial Natriuretic Peptides in secretory granules of atrial myoendocrine cells of rat heart. *J. Histochem. Cytochem.* (1989), 37, 347-351.
300. Weiss J., Duca K.A. and Crowley jr W.F. Gonadotropin-Releasing Hormone-induced stimulation and desensitization of free α -subunit secretion mirrors Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone in perfused rat pituitary cells. *Endocrinology* (1990), 127, 2364-2371.
301. Weiss J., Harris P.E., Halvorson L.M., Crowley W.F., jr and Jameson J.L. Dynamic regulation of Follicle-Stimulating Hormone- β messenger ribonucleic acid levels by activin and Gonadotropin-Releasing Hormone in perfused rat pituitary cells. *Endocrinology* (1992), 131, 1403-1408.

302. Welsh T.H. and Hsueh A.J.W. Mechanism of the inhibitory action of Epidermal Growth Factor on testicular androgen biosynthesis *in vitro*. *Endocrinology* (1982), 110, 1498-1506.
303. West A.P. and Cooke B.A. Regulation of the truncation of Luteinizing Hormone receptors at the plasma membrane is different in rat and mouse Leydig cells. *Endocrinology* (1991), 128, 363-370.
304. Widmaier E.P. Glucose homeostasis and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis during development in rats. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab. 22)*.(1990), 259, E601-E613.
305. Wilk S. and Orłowski M. Cation-sensitive neutral endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme. *J. Neurochem.* (1980), 35, 1172-1182.
306. Wilk S. and Orłowski M. Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *J. Neurochem.* (1983), 40, 842-849.
307. Wilk S. Minireview: Prolyl Endopeptidase. *Life Sci.* (1983), 33, 2149-2157.
308. Wilson C.A., Leigh A.J. and Chapman A.J. Gonadotrophin glycosylation and function. *J. Endocrinol.* (1990), 125, 3-14.
309. Wilson S.C., Gladwell R.T. and Cunningham F.J. Differential responses of hypothalamic LHRH-I and -II to castration and gonadal steroid or tamoxifen treatment in cockerels. *J. Endocrinol.* (1990), 125, 139-146.
310. Winters S.J., Ishizaka K., Kitahara S., Troen P and Attardi B. Effects of testosterone on gonadotropin subunit messenger ribonucleic acids in the presence or absence of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* (1992), 130, 726-734.

311. Woodruff T.K., Borree J., Attie K.N., Cox E.T., Rice G.C. and Mather J.P. Stage-specific binding of inhibin and activin to subpopulations of rat germ cells. *Endocrinology* (1992), 130, 871-881.
312. Ying S.Y. Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of Follicle-Stimulating Hormone. *Endocr. Rev.* (1988), 9, 267-293.
313. Yoon D.J., Sklar C. and David R. Presence of immunoreactive Corticotropin-Releasing Factor in rat testis. *Endocrinology* (1988), 122, 759-761.
314. Yoshimoto T., Oyama H., Koriyama N. and Tsuru D. Prolyl endopeptidase from bovine testis: purification, characterization and comparison with the enzymes from other tissues. *Chem. Pharm. Bull. Tokyo* (1988), 36, 1456-1462.
315. Yuan Q.X., Swerdloff R.S. and Bhasin S. Differential regulation of rat luteinizing hormone α - and β - subunits during the stimulatory and down-regulatory phases of gonadotropin-releasing hormone action. *Endocrinology* (1988), 122, 504-510.
316. Yu W.H., Seeburg P.H., Nikolics K. and McCann S.M. Gonadotropin-Releasing Hormone-Associated Peptide exerts a prolactin-inhibiting and weak Gonadotropin-Releasing activity *in vitro*. *Endocrinology* (1988), 123, 390-395.
317. Zor U., Shentzer P., Azrad A., Sairam M.R. and Amsterdam A. Deglycosylated Luteinizing Hormone (LH) prevents desensitization of cyclic adenosine monophosphate response by LH: dissociation between receptor uncoupling and down-regulation. *Endocrinology* (1984), 114, 2143-2147.

318. Zwain I.H., Grima J., Stahler M.S., Saso L., Cailleau J., Verhoeven G., Bardin C.W. and Cheng C.Y. Regulation of Sertoli cell α_2 -macroglobulin and clusterin (SGP-2) secretion by peritubular myoid cells. *Biol. Reprod.* (1993), 48, 180-187.

APPENDICE TECHNIQUE

A) ANIMAUX

Toutes les études expérimentales ont été menées sur des rats *Sprague-Dawley* mâles dont l'âge était différent selon qu'il s'agissait d'études *in vivo* ou d'études *in vitro*.

Pour l'étude de l'effet *in vivo* du trypanosome ou de certains de ses composés sur le fonctionnement gonadique, il était important d'utiliser des animaux dont les taux sériques de testostérone étaient les plus homogènes possibles dans une classe d'âge donnée de façon à mesurer de manière statistiquement convenable (Tests de Student et de Wilcoxon) les variations de ces taux au cours des protocoles expérimentaux.

Il a été décrit que les rats mâles ont une spermatogénèse efficace à partir d'un âge de 50 à 60 jours (93, 179) mais que les taux sériques de testostérone ne sont homogènes dans un groupe d'âge donné qu'à partir de 13 semaines (172).

D'un autre côté, il a été décrit que la fixation de l'hCG sur les récepteurs de la LH des cellules de Leydig testiculaires est comparable depuis l'âge de 90 jours jusqu'à 26 mois (107).

Cependant, notre propre expérience indique que des rats *Sprague-Dawley* considérés "matures" (90 jours) présentent en fait une très grande diversité individuelle de leur taux de testostérone sérique.

De ce fait, de façon à éviter tout problème d'interprétation lors de l'étude des effets de la trypanosomiase sur le fonctionnement de l'axe gonadotrope nous avons choisi d'utiliser pour chaque expérience des rats âgés de 10 mois et pesant de 400 à 600 grammes (IFFA-CREDO, L'arbresle).

En ce qui concerne les études *in vitro* de l'effet du tétrapeptide sur le fonctionnement des cellules de Leydig, les rats utilisés étaient âgés de 90 jours (39) de manière à disposer de cellules de Leydig ayant une réactivité maximale à la stimulation par la LH.

Enfin, avant chaque manipulation, les animaux ont été maintenus 3 par cage avec nourriture et eau à volonté pendant au moins une semaine dans une pièce artificiellement éclairée 12 heures par jour.

B) CONDITIONS D'INFESTATION DES ANIMAUX ET DE PREPARATION DES TRYPANOSOMES

I) PREPARATION DES STABILATS

2 volumes de sang de rats parasités sont repris dans un volume de tampon phosphate (PSG) de pH 8,0 (38 mM Na₂HPO₄, 29 mM NaCl, 83,3 mM glucose) additionné de glycérol dans une proportion 1 : 1 (v/v). L'ensemble est distribué par aliquotes de 0,7 ml et congelé à -80°C par paliers.

II) INOCULATION DES TRYPANOSOMES

Trois clones de trypanosomes ont été utilisés dans nos études : *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1.1 A, AnTat 1.8 et AnTat 1.1 E (Antwerpen Trypanosoma Antigenic Type 1.1 A, 1.8 et 1.1 E) (variants obligeamment fournis par le Pr Vanmeirvenne, Institut de Médecine Tropicale, Anvers, Belgique).

Les deux premiers variants entraînent une trypanosomiase dite aiguë dans la mesure où en l'espace de 4 jours l'infestation est si intense qu'elle provoque la mort de l'animal. A l'inverse, le variant AnTat 1.1 E induit une infestation dite chronique, beaucoup plus modérée que les précédentes, évoluant à l'image du modèle naturel africain par vagues successives de parasitémie au moins au début, et entraînant la mort de l'animal dans un délai d'environ 1 mois.

1°) Souches aiguës (AnTat 1.1 A et AnTat 1.8)

Le stabilat est repris par 0,5 ml de PSG et 0,3 ml sont injectés par voie intrapéritonéale (ip) à une souris *Swiss* mâle. Deux jours plus tard, le sang des souris endormies à l'éther, est récupéré par ponction cardiaque avec une seringue héparinée et ce sang est dilué dans du PSG pour avoir une solution contenant 15-20 x 10⁶ trypanosomes/ml.

Pour la réalisation des préparatifs (préparations de matériels parasites) et les modèles expérimentaux d'infestation aiguë permettant le suivi des paramètres endocriniens, 5 ml de cette solution sont injectés en 2 fois à chaque rat par voie intrapéritonéale.

2°) Souche chronique (AnTat 1.1 E)

Le stabilat est utilisé directement et dilué dans le PSG de manière à injecter en sous cutané 100 trypanosomes sous un volume de 1 ml à chaque rat impliqué dans le protocole expérimental.

III) RECUEIL DU SANG DES RATS PARASITES

Pour l'isolement des trypanosomes nécessaires à la production d'un extrait parasite, les rats sont anesthésiés grâce à l'injection par voie ip d'une solution contenant 0,5 ml d'héparine (soit 1250 UI) et 0,6 ml de pentobarbital par animal. Le sang est récupéré par ponction cardiaque dans un bécher placé dans la glace et contenant une solution de PSG (7,5 ml) et d'héparine (0,075 ml) additionnée ou pas de 0,25 ml d'une solution d'inhibiteurs de protéases (TLCK, PMSF et NEM [Sigma] à une concentration de 0,2 mM) par rat.

La solution d'inhibiteurs de protéases est obtenue par dilution du TLCK dans le dioxane, du PMSF dans l'isopropanol et du NEM dans de l'eau.

Pour l'étude des déséquilibres endocriniens consécutifs à la parasitose, quelque soit le mode de sacrifice (décapitation ou anesthésie), le sang sera en règle générale prélevé dans des tubes secs de façon à obtenir les serums correspondants.

IV) PROTOCOLE D'ISOLEMENT DES TRYPANOSOMES : CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE

La DEAE-cellulose (DE-52 Whatman) est équilibrée en tampon PSG. Le mélange sang-solution de recueil est repris dans deux volumes de DEAE-cellulose et déposé sur une colonne contenant cette même DEAE-cellulose.

On réalise une chromatographie par élution de la DEAE-cellulose par du tampon PSG à +4°C et l'éluat est régulièrement contrôlé au microscope en sortie de colonne de façon à apprécier le passage des trypanosomes. L'éluat final est ensuite centrifugé et le culot lavé deux fois par le PSG à +4°C (1500 g, 15 minutes) (175).

V) PREPARATION DU MATERIEL PARASITAIRE "BRUT"

La libération du manteau de surface est réalisée selon le protocole décrit par Baltz et coll (19). Un tampon phosphate 0,125 M de pH 5,5 est additionné de glucose à 1% (p/v) et éventuellement d'une solution d'inhibiteurs de protéases (NEM, TLCK, PMSF) à une concentration finale de 0,2 mM. Dix ml de ce tampon sont utilisés par gramme de culot de parasites et la libération des constituants membranaires est effective après une nuit à +4°C sur agitateur de Kline.

La suspension de parasites dans le tampon de libération est alors centrifugée à 3500 g pendant 15 minutes à +4°C et le surnageant est ensuite soumis à une ultracentrifugation pendant 1 heure à 165 000 g à +4°C de manière à éliminer totalement les débris cellulaires.

Le surnageant est alors dialysé deux fois 30 minutes contre un tampon d'équilibre de pH 8,0 (0,01 M phosphate de sodium, 0,5 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) dans un rapport 1/10 (v/v).

La préparation finale sera désignée par l'expression "surnageant d'extraction de pH 5,5".

VI) PURIFICATION DE L'ANTIGENE VARIABLE DE SURFACE

Cette purification s'effectue à partir du "surnageant d'extraction de pH 5,5" préparé en présence d'inhibiteurs de protéases.

Dans un premier temps, une chromatographie d'affinité sur Concanavale-A Sepharose (Con-A Sepharose) (19) est réalisée à +4°C dans une colonne de verre de 15 cm x 1 cm avec un débit de 10 ml/heure et une détection à 206 nm en continu (cellule LKB 2138 UVICORD). Le tampon d'équilibre de pH 8,0 (décrit en V) permet d'obtenir une fraction non retenue sur la colonne d'affinité (fraction Con A-F1). Une fraction Con A-F2 est ensuite éluée après addition au tampon d'équilibre de méthyl- α -D-mannoside à 10 % (p/v) (50 mM). Les éluats sont par la suite dialysés 1 semaine à + 4°C contre de l'eau distillée puis lyophilisés.

La fraction Con-A F2 est essentiellement constituée par l'Antigène Variable de Surface (AVS) du trypanosome (43).

C) MARQUAGES A L'IODE 125

I) MARQUAGE DE LA GONADOTROPHINE CHORIONIQUE HUMAINE (hCG)

Le marquage à l'iode de l'hCG utilise une méthode à l'iodogène :

1°) Préparation de l'iodogène

Une solution à 1 mg/ml d'iodogène (1,3,4,6-Tetrachloro-3 α ,6 α -diphénylglycouryl, Pierce) est réalisée dans le chloroforme puis distribuée dans des tubes eppendorf de 750 μ l à raison de 100 μ l par tube (soit 100 μ g d'iodogène par tube). On laisse évaporer cette solution pendant une nuit à l'obscurité ce qui permet au catalyseur de se déposer sur les parois des tubes. Les tubes fermés seront ensuite conservés à -20°C jusqu'à une utilisation.

2°) Marquage de l'hCG

10 µg d'hCG (RIA grade hCG, 13000 UI/mg ; Sigma) contenus dans un tampon phosphate 0,1 M de pH 7,2 sous un volume inférieur à 100 µl (environ 80 µl) sont introduits dans l'eppendorf contenant l'iodogène. On ajoute ensuite dans le tube 500 µCi de Na¹²⁵I (5 µl) (Amersham), on agite au vortex, puis on laisse la réaction de marquage se développer pendant 10 minutes dans la glace.

Une chromatographie est ensuite réalisée sur une colonne de 5 à 6 ml de G-25 afin de séparer l'hormone marquée de l'iode libre. Cette colonne est montée dans une seringue de 10 ml préalablement équilibrée avec 1 à 2 volumes d'un tampon d'élution de pH 7,4 (10 mM Tris/HCl, 0,5 g/l BSA, 8g/l NaCl).

Le recueil de l'éluat se fait par fractions de 1 ml dans des tubes contenant 50 µl d'une solution de BSA à 10 % (p/v) dans le tampon d'élution. Le repérage de l'hormone marquée s'effectue par comptage à l'aide d'un compteur γ (1260 Multigamma II counter LKB) de la radioactivité contenue dans 10 µl de chacune des fractions. L'hormone marquée sera ensuite congelée par fractions aliquots à -20°C.

Dans nos conditions, 60 à 70 % de la radioactivité totale apportée dans le mélange réactionnel sera fixée sur la protéine.

II) MARQUAGE DE LA LH DE RAT (rLH)

Ce marquage utilise une méthode à la chloramine T (Merck) (procédure recommandée par le NIDDK).

5 µg de rLH sont repris dans 50 µl d'un tampon PBS de pH 7,4 (0,01 M phosphate de Na, 150 mM NaCl) et mis en contact dans un eppendorf avec 10 µl de Na¹²⁵I (1mCi) et 10 µl d'une solution de chloramine T à 2,5 mg/ml dans ce même tampon PBS. Après agitation pendant 65 secondes dans la glace, la réaction est arrêtée par addition de 50 µl d'une solution de métabisulfite à 2,5 mg/ml dans le tampon PBS puis de 100 µl d'une solution de sucrose et d'iodure de potassium (concentrations respectives 0,16 g/ml et 10 µg/ml). Entre chacune de ces deux dernières additions le mélange réactionnel est homogénéisé quelques secondes au vortex.

L'hormone marquée et l'iode libre sont séparés par chromatographie sur colonne de Sepharose G-75 de 25-30 cm de hauteur pour un diamètre de 1 cm.

Avant utilisation la colonne est "lavée" abondamment par la solution de PBS (plusieurs fois le volume de gel) puis saturée en sérum albumine par dépôt en tête de colonne de 250 µl d'une solution de BSA à 10 % (p/v) dans le tampon PBS et lavage par 1 volume de tampon égal au volume du gel. Le mélange contenant la LH marquée est ensuite déposé sur la colonne et élué par le PBS.

La récupération de l'éluat s'effectue par fractions de 1,5 ml dans des tubes à hémolyse où l'on a préalablement introduit 50 µl d'une solution de BSA à 10 % (p/v) dans le tampon PBS. Cette addition de BSA a pour but d'éviter l'adsorption non spécifique de la LH marquée (LH*) sur les parois du tube de recueil.

III) MARQUAGE DE L'ANTIGENE VARIABLE DE SURFACE (AVS)

La méthode de marquage est une méthode à l'iodogène réalisée dans des conditions comparables à celles utilisées pour le marquage de l'hCG. L'AVS utilisé (10 µg) est constitué par la fraction Con A-F2 obtenue par chromatographie d'affinité sur colonne de Con A-Sepharose d'un "surnageant d'extraction de pH 5,5".

IV) DETERMINATION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE DE L'hCG MARQUEE ET DE SA CAPACITE DE FIXATION SUR LES RECEPTEURS TESTICULAIRES DE LA LH

La concentration en hCG marquée (hCG*) du pic d'éluion de la protéine marquée est appréciée par dosage immunoenzymatique ("Enzymun-Test hCG", Boehringer, dosage réalisé sur automate ES 600). En corrélant la radioactivité totale de la fraction d'éluion et la concentration en protéine, l'activité spécifique peut alors être appréciée (120 à 170 µCi/µg).

A la suite de chaque marquage, la capacité maximale de fixation de l'hCG* sur les récepteurs testiculaires de la LH a été déterminée en mettant en présence le traceur avec un excès de récepteurs comme décrit par Huhtaniemi et col. (136). Cette fixation était de 35 à 45 %.

D) PREPARATION DES TISSUS HYPOPHYSAIRES, CEREBRAUX ET TESTICULAIRES

I) PREPARATION DES HYPOPHYSES DE RATS EN VUE DU DOSAGE DE LA LH HYPOPHYSAIRE

Chaque hypophyse a été pesée puis homogénéisée dans 500 µl d'un tampon phosphate de pH 7,5 [0,01 M Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 0,02 mM Bacitracine, 0,1 % NaN₃ (p/v)]. Après centrifugation à 2500 g pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant a été dilué 200 fois dans ce même tampon phosphate avant d'être congelé à -20°C pour un dosage ultérieur de la rLH.

II) PREPARATION DE LA FRACTION ENZYMATIQUE SOLUBLE DES HOMOGENATS DE CERVEAUX

Les cerveaux de rats infestés ou sains ont été rapidement prélevés après décapitation et homogénéisés dans un Potter-Evelhjem avec 1 ml de tampon PSG par gramme de tissu frais. Après centrifugation à 4°C (18000 x g, 120 min) le surnageant a été à nouveau clarifié par ultracentrifugation (100000 x g, 60 min) de manière à obtenir un extrait enzymatique brut.

III) PREPARATION DES HOMOGENATS DE TESTICULES

A la mort de l'animal, ses 2 testicules sont récupérés et placés dans la glace. Ils sont ensuite décapsulés, pesés puis homogénéisés dans 15 ml d'un tampon 10 mM Tris/HCl de pH 7,4 contenant 2,7 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 0,9 mM CaCl₂, 8g/l NaCl et 0,1 % BSA (p/v) (tampon Tris 1). Cette homogénéisation est réalisée grâce à un Potter Elvehjem avec 3 allers-retours du piston d'une durée d'environ 5 secondes chacun. L'homogénat obtenu est filtré dans un bécher de 50 ml à travers une compresse double-épaisseur. Toutes ces manipulations sont effectuées dans la glace. Le filtrat est additionné d'environ 13 ml du tampon Tris 1 et centrifugé à 25 000 g pendant 20 minutes à 4°C. Les culots sont alors repris par 1 ml du Tampon Tris 1 par gramme de tissu testiculaire initial et on ajoute au mélange 20 % de glycérol (v/v). Après réalisation de fractions aliquots les homogénats H1 obtenus sont conservés à -80°C.

E) DEFINITION DES CONDITIONS DE BINDING DE L'hCG* SUR LES RECEPTEURS TESTICULAIRES DE LA LH

La technique de "binding" est une adaptation de la méthode décrite par Salesse et col. (260). L'homogénat H1, après décongélation, est dilué au quart par le tampon Tris 1 additionné de TLCK, PMSF et NEM à une concentration de 1 mM (tampon Tris 2) ce qui permet d'obtenir l'homogénat de travail H2. Le traceur (hCG*) et le compétiteur (Gonadotrophine Chorionique "Endo"[®], Organon) seront dilués dans ce tampon Tris 2.

Pour ce qui est de l'étude de "binding" par elle-même, 100 µl de l'homogénat H2 sont introduits dans un tube à hémolyse en polystyrène cristal de même que 50 µl de la dilution de l'hormone marquée et 50 µl de tampon Tris 2 seul ou contenant le compétiteur hormonal froid, c'est-à-dire non marqué pour l'étude de la fixation non spécifique de l'hCG* sur l'homogénat (la concentration de ce compétiteur est 1000 supérieure à la concentration maximale d'hCG radiomarquée utilisée au cours de l'expérience).

La concentration finale en inhibiteurs de protéases dans le mélange réactionnel, lorsqu'elles sont utilisées, est de 0,87 mM et chaque dosage est réalisé en dupliquette à moins d'une indication contraire.

Après une incubation de 3 heures à 20°C, chaque tube est lavé par 4 ml de tampon Tris1 glacé puis centrifugé 20 minutes à +4°C à 5000 g. Le surnageant est finalement éliminé par retournement des tubes et la radioactivité fixée sur le culot est mesurée sur un compteur γ .

F) DOSAGE DES PARAMETRES PLASMATIQUES

I) DOSAGE DE LA CORTICOSTERONE

La corticostérone a été dosée par une méthode de compétition décrite par Murphy (218) vis à vis d'une protéine porteuse et dont le coefficient de variation (CV) intra-série est de 5,1 %. Les réactifs sont contenus dans un Kit commercialisé par BioMérieux (³H-Cortisol CPB-Kit). Ce Kit contient une solution de cortisol marqué au tritium [(1,2-³H)-cortisol] ayant une activité spécifique de 10 μ Ci/ml (R1), du sérum lyophilisé de chien qui apporte la protéine porteuse (CBP = Cortisol Binding protein = R2) et un flacon servant à réaliser par dilution dans 350 ml d'eau une solution tampon phosphate de sodium 0,01 M de pH 7,4 et contenant 0,126 M de chlorure de sodium, 0,015 M d'azide de sodium et 1 g/l de sérum albumine bovine (R3 = PBS-BSA).

Le flacon R2 est reconstitué avec 1 ml de R3 (1 flacon/100 tubes) et laissé sans agitation pendant 15 minutes à + 4°C.

Pour 100 tubes également, 0,3 ml de R1 sont dissous dans 105 ml de R3 ce qui donne la solution R4 (compétiteur utilisé pour le dosage).

0,6 ml du réactif R2 reconstitué sont dissous dans 102 ml de R4 ce qui donne le réactif R5 (solution contenant la protéine porteuse et le compétiteur marqué).

Par ailleurs, une suspension de charbon-dextran (187 mg de charbon (Sigma) et 18,7 mg de Dextran T 70 (Pharmacia) dans 30 ml de R3 pour 100 tubes de dosage) est également préparée et sera conservée sous agitation magnétique constante dans un bain d'eau glacée.

Cette étude nécessite également une gamme d'étalonnage (de 0 à 100 $\mu\text{g/l}$) réalisée dans le tampon R3 à partir d'une solution étalon de corticostérone à 10 mg/l).

Les échantillons de sérum de rats sont traités de la manière suivante :

100 μl de sérum sont introduits dans 2 ml d'eau distillée (dilution au 1/21) et homogénéisés au vortex. Les tubes sont ensuite bouchés et chauffés 10 minutes au bain-marie à 70°C de façon à détruire la CBP du rat.

Le protocole de radiocompétition est présenté dans le Tableau 19.

Tubes	Volume des réactifs ajoutés dans chaque tube			
	Solution PBS-BSA (ml)	Solutions étalons de Corticostérone ou Echantillons dilués au 1/21 (ml)	Solution R4 (ml) (compétiteur marqué)	Solution R5 (ml) (CBP et compétiteur marqué)
Activité totale	0,3			1
Activité non spécifique	0,1		1	
Etalon 0 $\mu\text{g/l}$ (B0)	0,1			1
Etalon 1,56 $\mu\text{g/l}$		0,1		1
Etalon 3,12 $\mu\text{g/l}$		0,1		1
Etalon 6,25 $\mu\text{g/l}$		0,1		1
Etalon 12,5 $\mu\text{g/l}$		0,1		1
Etalon 25 $\mu\text{g/l}$		0,1		1
Etalon 50 $\mu\text{g/l}$		0,1		1
Echantillons à doser		0,1		1

Tableau 19 : Protocole de dosage de la corticostérone par compétition vis à vis de la transcortine de chien (CBP) avec du cortisol marqué au tritium.

L'incubation dure 30 minutes au minimum dans un bain d'eau glacé et on sépare la corticostérone libre de la corticostérone liée à la CBP de chien par addition dans chaque tube de 0,2 ml de la suspension glacée de charbon-dextran avec un temps de répartition maximum de 2 minutes.

Dix minutes après l'addition du charbon, les tubes sont mis à centrifuger à 2000 g pendant 10 minutes à une température de +4°C.

On introduit alors 0,5 ml de chaque surnageant dans une fiole de comptage avec 4,5 ml de liquide de scintillation (Aqualyte™, Baker) et le comptage est réalisé pendant 4 minutes (compteur β, Beckman LS 3801).

II) DOSAGE DE LA TESTOSTERONE

Les taux sériques de testostérone ont été mesurés en dupliquette par une méthode RIA dont le coefficient de variation intra-série est de 6,2 % et le seuil de détectabilité de 0,1 ng/ml. Le principe de la technique est une réaction de compétition vis à vis d'une quantité fixe d'anticorps anti-testostérone recouvrants le fond d'un tube, de la testostérone présente dans le sérum et d'une quantité fixe de testostérone marquée à l'iode 125 (¹²⁵I-Testostérone, Coatria, Biomerieux).

Pour le dosage de la testostérone produite *in vitro* par les cellules de Leydig en culture, nous avons utilisé une méthode développée sous la direction du Dr Carreau dans le laboratoire de Biochimie universitaire du CHU de Caen (55) dont les coefficients de variation intra et inter-séries sont respectivement de 3 et 6 % avec un seuil de détection de 4 pg/tube. Il s'agit d'une technique de compétition vis à vis d'un AC anti testostérone (Biomérieux) de la testostérone contenue dans le prélèvement et de testostérone marquée au tritium (80-95 Ci/mmol, Amersham).

Pour réaliser ce dosage il est nécessaire de disposer :

- d'une gamme d'étalonnage (7,8-2000 pg/100 µl) réalisée avec de la testostérone (Sigma) diluée dans un tampon PBS 0,01 M de pH 7,2 contenant 7,4 g/l NaCl et 0,1% BSA.
- d'une solution dans le même PBS de la testostérone marquée (12000 cpm/50 µl)
- d'un mélange charbon activé (Sigma) / Dextran 70.

(94 mg de charbon sont dilués dans 34,9 ml de PBS/BSA et à cette suspension on

ajoute 94 μ l d'une solution de Dextran-70 à 100 mg/ml qui est conservée à +4°C)
 -d'une solution d'Ac (300 μ l d'une solution intermédiaire dans 5,7 ml de PBS/BSA soit une dilution de l'anticorps au 1/10000).

(Solution mère : 1 flacon d'anticorps lyophilisés est repris dans 1 ml d'eau distillée)

(Solution intermédiaire = dilution au 1/500 de la solution mère)

Le protocole de dosage est le suivant :

Dans des tubes en polystyrène cristal on introduit :

Identification du tube	Volume de l'Echantillon (μ l)	Tampon PBS/BSA (μ l)	Dilution de testostérone marquée (μ l)	Dilution de l'anticorps (μ l)
Fixation non spécifique		250	50	
Radioactivité totale		750	50	
Standarts	100	100	50	50
Prélèvements	200		50	50

Les tubes sont alors incubés pendant au minimum 1 h 30 à +4°C et on ajoute ensuite, en moins de 2 minutes et dans chacun de ceux-ci, à l'exception des tubes de "radioactivité totale", 500 μ l de la suspension charbon/dextran qui aura été conservée auparavant sous agitation constante pendant au moins 3 heures à + 4°C.

10 minutes après le premier apport de la suspension de charbon/dextran, les tubes sont centrifugés à 3000 g pendant 15 minutes à + 4°C.

Après la centrifugation, 500 μ l de chacun des surnageants obtenus sera introduit dans une fiole comptage puis mélangé avec 2,5 ml de liquide de scintillation ("Emulsifier safe"-Packard) avant comptage.

III) DOSAGE DE LA rLH (LH DE RAT)

Ce dosage a été réalisé dans le laboratoire des hormones polypeptidiques (CNRS, Gif-sur-Yvette) sous la direction du Dr Berault grâce à des réactifs fournis par le NIH.

La rLH a été déterminée en tripliquettes selon le protocole proposé par le NIDDK par une méthode RIA utilisant un sérum anti-rLH (lapin) (NIDDK-anti-rLH-S-10), un standard de rLH (NIDDK-rLH-RP-3) et de la rLH marquée à l'iode 125 comme décrite ci dessus (NIDDK-rLH-I-9). Ce dosage, dont le coefficient de variation intra-série est de 11,3 %, utilise une réaction de compétition entre la LH contenue dans le prélèvement et une quantité fixe de LH marquée vis à vis d'anticorps anti-LH en défaut.

Le protocole de dosage est le suivant :

L'hormone marquée (activité spécifique : 40-50 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) est diluée dans un tampon phosphate 10 mM de pH 7,4 (PBS-BSA) contenant 150 mM NaCl et 0,05 % BSA (p/v) de façon à obtenir une dilution à 12 000 cpm/100 μl . La gamme étalon est réalisée dans ce même tampon PBS-BSA ainsi que la dilution de l'AC anti rLH (dilution finale dans le tube de 1/180 000).

L'addition dans les tubes des différents réactifs s'effectue selon les données du Tableau 20.

Dans l'ordre, on introduit les échantillons ou étalons, l'anticorps, et enfin l'hormone marquée.

Après mélange au vortex, les tubes sont mis à incuber environ 40 heures en chambre froide à + 4°C.

Après l'incubation, on ajoute dans chaque tube 10 μl de Pansorbin® (protéine A staphylococcique, Calbiochem) qui a été préalablement centrifugée à 4000 g et dont le culot a été remis en suspension dans 11 ml de PBS contenant 0,02 % d'azide de sodium.

Les tubes sont alors agités au vortex et laissés à température ambiante pendant au minimum 2 heures avant d'être lavés par 1 ml de PBS froid.

On réalise alors une centrifugation à 4000 g pendant 30 minutes et le surnageant est éliminé par aspiration.

La radioactivité de chaque culot est mesurée sur un compteur γ (1260 Multigamma II counter LKB).

	Solution PBS-BSA (μ l)	Echantillons ou gamme d'étalonnage (μ l)	Solution d'AC anti rLH (μ l)	Solution de rLH marquée à l'iode 125 (μ l)
Activité totale				100
Activité non spécifique	550			100
Etalon 0 ng/ml	500		50	100
Etalon 0,097 ng/ml		500	50	100
Etalon 0,195 ng/ml		500	50	100
Etalon 0,390 ng/ml		500	50	100
Etalon 0,780 ng/ml		500	50	100
Etalon 1,560 ng/ml		500	50	100
Etalon 3,125 ng/ml		500	50	100
Etalon 6,25 ng/ml		500	50	100
Etalon 12,5 ng/ml		500	50	100
Etalon 25 ng/ml		500	50	100
Echantillons (sérums)	450	50	50	100

Tableau 20 : Protocole de dosage de la LH de rat

IV) DOSAGE DE L' α_2 -MACROGLOBULINE

Le taux d' α_2 -macroglobuline sérique des rats a été mesurée par immunonéphélogométrie sur un Behring Nephelometer-Analyser avec utilisation d'un anticorps (AC) de lapin dirigé contre cette protéine.

Le coefficient de variation inter-séries a été de 6%.

V) DETERMINATION DE LA GLYCEMIE ET DE L'ACTIVITE TRANSAMINASE (TGO ET TGP) DES SERUMS DE RATS

Ces paramètres ont été mesurés sur un automate Hitachi 717 en utilisant respectivement les coffrets réactifs Glucose GOD-PAP kit (Boehringer Diagnostica), Enzyline ASAT/GOT 20 monoréactif et Enzyline ALAT/GPT 20 monoréactif (Biomérieux) avec des coefficients de variation inter-séries respectifs de 2 ; 1,5 et 5,3 %.

Pour la détermination de la glycémie, le recueil du sang a été réalisé sur des tubes Microtainer (Becton Dickinson) contenant un inhibiteur de la glycolyse. Ces tubes ont été immédiatement placés dans la glace après prélèvement puis centrifugés à +4°C. Les plasmas ont ensuite été immédiatement décantés et congelés à -80°C. Toutes ces précautions ont visé à éviter l'apparition d'une fausse hypoglycémie par consommation *in vitro* du glucose par les trypanosomes.

Les activités transaminases ont été mesurées sur des sérums

VI) DOSAGE DES PROTEINES DANS LES EXTRAITS PARASITAIRES

Ce dosage a été réalisé sur un automate Hitachi 717 grâce à un coffret réactif commercialisé par Biotrol pour le dosage des protéines dans les urines et le Liquide Céphalo-Rachidien (LCR). Le principe de l'analyse est le suivant : les protéines forment un complexe coloré avec le rouge de pyrogallol et les ions molybdates en milieu acide. Le complexe formé est coloré en bleu et la densité optique mesurée à 600 nm est proportionnelle à la concentration du milieu en protéines.

VII) MESURE DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DES SERUMS ET DES EXTRAITS PARASITAIRES

Cette mesure a été réalisée contre le substrat Z-Phe-Arg-AMC (Bachem).

Le dosage a été réalisé sur un automate Cobas Fara (Roche) et utilise les réactifs suivants :

-tampon 50 mM MES (Sigma) de pH 7,4 ; solution de substrat à 125 μ M (dans une solution de Brij 35 [Serva] à 0,1 %) ; solution d'EDTA (Sigma) à 30 mM dans le tampon MES ; solution de DTT (Sigma) à 20 mM dans le tampon MES ; solution de E-64 (Sigma) à 35 μ M (5 μ l d'une solution mère à 10 mM dans le DMSO (Merck) dilués dans 1413 μ l de Brij 35 à 0,1 %) ; solution d'AMC (Sigma) (Amino-Méthyl-Coumarine) à 0,25 mM dans le tampon MES.

Le protocole de dosage de l'automate est le suivant :

- 12,5 μ l d'échantillon sont dilués dans
- 220 μ l du tampon MES, et à t = 0 on ajoute au mélange
- 12,5 μ l de la solution d'AMC (qui sert d'étalon interne pour l'appareil) puis
- 22 μ l de la solution de substrat

L'incubation et la lecture cinétique du déroulement de la réaction dans les puits contenant le substrat s'effectue pendant 5 minutes. Le substrat est progressivement dégradé par les enzymes à 37°C avec libération d'AMC qui est un fluorochrome dont la quantité dans le milieu réactionnel est mesurée en continu par fluorimétrie avec une longueur d'onde d'excitation à 340 nm et une longueur d'onde d'émission de 450 nm.

L'activité mesurée est exprimée en mU/l, 1 mU d'activité correspondant à la libération de 1 nano Mole d'Amino-Méthyl-Coumarine par minute.

A t = 5 minutes l'automate ajoute dans le mélange réactionnel :

- 20 μ l de la solution de DTT (réactif qui active les thiol-protéases)

L'appareil fait de nouveau une lecture en cinétique du développement de la réaction pendant 5 minutes puis ajoute dans le mélange :

- 20 μ l de la solution d'EDTA (réactif qui inactive les métallo-protéases)

Une fois encore la réaction est suivie en cinétique pendant 5 minutes, temps au bout duquel est ajouté dans le mélange réactionnel :

- 20 μ l d'E-64 (réactif qui inhibe les thiol-protéases)

La réaction est encore suivie pendant 5 minutes avec appréciation de la vitesse de libération du fluorochrome.

G) CONDITIONS DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP) ET
DE SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ETUDE DE LA DEGRADATION DES
NEUROPEPTIDES PAR LES ENZYMES PARASITAIRES

D) CONDITIONS DE CLHP

La CLHP a été réalisée sur un Varian 5000 avec utilisation d'une colonne C₁₈ Beckman Ultrasphère de granulométrie 5 µm/80 Å (4,6 x 150 mm) munie d'une précolonne remplie de Corasil C₁₈, granulométrie 50 µm (4,6 x 50 mm). Les éluats ont été analysés en continu grâce à un détecteur LKB 2238 Uvicord S II (détection à 206 nm et sensibilité 0,2 pleine échelle).

Les échantillons (contenant 50 µg de peptide initial) ont été injectés sous un volume de 100 µl. Le débit dans la colonne était de 1,5 ml/minute.

Pour les études du LHRH, 2 types de gradient ont été employés : (i) tampon phosphate de triéthyl ammonium 0,05 M pH 3,5 dans l'eau (solvant A) et acétonitrile à 40 % (solvant B) avec le même contre-ion (gradient de 25 à 50 % de B en 30 minutes, conditions recommandées par UCB) ; (ii) eau (solvant A) contenant 0,1 % de TFA comme contre-ion et mélange eau et acétonitrile à 40 % (solvant B) contenant le même contre-ion. Dans ce dernier cas, les conditions de gradient ont été les suivantes : 25 % B pendant 5 minutes ; 25 à 50 % B en 20 minutes puis plateau à 50 % B pendant 10 minutes.

Pour l'étude du TRH, les conditions d'éluion ont été les suivantes : tampon phosphate de triéthyl ammonium 0,05 M pH 3,5 dans l'eau (solvant A) pendant 10 minutes puis 0 à 100 % de B (acétonitrile à 40 %) en 10 minutes pour le lavage de la colonne.

Pour l'étude de la bradykinine, de la substance P et de la neurotensine, l'éluion a été obtenue sur le même type de colonne en utilisant un mélange eau/acétonitrile/TFA (acide trifluoroacétique) à 0,1 % (v/v) avec un gradient adapté pour chaque peptide soit :

- neurotensine : 10 à 30 % d'acétonitrile en 30 minutes
- substance P : 20 à 40 % d'acétonitrile en 30 minutes
- bradykinine : 10 à 25 % d'acétonitrile en 30 minutes.

Tous les solvants utilisés sont de qualité RS pour la CLHP (Farmitalia Carlo Erba) et filtrés à travers une membrane millipore de 0,22 μm avant utilisation.

II) SPECTROMETRIE DE MASSE

La masse moléculaire des peptides ainsi que celle de leurs produits de dégradation a été déterminée par spectrométrie de masse "Fast Atom Bombardment" (FAB-MS). Les fractions recueillies en CLHP ont été lyophilisées puis reprises dans un mélange eau/acide trifluoroacétique (TFA) 0,1% (v/v) à raison de 2 μg pour 1 à 2 μl avant d'être additionnées de 1 μl de liquide de matrice (mélange 1:1 thioglycérol-glycérol contenant 1% de TFA).

La FAB-MS a été réalisée sur un appareil Kratos concept II HH FAB (Xe) (Kratos, Analytical Instruments, Manchester, UK) avec un potentiel d'accélération de 8 KeV.

H) REALISATION DES ELECTROPHORESES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS (174)

I) SOLUTIONS DE TRAVAIL

- Solution mère d'acrylamide : A
 - acrylamide 48 g
 - N-N' méthylène bisacrylamide 1,28 g
 - H₂O désionisée q.s.p. 100 ml
- Solution tampon du gel de séparation : B
 - Tampon 3M Tris/HCl de pH 8,8
- Solution tampon du gel de concentration : C
 - Tampon 1M Tris/HCl de pH 6,8

-Tampon d'électrophorèse :

-Tampon 0,025M Tris/HCl de pH 8,3 contenant 0,192 M glycolle et 0,1 % SDS (p/v).

-Tampons de reprise des échantillons :

-Tampon 0,0625 M Tris/HCl de pH 6,8 contenant du glycérol à 10 % (v/v) et du SDS à 2 % (p/v).

-Tampon 0,0625 M Tris/HCl de pH 6,8 contenant du glycérol à 10 % (v/v), du β -mercaptoéthanol à 5 % (v/v) et du SDS à 2 % (p/v).

II) COMPOSITION DES GELS

L'électrophorèse de l'hCG* après marquage a été réalisée en présence de SDS dans un gel de polyacrylamide (gradient continu 5-30 %) avec un gel de concentration contenant 5 % d'acrylamide (Tableau 21).

L'électrophorèse des complexes hCG*-récepteur de la LH a été réalisée avec le même gel de concentration et un gel de séparation contenant 7,5 % d'acrylamide selon la technique décrite par Keinänen et Col. (159) avec ébullition préalable des échantillons pendant 2 minutes en présence de β -mercaptoéthanol à 4,42 % (v/v) (Tableau 21).

Les standards de masse moléculaire (HMW Sigma) utilisés étaient les suivants : Thyroglobuline (669 kDa), Ferritine (440 kDa), Catalase (232 kDa), Lactate deshydrogénase (140 kDa) et Albumine bovine (67 kDa).

	Solution 5 %	Solution 7,5 %	Solution 30 %	Gel supérieur 5 %
A (ml)	1,4	2,1	8,4	1
B (ml)	1,75	1,75	1,75	--
C (ml)	--	--	--	1,25
SDS 2% (p/v) (ml)	0,7	0,7	0,7	0,5
H ₂ O (ml)	10	9,3	3	7,1
Saccharose (g)	--	--	2,8	--
Riboflavine 0,004% (v/v) (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED (ml)	0,015	0,015	0,01	0,04
Persulfate d'ammonium 10% (p/v) (ml)	0,025	0,025	0,01	0,06

Tableau 21 : Composition des gels d'électrophorèse.

I) DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES

I) ETAPE D'HYDROLYSE ACIDE DU PEPTIDE

L'échantillon (environ 50 à 100 nanomoles) est hydrolysé pendant 24 heures par l'acide chlorhydrique 5,6 N à 110 °C en tube scellé sous vide. L'hydrolysate est ensuite évaporé sous vide à basse température (Evapo Mix Buchler).

II) ANALYSE DES ACIDES AMINES SUR AUTOANALYSEUR

La composition en acides aminés est réalisée sur autoanalyseur Beckman de type 119 CL. Les tampons et le programme retenus (102) 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 : 75 g ninhydrine, 1,5 g chlorure stanneux, 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 al.* (239).

J) PREPARATION DES CELLULES DE LEYDIG

Avant toute manipulation, il convient de préparer un milieu de culture HAM F12/DME (1/1) contenant des antibiotiques (Penicilline [50 U/ml], Streptomycine [50 µg/ml]) et de la fungizone (2,5 µg/ml).

On devra également disposer d'une solution enzymatique de 20 ml congelée par fraction aliquots et contenant :

- de la collagénase/dispase (Boehringer) : 200 mg
- de l'inhibiteur trypsique de soja (Sigma) : 20 mg
- de la désoxyribonucléase I (Sigma) : 4 mg

D) PREPARATION DU "CRUDE"

Le "crude" (préparation brute contenant cellules de Leydig, cellules de Sertoli, cellules péritubulaires et cellules germinales) est préparé de la manière suivante :

Dans un bécher on verse un peu de milieu préchauffé à 37°C, et on pèse l'ensemble.

Les testicules sont alors prélevés, immédiatement introduits dans le bécher, puis pesés.

Ils sont ensuite décapsulés dans le couvercle d'une boîte de Pétri contenant un peu de milieu puis dilacérés délicatement dans du milieu à raison de 2 ml/gramme de testicule.

La préparation enzymatique est alors ajoutée à raison de 1 ml pour 20 ml de milieu ce qui donne une concentration finale de 0,05 % en collagénase/dispase, 0,005 % en inhibiteur trypsique de soja et 0,001 % en désoxyribonucléase. L'ensemble testicules/préparation enzymatique est alors incubé pendant 10 à 15 minutes à 32°C sous agitation lente.

Après digestion, la préparation est répartie dans deux tubes Falcons qui sont complétés à 50 ml par du milieu dépourvu d'enzyme. Chaque tube est délicatement mélangé puis décanté pendant 10 minutes avant de récupérer dans un autre Falcon le surnageant. Cette opération de lavage des culots est répétée 3 à 4 fois et les surnageants sont finalement centrifugés à 150 g pendant 10 minutes à 18°C.

Les culots obtenus sont remis en suspension dans un peu de milieu puis introduits dans un tube, lavés avec 50 ml de milieu, et centrifugés à 150 g pendant 10 minutes à 18°C.

Le surnageant est éliminé en grande partie (on laisse environ 1 ml de milieu sur le culot) et le culot, remis en suspension dans le reste de surnageant, est filtré dans un entonnoir sur 2 couches de toile de nylon à trame de 30 mesh (Scrynel NY 30 HD, BMS, Maurepas France). Le tube est en outre rincé avec 20 à 30 ml de milieu et la suspension obtenue est déposée sur le filtre. Le filtrat est alors récupéré, centrifugé à 150 g pendant 10 minutes et le culot est repris par 2 à 3 ml de milieu en fonction de la quantité de cellules récupérées.

La viabilité des cellules est appréciée par coloration au bleu Trypan, ainsi que le pourcentage des cellules de Leydig qui est mesuré par une réaction mettant en évidence la Δ^5 -3 β -Hydroxystéroïde Déshydrogénase (3 β -HSD) (47).

II) PURIFICATION DES CELLULES DE LEYDIG

La purification s'effectue par centrifugation sur des gradients discontinus (13 couches) de Percoll selon la technique de Lefèvre et col. (180) mais en l'absence de sérum de veau foetal.

La réalisation de ces gradients suit le tableau suivant :

Couches du gradient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Volume de A à utiliser (ml)	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8
Volume de B à utiliser (ml)	8	7,5	7	6,5	6	5,5	5	4,5	4	3,5	3	2,5	2

La solution A correspond au mélange 63 ml de Percoll / 7 ml de HAM F12/DME (1/1) 10 X (Gibco).

La solution B est constituée de 70 ml de HAM F12/DME (1/1) 1 X.

La couche 1 correspond à la couche supérieure du gradient.

Au sommet de chaque gradient on dépose 500 µl de suspension cellulaire correspondant à environ 80×10^6 cellules.

On réalise ensuite une centrifugation à 1100 g pendant 15 minutes à 18°C et on aspire à la trompe à vide les fractions 1 à 6. Les fractions 7 à 10 (qui correspondent aux cellules de Leydig) (238) sont recueillies et complétées à 50 ml par du milieu Ham F12/DME à raison de 3 gradients par tube.

Ces derniers tubes sont alors centrifugés à 150 g pendant 15 minutes à 18°C et les culots, contenant les cellules de Leydig purifiées, récupérés dans un volume minimal de 500 à 1000 µl.

Les cellules sont comptées, et on détermine leur viabilité ainsi que le pourcentage de cellules de Leydig.

III) COMPTAGE DES CELLULES

Après dilution dans du milieu, le comptage des cellules testiculaires s'effectue dans une cellule de Thoma (10 μ l). On compte le nombre **n** de cellules sur 25 petits carrés et le nombre de cellules par ml est donné par la formule suivante : Nombre de cellules par ml = **n** x dilution x 16×10^4

IV) DETERMINATION DE LA VIABILITE DES CELLULES

La viabilité des cellules est mesurée par la coloration au Bleu Trypan, les cellules vivantes restant incolores et les cellules mortes bleues.

Le protocole est le suivant :

10 μ l de suspension cellulaire sont dilués avec 90 μ l de milieu et une goutte de Bleu Trypan (Sigma).

On mélange, puis on laisse agir pendant 3 à 5 minutes à 34°C.

Le dénombrement des cellules vivantes et des cellules mortes est alors réalisé dans une cellule de Thoma.

V) DETERMINATION DE L'ACTIVITE Δ^5 -3 β -HYDROXYSTEROIDE

DESHYDROGENASE

Cette technique a été décrite par Rommerts et Col. (254).

Dans un tube de verre, on pèse : -1 mg de Nicotinamide [Sigma]

-1,5 mg de Nitrobleu de tétrazolium (NBT) [Sigma]

-6 mg de β -Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD) [Sigma]

et ce tube, après avoir été enveloppé de papier aluminium (protection vis à vis de la lumière) est conservé à +4°C.

Pour réaliser la solution réactionnelle, on ajoute au dernier moment dans le tube 10 μ l d'une solution de DeHydroEpiAndrostérone (DHEA) (concentration de cette solution conservée à -20 °C dans l'éthanol : 10mg/ml) et 1 ml de tampon NPB (tampon 0,07 M Na_2HPO_4 de pH 7,2).

30 μ l de suspension cellulaire sont alors dilués dans 300 μ l de la solution réactionnelle et l'ensemble est incubé pendant 45 à 60 minutes à 34°C dans une étuve dont l'atmosphère contient 95% d' O_2 et 5% de CO_2 .

En présence de l'enzyme, le NBT forme un précipité bleu, le formazan. Les cellules bleues sont comptées et la coloration non spécifique est appréciée en utilisant la solution de coloration sans le substrat.

