Dosages enzymatiques effectués sur différentes souches de "Trypanosoma gambiense" (Dutton, 1902)

Autor(en): **Fromentin, H. / Richaud, J. / Dodin, A.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Acta Tropica**

Band (Jahr): **25 (1968)**

Heft 1

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-311527>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Dosages enzymatiques effectués sur différentes souches de *Trypanosoma gambiense* (Dutton, 1902)

Par H. FROMENTIN, J. RICHAUD et A. DODIN

Un caractère bien connu de *Trypanosoma gambiense* est de perdre son pouvoir infectieux dès sa mise en culture, tandis que, conservé sur petit Rongeur par passages mécaniques il garde son infectivité pour le Muridé, mais ne peut plus être cultivé.

Il nous a semblé intéressant, après avoir mis en évidence l'intervention favorable aux Flagellés, des enzymes des hématies (H. FROMENTIN & A. DODIN, 1964) de caractériser le système enzymatique de *T. gambiense*, que celui-ci provienne du sang du Rat ou de culture, et de comparer les résultats obtenus. Une différence peut apparaître, susceptible d'expliquer le comportement différent de la souche selon son mode de conservation *in vivo* ou *in vitro*.

Nous étudions successivement l'activité de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G-6-P-D) :

de la transaminase glutamique pyruvique : TGP

de la transaminase glutamique oxalacétique : TGO

de la déshydrogénase α -hydroxybutyrique (α -HBDH)

et de la déshydrogénase lactique (LDH).

Les souches de *T. gambiense*¹ étudiées sont :

« Eliane » et « Féo » provenant du sang de Rats et de culture ;

« M'Bala Victor », « Yaoundé » et « Huguette » du sang de Rats ;

« Mine » de culture.

Les Trypanosomes sont, soit prélevés sur l'animal à l'acmé de l'infection du 4^e au 6^e jour selon les souches, soit récoltés le 6^e jour de la culture, à la fin de la phase exponentielle.

Ils sont mis en suspension dans la solution de Hanks.

¹ *T. gambiense* « Féo » a été isolé au Nord-Togo par L. LAPEYSSONNIE et J. CAUSSE en 1961 et mis en culture par nous-mêmes en 1962.

T. gambiense « M'Bala Victor » a été isolé à l'Institut Pasteur de Brazzaville en 1953, cette souche est naturellement arséno-résistante.

T. gambiense « Eliane » isolée par M. VAUCEL à Paris 1952.

T. gambiense « Mine » isolée par H. FROMENTIN à Paris 1959.

T. gambiense « Yaoundé » isolée par H. JONCHERE au Cameroun 1934.

T. gambiense « Huguette », lignée artificiellement arséno-résistante. Isolée d'un cas humain d'infection accidentelle, Paris 1957.

Les Trypanosomes sont en suspension dans la solution de Hanks dont 1 ml donne théoriquement 0,01013 g de matière sèche. Après numération les suspensions ont été congelées et décongelées trois fois à -20° C. Elles sont conservées à cette température entre chaque mesure.

Le poids de matière sèche de chaque suspension a été calculé, rapporté à 1 ml de dilution contenant 1.000.000 de Trypanosomes/ml et les quantités d'azote correspondant en ont été déduites.

Nous obtenons les chiffres suivants :

<i>T. gambiense</i> « Eliane »	0,00000595 g d'azote
« Féo »	0,00000865 g d'azote
« M'Bala Victor »	0,00000797 g d'azote

pour 1 ml de suspension contenant 1.000.000 de Trypanosomes.

Les valeurs des activités enzymatiques pour la souche « Mine » ont été établies sur la base des valeurs en azote trouvées pour « Eliane », les quantités de Trypanosomes de la souche « Mine » dont nous disposons ne nous ayant pas permis d'effectuer des dosages. Pour les souches « Yaoundé » et « Huguette » les calculs ont été effectués sur la base de la moyenne des valeurs d'azote trouvée pour les autres souches, soit 0,00000696 g.

Méthodes de dosages

Etudes quantitatives

Les activités enzymatiques mesurées ont été rapportées à la quantité d'azote total obtenue par la méthode de Kjeldahl.

Les valeurs trouvées ont été converties en protéines en utilisant le coefficient de conversion 6,25 le plus employé lorsqu'il s'agit d'un matériel riche en protéines.

Les mesures sont effectuées avec un spectrophotomètre à 340 m μ et les réactifs correspondants².

Les dosages sont pratiqués à 32 $^{\circ}$ C, sur un volume de 0,1 ml d'échantillon rapporté à 3 ml, dans des cuves de 10 mm d'épaisseur.

1 $^{\circ}$ Dosage de l'activité glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G-6-P-D)

Nous avons utilisé le réactif du commerce nommé « G-6-P-D Calsul »².

Sous l'influence de la G-6-P-D, le triphosphopyridine nucléotide (TPN) est transformé en triphosphopyridine nucléotide réduit

² Calbiochem.

(TPNH) tandis que le sel de tétrazolium contenu dans le réactif est transformé en formazan, coloré en rouge violet.

Le TPNH formé au cours de la réaction absorbe la lumière à 340 m μ . La réaction est suivie au spectrophotomètre.

Nous notons la variation de densité optique et nous utilisons l'accroissement moyen de densité optique par minute, mesuré dans l'intervalle de temps où cet accroissement est linéaire.

2° Dosage de l'activité de la transaminase glutamique pyruvique (TGP).

Le principe du dosage repose sur le couplage de 2 réactions enzymatiques aboutissant à la transformation d'un corps absorbant la lumière à 340 m μ en un corps transparent pour cette longueur d'onde. La TGP en présence d' α -céto-glutarate et d'alanine induit la formation de glutamate et de pyruvate.

La déshydrogénase lactique (LDH) en présence de pyruvate et de diphosphopyridine nucléotide réduite (DPNH) induit la formation de lactate et de diphosphopyridine nucléotide (DPN).

Le DPNH absorbe à 340 m μ , le DPN est transparent. La transformation de DPNH en DPN est facilement suivie au spectrophotomètre et de la diminution de la densité optique observée on déduit l'activité TGP.

3° Dosage de l'activité de la transaminase glutamique oxalacétique (TGO)

Le principe du dosage repose sur le couplage de 2 réactions enzymatiques aboutissant à une diminution proportionnelle à la quantité de TGO en réaction, d'un corps absorbant la lumière à la longueur d'onde de 340 m μ , cette diminution de densité optique est suivie au spectrophotomètre.

La TGO, en présence d' α -céto-glutarate et d'aspartate, induit la formation de glutamate et d'oxalacétate.

La déshydrogénase malique, en présence d'oxalacétate et de DPNH, induit la formation de DPN et de malate.

Le DPNH absorbe à 340 m μ alors que le DPN est transparent. On suit la diminution d'absorption au spectrophotomètre et on en déduit l'activité TGO.

4° Dosage de l'activité de la déshydrogénase α -hydroxybutyrique (α -HBDH)

Le principe du dosage repose sur la réaction suivante : l' α -HBDH, en présence d' α -cétobutyrate et de DPNH, induit la réduc-

tion de l' α -cétobutyrate par le DPNH en α -hydroxybutyrate et le DPNH passe alors à l'état de DPN dont la formation est proportionnelle à la teneur en α -HBDH de l'échantillon.

Le DPNH absorbe la lumière à 340 m μ , tandis que le DPN est transparent.

La transformation se suit au spectrophotomètre et de la diminution de la densité optique on déduit l'activité α -HBDH de l'échantillon.

5° Dosage de l'activité de la déshydrogénase lactique (LDH)

Le LDH, en présence de pyruvate et de DPNH induit la réduction du pyruvate en lactate, tandis que le DPNH passe à l'état de DPN dont la quantité formée est proportionnelle à celle de l'échantillon examiné.

Le DPNH absorbe la lumière à 340 m μ tandis que le DPN est transparent. La transformation est suivie au spectrophotomètre. De la diminution de densité optique on déduit l'activité LDH de l'échantillon.

Résultats

1° Activité de la G-6-P-D

Les résultats sont enregistrés dans le tableau n° 1.

TABLEAU 1

Dosage de l'activité G-6-P-D de T. gambiense du Rat ou de culture

Souche	Suspension en millions de Trypan./ml	Trypanosomes	
		de Rats U/mn/g d'azote	de culture
« Eliane »	64	0	//
« Eliane »	32	//	0
« M'Bala Victor »	160	{ 316	//
« M'Bala Victor »	32		{ 237
		Moyenne 276	//
« Féo »	100	{ 116	//
« Féo »	50		{ 93
		Moyenne 104	
« Mine »	46	//	0
« Mine »	39	//	0
« Huguette »	22	{ 155	
« Huguette »	30		{ 190
		Moyenne 171	
« Yaoundé »	31	{ 119	
« Yaoundé »	15		{ 101
		Moyenne 110	

L'activité G-6-P-D est importante pour les souches « M'Bala Victor » et « Huguette », moins marquée pour « Féo » et « Yaoundé » du Rat, négative pour « Eliane » du Rat et pour les 3 cultures.

2° Activité de la transaminase glutamique pyruvique

Les résultats sont indiqués au tableau n° 2.

Une activité importante de la TGP pour chacune des souches étudiées, est notée.

TABLEAU 2

Dosage de l'activité de la transaminase glutamique pyruvique de *T. gambiense* de Rats et de culture

Souche	Suspension en millions de Trypan./ml	Trypanosomes	
		de Rats U/g de N	de culture U/g de N
« Eliane »	64	{ 59,4	//
« Eliane »	32	{ 63,6	//
		Moyenne 61,5	
« Eliane »	32	//	54,2
« M'Bala Victor »	160	{ 52,4	//
« M'Bala Victor »	32	{ 58,4	//
		Moyenne 55,5	
« Féo »	100	{ 25	//
« Féo »	50	{ 30	//
		Moyenne 27,5	
« Féo »	46	//	{ 51,3
« Féo »	80	//	{ 45,5
		Moyenne 48,4	
« Mine »	39	//	{ 57,8
« Mine »	40	//	{ 36,3
		Moyenne 47	
« Huguette »	22	{ 85	
« Huguette »	30	{ 56	
		Moyenne 70	
« Yaoundé »	31	{ 61	
« Yaoundé »	15	{ 76	
		Moyenne 68,5	

3° Activité de la transaminase glutamique oxalacétique

Les résultats sont indiqués dans le tableau n° 3.

On constate que l'activité de la TGO est importante pour chacune des souches étudiées et plus particulièrement pour *T. gambiense* « M'Bala Victor » et « Yaoundé ».

TABLEAU 3

Dosage de l'activité de la transaminase glutamique oxalacétique de T. gambiense de Rats et de culture

Souche	Suspension en millions de Trypan./ml	Trypanosomes	
		de Rats U/g de N	de culture U/g de N
« Eliane »	64	{ 40,7	//
« Eliane »	32	{ 36,3	//
		Moyenne 38,5	
« Eliane »	32	//	{ 70
« Eliane »	60	//	{ 75,8
		Moyenne 72,8	
« M'Bala Victor »	160	{ 111	//
« M'Bala Victor »	32	{ 98,5	//
		Moyenne 104,7	//
« Féo »	100	{ 75	//
« Féo »	50	{ 78,7	//
		Moyenne 76,8	//
« Féo »	46	//	{ 50,2
« Féo »	80	//	{ 45,5
		Moyenne 47,8	
« Mine »	39	//	{ 68,9
« Mine »	40		{ 75,6
		Moyenne 72,2	
« Huguette »	22	{ 40	
« Huguette »	30	{ 54	
		Moyenne 47	
« Yaoundé »	31	{ 103	
« Yaoundé »	15	{ 105	
		Moyenne 104	

4° *Activité de la déshydrogénase α -hydroxybutyrique*

Les résultats sont inscrits sur le tableau n° 4.

Nous constatons que l'activité de l' α -HBDH n'est pas négligeable et que les chiffres obtenus sont voisins, quelle que soit l'origine de la souche, à l'exception d'« Huguette » pour laquelle elle se montre plus importante.

5° *Activité de la déshydrogénase lactique*

Les résultats sont transcrits dans le tableau n° 5.

L'activité de la LDH est sensiblement comparable, quelle que soit l'origine de la souche étudiée.

TABLEAU 4

Activité de l' α -HBDH pour 4 souches de *T. gambiense* provenant du sang de Rats et de culture

Souches	Suspension en millions de Trypan./ml	Trypanosomes	
		de Rats U/g de N	de culture U/g de N
« Eliane »	64	{ 34,2	//
« Eliane »	32	{ 29,6	//
		Moyenne 31,9	//
« Eliane »	32	//	{ 39
« Eliane »	60	//	{ 42
		Moyenne 40,5	//
« M'Bala Victor »	160	{ 39	//
« M'Bala Victor »	50	{ 35,2	//
		Moyenne 37,1	//
« Féo »	100	28,6	//
« Féo »	50	28	//
		Moyenne 28,3	//
« Féo »	46	//	{ 33
« Féo »	80		{ 36
		Moyenne 34,5	
« Mine »	39	//	{ 39
« Mine »	40	//	{ 42
		Moyenne 40,5	
« Huguette »	22	{ 75	
« Huguette »	30	{ 76	
		Moyenne 75,5	
« Yaoundé »	31	{ 41	
« Yaoundé »	15	{ 45	
		Moyenne 43	

Discussion

Les recherches portant sur le matériel enzymatique des Trypanosomes n'en sont encore qu'à leurs débuts. GRANT et al. (1961) a étudié les systèmes enzymatiques de *T. rhodesiense* (Stephens et Fantham, 1910) sur une souche monomorphe du Rat et sur une souche de culture. Les Flagellés étaient homogénéisés par congélation et décongélation. Cet auteur a trouvé des différences nettes entre les 2 formes : les Trypanosomes du sang, qui ne contiennent pas de cytochrome, présentent un système α -glycéro-phosphate-déshydrogénase- α -glycérophosphate oxydase (P. GRANT & J. SARGENT, 1960-1961), tandis que les cultures ont une activité TPNH oxydasique élevée. Les deux formes contiendraient en outre une G-6-P-D spécifique.

TABLEAU 5

Activité de la déshydrogénase lactique pour 4 souches de *T. gambiense* provenant du sang de Rats et de culture

Souches	Suspension en millions de Trypan./ml	Trypanosomes	
		de Rats U/g de N	de culture U/g de N
« Eliane »	64	{ 35	//
« Eliane »	32	{ 31	//
		Moyenne 33	//
« Eliane »	32	//	{ 30
« Eliane »	60	//	{ 32,5
		Moyenne 31,2	
« M'Bala Victor »	160	{ 26	//
« M'Bala Victor »	32	{ 23	//
		Moyenne 24,5	//
« Féo »	100	{ 26,5	//
« Féo »		{ 26	//
		Moyenne 26,25	
« Féo »	80	//	30
« Mine »	39	//	{ 29,5
« Mine »	40	//	{ 27,5
		Moyenne 28,5	
« Huguette »	22	{ 32	
« Huguette »	30	{ 31	
		Moyenne 31,5	
« Yaoundé »	31	{ 22	
« Yaoundé »	15	{ 18,5	
		Moyenne 20	

Signalons que D. LEHMANN (1965 a) a mis en évidence des foyers de phosphatase acide (par une méthode cytochimique) dans le cytoplasme d'une souche sur 4 de *T. rhodesiense*. Cette même souche, après 3 jours de séjour *in vitro* n'était plus infectante pour le Muridé et l'enzyme n'était plus décelé. La phosphatase acide était absente des souches *T. gambiense* du sang de l'animal et de culture. Nous ne pouvons comparer nos résultats, n'ayant pas recherché cet enzyme. Le même auteur (LEHMANN, 1965 b) a vu des déshydrogénases succinique, lactique et malique chez *T. cruzi* (Chagas 1909) et *T. ranarum* (Lancaster 1873) de culture.

En ce qui concerne la LDH, nous avons trouvé des taux remarquablement constants chez *T. gambiense* du Rat ou de culture.

Mais les variations les plus importantes d'activité enzymatique mesurée ont porté sur la G-6-P-D. En effet, tous les Trypanosomes de culture sont dépourvus de cette activité qui est, par contre, présente chez les souches conservées depuis de nombreuses années sur animaux sauf chez « Eliane ».

Nous avons aussi noté une variation des activités transaminasiques dont la plus marquée porte sur la transaminase glutamique oxalacétique : ces variations semblent propres à chaque souche :

— chez « Eliane » de culture, nous trouvons plus de TGO que chez « Eliane » de Rats ;

— pour « Féo », la variation est inversée, nous trouvons plus de TGO avec la souche de Rats qu'avec celle de culture ;

— « Mine » de culture possède un taux de TGO comparable à celui trouvé chez « Eliane » de culture ;

— Enfin, « M'Bala Victor » et « Yaoundé » de Rats possèdent le taux le plus élevé de TGO.

Pour la transaminase glutamique pyruvique, nous trouvons des taux constants, voisins de 60 U : g d'azote pour les trypanosomes du sang de Rats, voisins de 50 U : g d'azote pour les Trypanosomes de culture, excepté chez « Féo » de culture où le taux tombe aux environs de 30.

Nous avons vu que pour la déshydrogénase- α -hydroxybutyrique et pour la déshydrogénase lactique, les taux sont constants et pratiquement identiques pour toutes les souches examinées.

Nous pouvons retenir de ces résultats que *T. gambiense* « Eliane » est dépourvu d'activité G-6-P-D tant en culture que chez le Rat et que les souches de *T. gambiense* « M'Bala Victor » et « Yaoundé » possèdent des activités G-6-P-D élevées par rapport à celles présentées par les autres souches de *Trypanosoma gambiense* étudiées. Or, nous avons signalé que la particularité biologique de ces deux souches est l'arséno-résistance, naturelle pour « M'Bala Victor », artificielle pour « Huguette ».

Dans l'état actuel de nos recherches, et étant donné le petit nombre de souches examinées, il ne nous est évidemment pas possible d'affirmer qu'il y ait corrélation entre l'arséno-résistance et l'activité G-6-P-D.

Ajoutons que lorsque nous comparons les valeurs moyennes des résultats obtenus avec des Trypanosomes du sang de Rats et des Trypanosomes de culture, nous constatons que l'activité enzymatique des premiers est supérieure à celle des seconds en ce qui concerne les transaminases glutamique oxalacétiques et glutamique pyruviques, la glucose-6-phosphate-déshydrogénase et les déshydrogénase- α -hydroxybutyrique ;

seule l'activité de la déshydrogénase lactique est légèrement supérieure chez les souches de culture.

Littérature

- FROMENTIN, H. & DODIN, A. (1964). Culture de *Trypanosoma gambiense* en milieu semi-synthétique. Rôle de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase. — C. R. Acad. Sci. (Paris) 259, 1599-1601
- GRANT, P. & SARGENT, J. (1960). Properties of L- α -glycerophosphate oxidase and its role in the respiration of *Trypanosoma rhodesiense*. — Biochem. J. 76, 229-237
- GRANT, P. T., SARGENT, J. R. & RYLEY, J. F. (1961). Respiratory systems in the Trypanosomidae. — Biochem. J. 81, 200-206
- GRANT, P. T. & SARGENT, J. R. (1961). L- α -glycerophosphate dehydrogenase, a component of an oxidase system in *Trypanosoma rhodesiense*. — Biochem. J. 81, 206-214
- LEHMANN, D. L. (1965 a). Enzyme content and its possible relation to infectivity of African trypanosomes. — Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. 59, 297-299
- LEHMANN, D. L. (1965 b). Some dehydrogenases from five species of South American *Trypanosoma* and *Leishmania*. — Ann. trop. Med. Parasit. 59, 494-495

Zusammenfassung

Die Erforschung der Enzymausstattung der Trypanosomen steht erst am Anfang. Die Verfasser haben bei *T. gambiense* an Stämmen, die auf Tieren, und an Stämmen, die in der Kultur gehalten wurden, folgende Enzymwerte untersucht: Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G6PD), Glutaminsäure-Pyruvat-Transaminase (GPT), Glutaminsäure-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase und Milchsäuredehydrogenase (Lactatdehydrogenase, LDH).

Bei *T. gambiense* aus Ratten weist die LDH konstante Werte auf, bei Stämmen aus der Kultur sind die LDH-Werte jedoch höher. Kultivierten Stämmen fehlt jegliche G6PD-Aktivität. Hingegen sind die Stämme, die seit mehreren Jahren auf Tieren gezüchtet werden und arsenresistent sind, reich an GPD-Aktivität.

Die Veränderungen der GOT- und GPT-Aktivität scheinen für jeden Stamm spezifisch zu sein.

Summary

The study of the enzyme systems of trypanosomes is still in its infancy. The authors have investigated the variations in glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD), glutamic-pyruvic transaminase (GPT), glutamic-oxalacetic transaminase (GOT), hydroxybutyric dehydrogenase (HBDH) and lactic dehydrogenase (LDH) occurring in animal and cultured strains of *T. gambiense*.

LDH levels were found to be constant in *T. gambiense* from the rat but higher in cultured strains. G6PD activity is absent in cultured strains but pronounced in strains that have been maintained for several years in animals and have become arsenoresistant.

Concentrations of GOT and GPT appear to vary from strain to strain.