

Utilisation des glucides et de leurs produits de métabolisme par *Trypanosoma evansi* et *Trypanosoma brucei*

BALIS (J.)

avec la collaboration technique de Madame LANUSSÉ
Laboratoire de Farcha-Fort-Lamy Tchad

RÉSUMÉ

Après avoir rappelé brièvement les connaissances actuelles sur le métabolisme glucidique de *Trypanosoma evansi* et *Trypanosoma brucei*, l'auteur expose les résultats obtenus par deux méthodes originales.

L'une est utilisable uniquement pour *Trypanosoma evansi*, l'autre appelée « test de mobilité » est d'application plus générale. Elle permet une étude rapide du métabolisme des Trypanosomes.

Trypanosoma evansi est capable d'utiliser les corps suivants : glycérine glucose, fructose, mannose, glucosamine. Le glycogène et le maltose sont métabolisés après hydrolyse par une maltase et une glycogénase sanguines. La production d'acide pyruvique est très importante.

Trypanosoma brucei utilise les mêmes glucides mais également l'acide Alpha céto glutarique, le pyruvate de sodium, la thréonine, l'acide glutamique et la proline. La mobilisation obtenue avec l'acide Alpha céto glutarique est très nette et permet de différencier biochimiquement *Trypanosoma evansi* de *Trypanosoma brucei*.

3 tableaux.

Bibliographie : 9 références

Assez peu de chercheurs ont étudié spécialement le métabolisme glucidique de *T. evansi* et *T. brucei*.

KRIJGSMAN (5) dans un important travail donne des précisions très intéressantes ; à son avis, *T. evansi* est capable d'utiliser 3 sucres : glucose, fructose, et mannose. Par contre, il ne possède aucune des diastases suivantes : amylase, maltase, saccharase et lactase.

KRIJGSMAN pense, sans le prouver, que vraisemblablement le résultat du catabolisme glucidique est comparable à celui de *T. equiperdum*, c'est-à-dire, constitué avant tout par l'acide pyruvique (REINER, SMYTHE (7), CHEN et GEILING (3)).

Cette dernière opinion est en opposition avec celle de KLIJGLER, GEIGER et COMAROFF (4) qui pensent que l'impossibilité de réaliser des cultures de *T. evansi* est due à la formation massive d'acide lactique.

Par contre, MARSHALL (6) dans une très intéressante publication, étudiant le métabolisme du glucose dans ses rapports avec l'action des trypanocides, dose les produits terminaux et constate qu'il se forme surtout de l'acide pyruvique et très peu d'acide lactique.

Enfin, pour VON BRAND (9) *T. brucei* est capable d'utiliser : glucose, mannose, maltose, fructose et galactose, respectivement dans les rapports 100-86-50-21-9.

En tenant compte de ces travaux, nous avons expérimenté différents glucides et polyosides ainsi que quelques produits de leur métabolisme.

Nous avons d'abord recherché spécialement chez *T. evansi* quelle était d'une part, l'action de ces glucides sur la survie, et d'autre part, l'importance de la libération d'acide pyruvique résultant de leur éventuel catabolisme.

Puis, par une technique totalement différente de la précédente, nous avons fait une étude comparative de 2 souches de *T. evansi* (dont l'une résistante à la Lomidine) et d'une souche de *T. brucei*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La souche de *T. evansi* a été prélevée en décembre 1961 sur un âne de Fort-Lamy. Elle a été conservée depuis par passages sur rats et cobayes. Une race chimio-résistante a été créée par traitements répétés et progressifs à la Lomidine, des rats parasités.

La souche de *T. brucei* provient d'un chien malade qui nous fut présenté en janvier 1964. Cette souche est entretenue depuis sur rats et cobayes.

L'expérimentation a été conduite selon 2 techniques :

1) Sur milieux diphasiques mis en tubes à essais :

La phase solide est de la gélose physiologique à 2 p. 100 qui sert de support à la substance étudiée. Nous utilisons toujours au moins 5 tubes pour chacune d'elles car un lavage défectueux peut sensiblement modifier les résultats et on a donc intérêt à faire une moyenne.

La phase liquide est différente selon que l'on veut expérimenter des glucides ou leurs produits de métabolisme.

a) pour les glucides on utilise un milieu au sang de cheval pratiquement dépourvu de glucose. Sa composition est la suivante :

sang de cheval.....	10 ml
liquoïde « Roche » en solution à 1 p. 100	1 ml
eau distillée	90 ml

hémolyse pendant 1 heure à la température du laboratoire, puis addition de :

— phosphate bipotassique.....	1 g
— chlorure de sodium.....	0,50 g

Ajuster si nécessaire à pH 7,4 avec du phosphate monopotassique.

Filtration sur papier puis sur Sertz.

b) les produits provenant du métabolisme des glucides étant toxiques on utilise le milieu suivant :

sang de cheval.....	10 ml
liquoïde « Roche » en solution à 1 p. 100	1 ml
eau distillée	90 ml
hémolyse	
phosphate bipotassique	1 g
glucose	2 g

Ajuster si nécessaire à pH 7,4 avec du phosphate monopotassique.

On ensemence des milieux avec du sang de rat parasité de façon qu'une fois l'opération terminée, la quantité de trypanosomes soit comprise entre 20.000 et 40.000 au mm³.

Après une légère agitation on répartit dans les tubes d'expérience à raison de 2 ml environ pour chacun d'eux.

Les tubes contenant le milieu sans glucose sont maintenus à 25° pendant 6 heures. Au bout de ce temps, on récolte la phase liquide et on pratique une numération des trypanosomes à l'hématimètre ainsi qu'un dosage de l'acide pyruvique.

Nous utilisons pour ce dernier la méthode de CARON et RAQUET modifiée par nous-mêmes.

Les tubes contenant le milieu glucosé sont maintenus pendant 20 heures à 25°. La suite des opérations est la même que précédemment sauf le dosage de l'acide pyruvique qui ne présente ici aucun intérêt.

Afin de limiter les causes d'erreur, l'ensemble de l'expérimentation est répété plusieurs fois. Il n'est pas nécessaire de travailler d'une façon absolument aseptique, car la durée d'observation est trop courte pour permettre à de légères souillures de se développer. C'est ainsi que les glucides non stériles sont introduits dans la gélose à une température de 50 à 60° ce qui évite une hydrolyse partielle des polysaccharides. Cependant, il est conseillé d'utiliser du matériel passé au four Pasteur.

Cette méthode n'est pas facilement applicable à *T. brucei* car les formes proventriculaires qui

prennent naissance sont beaucoup plus résistantes et faussent les résultats.

2) Test de mobilité :

Il nous a été inspiré par un travail de SCHERN (8) datant de 1925. Cet auteur avait remarqué que lorsqu'on met en présence de sérum, des trypanosomes immobilisés, ceux-ci reprennent leur mouvement au bout d'un quart d'heure environ. Le sérum contient donc une substance énergétique que SCHERN trouva être le glucose.

En généralisant, nous avons pensé que tout corps énergétique pouvait provoquer une mobilisation du parasite si ce dernier était capable de l'utiliser.

Cela s'est confirmé et nous avons élaboré la technique suivante :

Du sang de rat très fortement parasité est dilué au 1/20 environ dans le milieu synthétique suivant :

phosphate bipotassique	1 g
chlorure de sodium	0,25 g
eau distillée	100 ml
phosphate monopotassique — Q. S. pour obtenir pH 7,4.	

Cette suspension est répartie à raison de 2 ml dans autant de tubes à essais qu'il y a de substance à étudier. On ajoute alors dans chaque tube la substance correspondante à raison de 2 gouttes d'une solution à 1 p. 100.

Un tube ne contenant que la suspension sert de témoin et on y constate une immobilisation rapide des trypanosomes, ces derniers ayant épuisé le peu de glucose qui pouvait se trouver dans le sang.

Après immobilisation complète dans la suspension témoin on dépose sur une lame 2 gouttes (témoin et corps à étudier) qu'on recouvre d'une lamelle. Il est alors aisé de se rendre compte à l'examen microscopique si la substance a une action énergétique, c'est-à-dire si elle permet une réanimation des trypanosomes.

Avantages de la méthode : Ils sont multiples.

a) Le travail ne demande aucune précaution de stérilité.

b) Elle permet de pratiquer très rapidement de nombreux examens sur le même prélèvement de sang.

c) Elle met en jeu une quantité très faible de réactif de l'ordre du milligramme.

Inconvénients :

a) Il est nécessaire d'avoir un sang très riche en trypanosomes (au moins 600.000 par mm³) de façon que le glucose présent soit rapidement utilisé. Cette difficulté peut cependant être éliminée en utilisant une suspension de trypanosomes lavés.

b) Certaines substances classées énergétiques ne peuvent l'être par l'intermédiaire d'une diastase sanguine, par exemple le maltose. Cette méthode ne permet pas de déterminer l'origine de la diastase.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats sont résumés dans les tableaux 1 et 2 (milieux diphasiques) ainsi que 3 (test de mobilité). Dans ce dernier cas, outre les glucides et leurs produits de métabolisme, nous avons expérimenté des acides aminés gluco-formateurs.

T. evansi utilise avec dégagement notable d'acide pyruvique : glucose, mannose, fructose, maltose et glycogène (tableau 1).

Aucun pentose n'est actif, cependant, avec tous les glucides et polysides étudiés et non actifs, le nombre de trypanosomes survivants est toujours légèrement supérieur à celui observé chez le témoin.

Le maltose et le glycogène doivent subir une hydrolyse pour être utilisés. Nous avons mis en évidence une maltase et une glycogénase dans le sang de rat. Nous pensons que *T. evansi* est dépourvu de ces diastases puisqu'il ne possède aucune réserve glucidique. En définitive, il semble que seuls glycérine, glucosamine, fructose et mannose sont utilisés directement. Ces 4 derniers corps ont en commun le fait que les oxhydryles des carbones 3 et 4 sont opposés par rapport à la chaîne (disparition trans), alors que le galactose qui est inactif présente la disparition cis. Cette remarque pour avoir une valeur devrait être vérifiée par l'étude d'autres hexoses.

Quel peut être le mode de métabolisme glucidique chez *T. evansi* ?

MARSHALL (6) a observé que prennent naissance 1,75 molécule d'acide pyruvique au lieu des 2 théoriques que donnerait la dégradation

TABLEAU N° I

N°	Substance étudiée	Nombre de trypano. par mm ³ après 6 h.	Pyruvate de Na. au mg. par ml.	Pyruvate de Na réellement dû au catabolisme de la substance étudiée
1	Témoin	4.200	0,02	
2	Glycérol	5.500	0,06	0,04
3	Arabinose	5.000	0,02	0
4	Ribose	5.500	0,05	0,01
5	Xylose	6.000	0,03	0,01
6	Lyxose	6.200	0,03	0,01
7	Glucose	23.400	0,4	0,38
8	Lévuiose	21.800	0,2	0,18
9	Mannose	23.400	0,2	0,18
10	Galactose	8.000	0,02	0
11	Rhamnose	6.800	0,04	0,02
12	Maltose	23.000	0,3	0,28
13	Lactose	5.600	0,04	0,02
14	Tréhalose	5.200	0,04	0,02
15	Saccharose	6.000	0,02	0
16	Raffinose	4.800	0,05	0,03
17	Inuline	5.000	0,03	0,01
18	Glycogène	20.600	0,15	0,13

Le nombre de trypanosomes au départ de l'expérience était de 38.000 au mm³.

du glucose selon la première phase du cycle de KREBS. Il conclut que la différence est utilisée par *T. evansi* à la synthèse de ses protéines. Or, si nous versons du sang de rat très parasité dans le milieu synthétique déjà cité, additionné de glucose, on constate très vite l'apparition d'une teinte lie de vin, montrant qu'il y a eu fixation d'une certaine quantité de gaz carbonique sur les hématies ou bien une consommation d'oxygène car une oxygénation par agitation ou par addition d'une eau oxygénée redonne à la suspension sa couleur rouge clair. Ce phénomène est en rapport étroit avec la présence de glucose. Nous en avons d'ailleurs tiré une méthode de mise en évidence dans le sang, de certaines diastases telles que maltase ou glycogénase. La première phase du cycle de KREBS, celle qui aboutit à l'acide pyruvique est anaérobie et nous savons (tableau 3) que *T. evansi* n'utilise abso-

lument pas cet acide comme substance énergétique, en outre, nous avons observé qu'en présence de glucose il n'entrave que légèrement le phénomène précédemment décrit. La même observation se répète avec le cyanure de Potassium.

Nous avons donc été amenés à penser que *T. evansi* catabolisait simultanément une partie du glucose par un autre processus que le cycle de KREBS; par exemple le cycle gluconique dans lequel on a effectivement dégagement de gaz carbonique et absence de formation d'acide pyruvique. Des recherches dans ce sens doivent être poursuivies.

Un autre aspect curieux du métabolisme glucidique de *T. evansi* est le suivant :

Il semble que du glucose en contact pendant un certain temps avec du sang de rat soit plus

TABLEAU N° II

Série N°	Substance étudiée	Nombre de trypanosomes au mm ³ après 20 h.
1	Témoin	1.080
2	Acide pyruvique 1/10 cc.	0
3	" oxaloacétique 100 mg.	260
4	" citrique 100 mg.	920
5	" -cétoglutarique	200
6	" Succinique 100 mg.	400
7	" fumarique 100 mg.	420
8	" malique	320

Nombre de trypanosomes au début de l'expérience : 40.000 au mm³

rapidement dégradé par le parasite. En effet, si nous réalisons les 2 séries suivantes :

Série 1 — (effectuée en 2 temps)

- a) suspension de sang de rat non parasité en milieu synthétique + solution de glucose
- b) + 24 heures après suspension en milieu synthétique de sang de rat fortement parasité.

Série 2 — (effectuée en même temps que la 2^e partie de la série 1).

Suspension de sang de rat non parasité en milieu synthétique + solution de glucose + suspension de sang de rat fortement parasité en milieu synthétique.

On constate que la réduction de l'hémoglobine apparaît toujours en premier lieu dans la série n° 1 et ceci bien qu'une certaine glycolyse soit observée.

Pour terminer avec *T. evansi* signalons (tableau 3) que la souche résistante à la Lomidine se comporte vis-à-vis des glucides exactement comme la souche normale bien que dans plusieurs expérimentations non citées dans ce travail, le pourcentage de survie ait été très nettement supérieur.

T. brucei (tableau 3) présente des différences notables avec *T. evansi*.

La première phase du cycle de KREBS semble moins intense par contre, on constate une mobilisation avec le pyruvate de Na et l'acide α ceto

TABLEAU N° 3

Substance	N°	evansi normal	evansi résist.	brucei	Substance	N°	evansi normal	evansi résist.	brucei
Glycogène	1	+++	+++	+	acide acétique	23	-	-	-
Maltose	2	+++	+++	+	" citrique	24	-	-	-
Glucose	3	++++	++++	+++	" fumarique	25	-	-	-
Fructose	4	++++	+++	+++	" lactique	26	-	-	-
Mannose	5	++++	++++	+++	" malique	27	-	-	-
Glycérine	6	+++	++	+++	" oxalo.ac.	28	-	-	-
Arabinose	7	-	-	-	" succinique	29	-	-	-
Ribose	8	-	-	-	" tartrique	30	-	-	-
Xylose	9	-	-	-	" α -cétoglut.	31	-	-	++
Galactose	10	-	-	-	pyruvate Na	32	-	-	+
Rhamnose	11	-	-	-	Tréhalose	33	-	-	-
Glucosamine	12	++	++	++	Glycocolle	34	-	-	-
Lactose	13	-	-	-	Alanine	35	-	-	±
Saccharose	14	-	-	-	Serine	36	-	-	-
Raffinose	15	-	-	-	Thréonine	37	-	-	+
Inuline	16	-	-	-	Glutathion	38	-	-	-
Dulcitol	17	-	-	-	Acide aspartique	39	-	-	-
Inositol	18	-	-	-	" glutam.	40	-	-	+
Lyxose	19	-	-	-	Proline	41	-	-	+
Mannite	20	-	-	-	Ornithine	42	-	-	-
Sorbitol	21	-	-	-	Arginine	43	-	-	-

glutarique. Il nous a semblé que surtout les formes courtes réagissent avec ces corps.

Les acides aminés suivants : alanine, thréonine, acide glutamique et proline provoquent une mobilisation, donc sont énergétiques, ce sont des glucoformateurs et on est en droit de penser que *T. brucei* est capable d'effectuer cette transformation. Nous éliminons l'action d'une diastase sanguine car dans les mêmes conditions *T. evansi* ne réagit pas. Il est probable que ces glucoformateurs interviennent également par transamination avec l'acide pyruvique.

T. brucei présente donc un système enzymatique plus complet et en quelque sorte mieux équilibré que celui de *T. evansi*, ce qui explique la possibilité de le cultiver.

CONCLUSION

Les deux méthodes utilisées dans ce travail, particulièrement celle que nous avons appelée « test de mobilité », nous ont permis d'étudier certains points du métabolisme glucidique de *T. evansi* et *T. brucei*.

Les deux souches dont nous disposons sont différenciables biochimiquement par leur comportement vis-à-vis des corps suivants : pyruvate de Na, acide α ceto glutarique, alanine, thréonine, acide glutamique et proline. Le test à l'acide α ceto glutarique fut le plus net dans nos expériences. Il pourrait servir de base à l'étude de différentes souches de *T. brucei*, particulièrement celles conservées depuis longtemps sur petits animaux et qui ont perdu la faculté de cultiver « in vitro ».

SUMMARY

The utilisation of carbohydrates and their products of metabolism
by *Trypanosoma Evansi* and *Trypanosoma brucei*

Having recalled briefly present knowledge of carbohydrate metabolism of *T. evansi* and *T. brucei*, the authors describes the results obtained by two new methods.

One is able to be used only for *T. evansi* while the other named the « mobility test » has a more general application and permits a rapid study of the metabolism of Trypanosomes.

Trypanosoma evansi is capable of utilising the following substances glycerine glucose, fructose, mannose, glucosamine, Glycogen and maltose are metabolised after hydrolysis by a blood maltase and a blood glycogenase. The production of pyruvic acid is considerable.

T. brucei utilises the same carbohydrates and also oetoglutamic acid, sodium pyruvate, theonine, glutamic acid and proline. The mobilisation obtained with cetoglutamic acid is very clear and provides a biochemical differentiation between *T. evansi* and *T. brucei*.

3 tables.

9 references.

RESUMEN

Utilización de los glúcidos y de sus productos de metabolismo
por *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma brucei*

Después de haber recordado brevemente los conocimientos actuales en cuanto al metabolismo de los glúcidos de *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma brucei*, el autor describe los resultados obtenidos con dos métodos originales.

El primero se emplea sólo para el *Trypanosoma evansi*, el otro llamado « test de movilidad » se aplica más comunmente. Permite un estudio rápido del metabolismo de los Tripanosomas.

Trypanosoma evansi es capaz de usar los cuerpos siguientes : glicerina, glucosa, fructosa, manosa, glucosamina. El glicógeno y la maltosa son metabolizados luego de la hidrólisis por una maltasa y una glicógenasa sanguíneas. Es muy importante la producción del ácido pirúvico.

Trypanosoma brucei emplea los mismos glúcidos pero también el ácido alfa cetoglutámico, el piruvato de sodio, la threonina, el ácido glutámico y la prolina. La movilización obtenida con el ácido alfa cetoglutámico es muy neta y permite de diferenciar bioquímicamente *Trypanosoma evansi* de *Trypanosoma brucei*.

3 cuadros

Bibliografía : 9 referencias.

BIBLIOGRAPHIE

- BALIS (J.). — Recherche et dosage de l'acide pyruvique dans les liquides biologiques. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1963, 16 (4).
- CARON (H.) et RAQUET (D.). — Caractérisation et dosage de l'acide pyruvique. Application à la recherche de l'acide lactique. *J.P.C.*, 1942, 2 : 333.
- CHEN (G.) et GEILING (E. M. K.). — Glycolysis in *Trypanosoma equiperdum*. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1946, 63 : 486-87.
- KLIGLER (I. H.), GEIGER (A.) et COMAROFF (R.). — Effect of the nature and composition of the substrate on the development and Viability of trypanosomes. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1930, 24 : 329.

5. KRIJGSMAN (B. J.). — Vergleichend physiologische Untersuchungen über den Stoffwechsel von *Trypanosoma evansi* im Zusammenhang mit der Anpassung an Wirtstier. *Z. Vergl. Physiol.*, 1936, 23 : 663.
6. MARSHALL (P. B.). — The glucose metabolism of *Trypanosoma evansi* and the action of trypanocides. *Brit. J. Pharmacol.*, 1948, 3 : 8-14.
7. REINER (L.), SMYTHE (C. V.). — *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1934, 31 : 1086.
8. SCHERN (K.). — Ueber Trypanosomen-I-Das Phaenomen des Trypanosomen Wiederbe-
lebung und das Vorhandensein vergaerbarer Substanzen in den Lebern und deren Extracten welche « wiederlebend » wirken. II-sind in den Extracten welche aus den Lebern der an einer akuten Trypanosomiasis verendeten Tiere hergestellt sind noch durch Hefe vergaerbere Substanzen vorhanden. *Zbl. Bakt.*, 1925, 96 : 356-60.
9. Von BRAND. — Studien üben den Kohlenhydratstoffwechsel parasitischer Protozoen. Der Zuckerstoffwechsel der Trypanosomen. *Z. vergl. Physiol.*, 1933, 19 : 587-614.