

# Utilisation de *T. evansi* pour la recherche des hydrolases sanguines responsables de la formation de glucose à partir de différents diholosides et du glycogène

par J. BALIS — avec la collaboration technique de Madame CHATELAIN.

## RÉSUMÉ

L'auteur expose le principe et la réalisation technique d'une méthode originale, utilisant *T. evansi* comme réactif, et permettant la recherche de certaines hydrolases sanguines.

Par cette méthode, ont été mises en évidence une maltase dans le sang du cheval, du bœuf, du lapin et du rat, et une glycogénase dans le sang du bœuf, du lapin et du rat.

Lors d'un précédent travail (1) consacré au métabolisme glucidique de *T. evansi* nous avons trouvé que ce flagellé était apparemment capable d'utiliser outre 3 hexoses (glucose, fructose, mannose), le maltose et le glycogène.

En réalité ces deux derniers corps, pour être métabolisés doivent au préalable subir l'action d'une hydrolase sanguine, les transformant en glucose directement assimilable par *T. evansi* (3).

L'objet du présent travail est de décrire une technique originale utilisant *T. evansi* comme réactif et permettant de mettre en évidence ces hydrolases dans le sang de différentes espèces animales.

## Matériel et méthodes

*T. evansi* ne métabolise que 3 glucides (glucose, fructose et mannose) et consomme de l'oxygène en présence de ces sucres.

Ce fait peut-être mis en évidence à l'aide d'une suspension d'hématies dont la couleur passe très nettement du rouge clair au rouge vineux dès que l'hémoglobine est réduite.

Le virage se produit en 30 à 60 minutes si le nombre de trypanosomes est important. Lors-

qu'on introduit dans le milieu un diholoside susceptible d'être hydrolysé par une diastase sanguine, le changement de teinte apparaît beaucoup plus tardivement en raison du temps nécessaire à la formation de glucose en quantité suffisante.

Il est donc possible de déceler une hydrolase sanguine en comparant les résultats obtenus dans les tubes suivants :

N° 1.

Dilution de sang à analyser + solution de diholoside.

+ 24 heures après, dilution de sang de rat fortement parasité.

N° 2. — (effectué en même temps, que la 2<sup>e</sup> partie du n° 1).

Dilution de sang à analyser + solution de diholoside + dilution de sang de rat fortement parasité.

Si le diholoside est hydrolysé par une diastase sanguine, on constate un virage dans le tube n° 1 alors que la teinte du tube n° 2 ne varie pas.

La réalisation pratique de la méthode est conforme au tableau n° 1.

On utilise 6 séries de 6 tubes stérilisés au four Pasteur et numérotés de 1 à 36. Le milieu de dilution a la composition suivante :

- Phosphate bipotassique ..... 1 g
- Chlorure de sodium ..... 0,25 g
- Eau distillée ..... 100 ml
- Phosphate monopotassique : Q S pour obtenir pH 7,4
- Stérilisation par chauffage ou filtration sur Seitz.

Les sucres sont utilisés sous forme de solutions à 1 p. 1.000 stérilisés par filtration.

Ce procédé convient mal au glycogène qui est partiellement retenu sur le disque d'amiante. De ce fait on n'obtient plus exactement une solution à 1 p. 1.000 et pour ce corps les résultats ne peuvent être que qualitatifs.

Le sang de rat parasité ainsi que le sang à analyser sont dilués stérilement au 1/30 dans le milieu précédemment décrit. Les séries 1, 2, 3 et 5 sont préparées aseptiquement.

Après 24 heures on réalise les séries 4 et 6 puis on répartit rapidement la dilution de sang de rat parasité dans les tubes 13 à 36.

Le nombre de trypanosomes dans le sang de rat doit au moins atteindre 500.000 par millimètre cube si on veut avoir un virage très net.

En examinant le tableau n° 1 on voit que la réaction est effectuée sur des concentrations croissantes de sucre, car les vitesses d'hydrolyse et d'utilisation du glucose formé sont proportionnelles à la concentration du substrat.

Après quelques essais nous avons adopté les dilutions suivantes :

1/45.000 — 1/22.500 — 1/15.000 — 1/11.250 — 1/9.000 auxquelles on ajoute un tube témoin, ne contenant pas de sucre (tubes n°s 1, 7, 13, 19, 25, 31).

Les séries 1 et 2 permettent de vérifier qu'il n'y a pas de virage en l'absence de *T. evansi*.

La comparaison des séries 5 et 6 décèle la présence de l'hydrolase recherchée et par rapport à la série n° 3 (contenant du glucose), on peut évaluer son activité.

Enfin l'examen comparatif des séries 3 et 4 permet d'apprécier l'importance de la glycolyse sanguine en 24 heures.

Pour fixer les idées nous donnerons un exemple concret :

La recherche de la maltase dans le sang de rat fournit les résultats suivants :

Série n°	1	2	3	4	5	6
1,	0	0	0	0	0	0
2,	0	0	0	0	0	0
3,	0	0	1	4	4	4
4,	0	1	4	4	4	4
5,	0	0	0	3	4	4
6,	0	0	0	0	0	0

Le chiffre 4 représente le virage maximum. Ce dernier est obligatoirement obtenu dans le tube n° 24 de la série 4.

#### Avantages de la méthode

Elle ne nécessite qu'un matériel réduit et permet de déceler qualitativement une hydrolase et doser son activité.

Il est également possible d'évaluer l'importance de la glycolyse sanguine.

#### Inconvénients

Cette méthode nécessite un sang de rat très fortement parasité. Elle est valable chaque fois que le résultat est positif.

Si l'hydrolase recherchée est douée d'une très faible activité, il est alors impossible d'obtenir un virage. Dans ce cas, et si on tient compte des hydrolases susceptibles d'exister dans le sang de rat, on augmente considérablement la sensibilité en comparant la mobilité des trypanosomes (1) dans le premier et le dernier tube des séries 5 et 6. En effet une très faible quantité de glucose ou de fructose est capable de provoquer une mobilisation et, en l'absence de cette dernière, on peut affirmer que si l'hydrolase existe, son activité est négligeable dans les conditions de l'expérience, c'est-à-dire diluée au 1/30 et à la température de 25°.

#### Résultats et discussion

A l'aide de cette technique nous avons recherché la présence de 5 diastases (lactase, maltase, saccharase, tréhalase, glycogénase), dans le sang des 6 espèces suivantes :

Homme, cheval, bœuf, lapin, rat, cobaye.

Les résultats consignés dans le tableau n° 2 doivent être considérés comme une illustration de la méthode car la plupart d'entre eux sont le

TABLEAU N° I

Série N° 1						
Tube n°	1	2	3	4	5	6
Sg. dilué (en ml)	4	4	4	4	4	4
Glucose (en gouttes)		2	4	6	8	10
Eau physiologique (en gouttes)	10	8	6	4	2	
Série N° 2						
Tube n°	7	8	9	10	11	12
Sg. dilué (en ml)	4	4	4	4	4	4
Sucre étudié (en gouttes)		2	4	6	8	10
Eau physiologique	10	8	6	4	2	
Série N° 3						
Tube n°	13	14	15	16	17	18
Sg dilué (en ml)	2	2	2	2	2	2
Glucose (en gouttes)		2	4	6	8	10
Eau physiologique	10	8	6	4	2	
Sp. dilué (en ml)	2	2	2	2	2	2
Série N° 4						
Tube N°	19	20	21	22	23	24
Sg. dilué (en ml)	2	2	2	2	2	2
Glucose (en gouttes)		2	4	6	8	10
Eau physiologique (en gouttes)	10	8	6	4	2	
Sp. dilué (en ml)	2	2	2	2	2	2
Série N° 5						
Tube N°	25	26	27	28	29	30
Sg. dilué (en ml)	2	2	2	2	2	2
Sucre étudié (en gouttes)		2	4	6	8	10
Eau physiologique (en gouttes)	10	8	6	4	2	
Sp. dilué (en ml)	2	2	2	2	2	2
Série N° 6						
Tube N°	31	32	33	34	35	36
Sg. dilué (en ml)	2	2	2	2	2	2
Sucre étudié (en gouttes)		2	4	6	8	10
Eau physiologique (en gouttes)	10	8	6	4	2	
Sp. dilué (en ml)	2	2	2	2	2	2

Sg = sang dans lequel on recherche la diastase.

Sp.= sang de rat fortement parasité.

TABLEAU N° II

	Lactase		Maltase		Saccharase		Tréhalase		Glycogénase		Série 3	Série 4
	Virage	Test mobilité	Virage	Test mobilité	Virage	Test mobilité	Virage	Test mobilité	Virage	Test mobilité		
Homme	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1 444	3 444
Cheval	0	-	1 444	+	0	-	0	-	0	-	1 444	2 444
Boeuf	0	-	2 444	+	0	-	0	-	244	+	2 444	3 444
Lapin	0	-	3	+	0	-	0	-	2	+	1 444	2 444
Rat	0	-	344	+	0	-	0	-	12	+	1 444	14 444
Cobaye	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	2 444	3 444

fruit d'une expérience unique et ne peuvent donc être généralisés.

La diastase la plus fréquente est la maltase qu'on retrouve chez 4 espèces animales.

La glycogénase est plus rare et surtout moins active.

Nous n'avons pu mettre en évidence la tréhalase signalée par BOWMAN, VON BRAND et TOBIE (2) dans le sang de l'homme et de lapin. Cette diastase avait été invoquée par ces auteurs pour expliquer les résultats obtenus par Weinman avec le tréhalose sur *T. rhodesiense* et *T. gambiense* (4).

L'examen des séries 3 et 4 a permis de noter régulièrement une glycolyse appréciable en 24 heures, ceci se manifestant toujours par un virage moins important dans la série 3. Par contre il est nettement plus précoce dans cette même série, comme si le glucose avait subi une

sorte de préparation, le rendant plus apte à être utilisé par *T. evansi*.

### Conclusions

Nous avons exposé dans ce travail, le principe et la réalisation technique d'une méthode originale permettant la recherche de certaines hydrolases dans les liquides biologiques.

Elle est basée sur le fait que *T. evansi* consomme de l'oxygène et se mobilise, uniquement en présence de glucose, fructose et mannose.

Un diholoside ne peut donc provoquer ces phénomènes que s'il est préalablement hydrolysé et transformé en l'un de ces 3 hexoses.

Cette méthode nous a permis de mettre en évidence, dans le sang de différentes espèces animales, une maltase (cheval, bœuf, lapin, rat) et une glycogénase (bœuf, lapin, rat).

### SUMMARY

#### Use of *T. evansi* for the detection of hydrolases of blood which are responsible of dextrose formation from various di-saccharides and glycogen

The author has reported the principle and the practical application of an inventive method using *T. evansi* as a reagent which allows the detection of various hydrolases of blood.

With this method a maltase has been shown in horse, ox, rabbit and rat blood, a glycogénase in ox, rabbit and rat blood.

## RESUMEN

### **Utilización de *T. evansi* para la búsqueda de las hidrolisis sanguíneas, responsables de la formación de glucosa a partir de diferentes diholosidos y del glicógeno**

El autor expone el principio y la realización técnica de un método original, utilizando *T. evansi* como reactivo, y permitiendo la búsqueda de ciertas hidrolisis sanguíneas.

Mediante este método, fueron descubiertas una maltasa en la sangre de un caballo, de un buey, de un conejo y de una rata, y una glicogenasa en la sangre de un buey, de un conejo y de una rata.

## BIBLIOGRAPHIE

1. J. BALIS. — Utilisation des glucides et de leurs produits de métabolisme par *T. evansi* et *T. brucei*. Sous-presse.
2. I. B. R. BOWMAN, T. VON BRAND et E. J. TOBIE. — The cultivation and metabolism of trypanosomes in the presence of trehalose with observations on trehalase in blood serum. Exp. Parasit. 1960, 10 274-283.
3. P. B. MARSHALL. — The glucose metabolism of *T. evansi* and the action of trypanocides. Brit. J. Pharmacol. 1948, 3, (8), 8-14.
4. D. WEINMAN. — Trehalose metabolism of Trypanosomes. Nature, 1960, 186, 166.