



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Études biochimiques de *Trypanosoma brucei brucei* chez le rat infesté et traité avec des substances trypanocides de synthèse

Dumont, Vincent

Award date:
1987

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

Etudes biochimiques de *Trypanosoma brucei brucei*
chez le rat infesté et traité avec des substances
trypanocides de synthèse.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

DUMONT Vincent
1986-1987

REMERCIEMENTS

Arrivant au terme de ce mémoire , je désire exprimer ma profonde gratitude et mes remerciements

au Docteur J.M. Jadin qui m'a guidé tout au long de ce travail.

aux Professeurs Monsieur et Madame R. Wattiaux qui m'ont laissé toute liberté pour l'accès de leur laboratoire et tout spécialement à Madame Wattiaux pour les précieux conseils qu'elle m'a prodigués.

au Révérend Père P. Devos , au Professeur E. Feytmans , au Dr. Sc. E. Depierreux et au regretté Dr.Sc. J.M. Gohy qui ont bien voulu m'accueillir et mettre à ma disposition le matériel du laboratoire de Biologie Quantitative.

au Docteur F.R. Opperdoes ainsi qu'à Monsieur Van Roy de l'unité TROP. (I.C.P.) qui m'ont initié aux techniques de laboratoire .

au Professeur R. Leloup responsable du Laboratoire interfacultaire de Microscopie Electronique ainsi qu'à Madame Ch. Devignon et Monsieur Y. Houbion pour l'accueil et l'aide qu'ils m'ont apportée.

à Monsieur J. Collet pour l'iconographie de ce mémoire.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à tous ceux qui d'une manière ou d'une autre ont participé à la réalisation , la rédaction et plus spécialement à l'impression de ce travail.

Un merci tout particulier à Mademoiselle Myriam Delcroix , à Mademoiselle M.Ch. Wilem , à Monsieur A. Decat , à Monsieur E. Pirotte , à Monsieur et Madame Delcroix , à Madame E. Tassart, à Madame R. A. Museur , à Monsieur P. Galmach et à Monsieur C. Vannieuwenhuize, à Mademoiselle M.A. Benoit et à Mademoiselle S. Ioret.

Je remercie aussi ma famille pour son soutien durant toutes mes années d'études.

TABLE DES MATIERES

<u>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION</u>	1
<u>1. 1. Aperçu général sur les trypanosomes</u>	1
<u>1.1.1</u> Distribution et hôtes	1
<u>1.1.2</u> Biologie	1
<u>1.1.3</u> Morphologie des Trypanosomatidae	5
<u>1.2. Chimiothérapie</u>	5
<u>1.2.1</u> Aperçu historique	5
<u>1.2.2</u> Présentation des drogues utilisées	6
1.2.2.1 Bromure d'éthidium	6
1. Mode d'action	6
2. Sélectivité	6
3. Toxicité	7
4. Effets sur <i>Trypanosoma congolense</i> , <i>T. brucei</i> , <i>T. Vivax</i>	7
5. Effets sur <i>Trypanosoma rhodesiense</i>	7
1.2.2.2 L'Antrycide	8
1. Mode d'action	8
2. Sélectivité	9
3. Toxicité	9
4. Effets sur <i>Trypanosoma congolense</i> , <i>T. brucei</i> , <i>T. vivax</i>	9
5. Effets sur <i>Trypanosoma rhodesiense</i>	9
<u>1.3. Etudes biochimiques</u>	10
<u>1.3.1</u> Fractionnement subcellulaire	10
a) Principe de la centrifugation différentielle	10
b) Postulat d'homogénéité biochimique	11
<u>1.3.2</u> Choix des enzymes dosés	12
<u>1.3.3</u> Localisation intracellulaire, fonctions et propriétés de latence des enzymes dosés	13

<u>CHAPITRE 2 : BUT DU TRAVAIL</u>	17
<u>CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES</u>	18
<u>3. 1. Souches de parasites et hôtes vertébrés utilisés</u>	18
<u>3.1.1</u> Les hôtes vertébrés	18
<u>3.1.2</u> Le parasite	18
<u>3.1.3</u> Entretien de la souche de trypanosome	18
<u>3. 2. Injection des drogues</u>	18
<u>3. 3. Etudes biochimiques</u>	19
<u>3.3.1</u> Croissance et isolement des trypanosomes	19
3.3.1.1. Récolte du sang des rats par ponction cardiaque	19
3.3.1.2. Purification des trypanosomes selon la méthode de LANHAM	
<u>3.3.2</u> Fractionnement subcellulaire	21
3.3.2.1. Homogénéisation	22
3.3.2.2. Fractionnement subcellulaire	22
<u>3.3.3</u> Mesures enzymatiques	22
3.3.3.1 Méthodes employées pour les dosages	25
3.3.3.2 Calculs et présentation des résultats	26
<u>3. 4. Etudes en microscopie électronique des fractions subcellulaires de <i>T. b. brucei</i></u>	27
<u>CHAPITRE 4 : RESULTATS</u>	29
<u>4. 1. Etudes biochimiques après fractionnement subcellulaire de <i>Trypanosoma brucei</i> isolé à partir de rats témoins</u>	29
<u>4.1.1</u> Arguments morphologiques montrant la qualité de l'homogénéisation et du fractionnement	29
<u>4.1.2</u> Distribution et quantités totales des protéines obtenues pour quatre fractionnements témoins	29

<u>4.1.3</u> Activités spécifiques des enzymes dosés	37
<u>4.1.4</u> Distributions des enzymes après centrifugation différentielle	37
<u>4. 2. Etudes biochimiques après fractionnement subcellulaire de</u> <u><i>Trypanosoma brucei</i> isolé à partir de rats traités à l'Antrycide</u>	41
<u>4.2.1</u> Effet de l'Antrycide sur la quantité totale de protéines	41
<u>4.2.2</u> Effet de l'Antrycide sur les activités spécifiques	43
4.2.2.1 Effet global du traitement	43
4.2.2.2 Effet de la durée du traitement	43
<u>4.2.3</u> Effet de l'Antrycide sur la distribution des enzymes et des protéines	43
4.2.3.1 pourcentage de protéines dans les différentes fractions	43
4.2.3.2 Distribution des enzymes	48
<u>4. 3. Etudes biochimiques après fractionnement de <i>T.Brucei</i> isolé à</u> <u>partir de rats traités avec du Bromure d'éthidium</u>	49
<u>4. 3.1</u> Effet du Bromure d'éthidium à la dose de 2.5mg/kg	49
4.3.1.1 Effet sur la quantité totale de protéines	49
4.3.1.2 Effet sur les activités spécifiques	49
4.3.1.3. Effet B.E. sur la distribution des enzymes et des protéines	51
<u>4. 3. 2</u> Effet du Bromure d'éthidium à la dose de 16mg/kg	56
4.3.2.1 Effet sur la qualité totale des protéines	56
4.3.2.2 Effet sur les activités spécifiques	56
4.3.2.3 Effet sur la distribution des enzymes et des protéines	56
 <u>CHAPITRE 5 : DISCUSSION</u>	 62
 <u>5. 1 Commentaires sur les Etudes biochimiques après fractionnement</u> <u>subcellulaire de <i>Trypanosoma brucei</i> provenant de rats témoins</u>	 62
<u>5.1.1</u> Comparaison des distributions enzymatiques et de la quantité totale de protéines obtenues pour quatre fractionnements témoins	62
<u>5.1.2</u> Problème d'homogénéisation et de fractionnement	63
5.1.2.1 Problème d'homogénéisation	63
5.1.2.2 Conditions de fractionnement	64
<u>5. 1. 3</u> Activités spécifiques	65

<u>5.1.4</u> Distribution des enzymes de <i>T. brucei</i> après centrifugation différentielle	65
<u>5.1.5</u> Comparaison de la répartition des enzymes et des mesures biochimiques obtenues dans nos expériences témoins avec les données de la littérature	66
5.1.5.1 Comparaison des activités spécifiques obtenues dans nos expériences témoins avec les données de la littérature	66
5.1.5.2 Comparaison des distributions enzymatiques de <i>Trypanosoma brucei</i> de référence avec les distributions des enzymes dans la littérature	68
<u>5.2. Comparaison de la répartition des enzymes et des mesures biochimiques réalisées sur <i>T.b.brucei</i> isolés à partir de rats traité à l'Antrycide avec nos données de référence</u>	68
<u>5.2.1</u> Effet de l'Antrycide sur la quantité totale de protéines	69
5.2.1.1 Effet global de l'Antrycide	69
5.2.1.2 Effet de la durée du traitement	69
<u>5.2.2</u> Effet de l'Antrycide sur les activités spécifiques	69
<u>5.2.3</u> Effet de l'Antrycide sur la distribution des enzymes et des protéines	70
5.2.3.1 Effet sur la distribution des protéines	70
5.2.3.2 Effet sur la distribution des enzymes	71
<u>5.3. Comparaison de la répartition des enzymes et des mesures biochimiques réalisées sur <i>T. brucei</i> isolé à partir de rats traités avec du Bromure d'éthidium avec nos données de références</u>	71
<u>5.3.1</u> Effet du Bromure d'éthidium à la dose de 2.5 mg/kg	71
5.3.1.1 Comparaison des quantités totales de protéines	71
5.3.1.2 Comparaison des activités spécifiques	72
5.3.1.3 Comparaison des distributions enzymatiques	72
<u>5.3.2</u> Effet du bromure d'éthidium à la dose de 16mg/kg	73
<u>CHAPITRE 6 : CONCLUSION</u>	73 bis.
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	74

LEXIQUE DES ABREVIATIONS

B.E.	: Bromure d'éthidium
KDNA	: DNA Cinétoplastique
PBS	: "Phosphate Buffer Saline" (tampon)
PS	: "Phosphate Saline" (tampon)
PSG	: "Phosphate Saline Glucose" (tampon)
STE	: Saccharose, Tris-HCl, EDTA
DEAE	: Diéthylaminoéthyl cellulose
H	: Homogénat
E	: Extrait cytoplasmique ou surnageant post-nucléaire
N	: Fraction Nucléaire
LG	: Fraction à gros granules
SG	: Fraction à petits granules
P	: Fraction microsomale
S	: Surnageant final
GPI	: Glucose Phosphate Isomérase
AAT	: Alanine Amino Transférase

Remarque : Le trait en dessous de chaque micrographie électronique représente 1 μm

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.

1. 1. Aperçu général sur les trypanosomes.

1.1.1. Distribution et hôtes.

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés du genre *Trypanosoma*. Ce sont des agents responsables de maladies graves chez l'homme et chez les animaux domestiques. Les trypanosomiasés humaines sont de deux types : en premier lieu, la maladie du sommeil due à *Trypanosoma brucei rhodesiense* et à *Trypanosoma brucei gambiense* dans les régions tropicales et subtropicales de l'Afrique ; ensuite la maladie de Chagas due à *Trypanosoma cruzi* en régions tropicales et subtropicales de l'Amérique.

Les trypanosomiasés affectent également un grand nombre d'animaux sauvages et domestiques : le Nagana du à *Trypanosoma brucei brucei* en Afrique tropicale, responsable de la mort de trois millions de bovins par an ; la Dourine, une maladie des chevaux due à *Trypanosoma equiperdum* ; la Surra, une maladie des chevaux due à *Trypanosoma evansi*.

T.b. rhodesiense et *T.b. gambiense* sont deux espèces très proches l'une de l'autre. Elles le sont aussi vis à vis de *T.b. brucei*. Le seul caractère permettant de différencier cette espèce des autres précitées est son incapacité à infecter l'homme et le babouin.

1. 1. 2. Biologie.

Le cycle de vie de *T.brucei* selon VICKERMAN, 1965, est représenté à la figure 1.

T. brucei se présente sous différentes formes dans le sang et les liquides intercellulaires des hôtes mammifères : les formes trypomastigotes allongées et maigres ("Slender forms"), se divisant, les formes intermédiaires et les formes courtes et trapues ne se divisant pas. Dans les "Slender forms" la mitochondrie unique est réduite à un canal périphérique et ne présente pas de crête tubulaire. Les cytochromes sont absents et le cycle de Krebs n'est pas fonctionnel (VICKERMAN, 1965). Le glucose n'est pas complètement oxydé en pyruvate et le NADH produit lors de la glycolyse est réoxydé par le système de la glycérol-3-phosphate oxydase.

La transformation des "Slender forms" en " Stumpy forms" est marquée par une augmentation de volume de la mitochondrie et le développement de crêtes tubulaires. La mitochondrie montre, simultanément, des activités en pyruvate, 2-oxoglutarate oxydases et en NADH réductase suggérant une participation partielle de la mitochondrie dans le métabolisme (NEWTON et al., 1973).

Durant son séjour dans le sang de l'hôte la forme trypomastigote est recouverte en surface

par un revêtement d'une épaisseur de 12-15 nm. Ce revêtement consiste en une seule glycoprotéine. Les trypanosomes sont capables de remplacer cette glycoprotéine par une autre ayant des propriétés antigéniques différentes. Ils peuvent de cette manière échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (CROSS, 1978).

Cette protéine de surface est appelée "Glycoprotéine variable de surface" (VSG). Ce revêtement disparaît une fois que le trypanosome passe dans l'intestin moyen de la mouche tsé-tsé.

Ce sont les "Stumpy forms" qui doivent être ingérées par la mouche tsé-tsé pour que le cycle évolutif se poursuive (WIJERS et al., 1960).

Cette forme semble être préadaptée aux nouvelles conditions d'environnement de l'intestin moyen de la mouche, dans lequel la concentration en glucose et la pression en oxygène sont limités, mais où sont abondants les acides aminés provenant du sang ingéré.

La forme présente dans l'intestin moyen de la mouche possède une mitochondrie développée possédant des crêtes tubulaires et les cytochromes sont présents. Les trypanosomes migrent alors vers les glandes salivaires de la mouche où ils se transforment en forme métacyclique qui est infectieuse pour l'hôte vertébré. Cette forme possède à nouveau un revêtement de glycoprotéines.

Les formes sanguines de *T. b. brucei* sont entièrement dépendantes du glucose pour leur production d'énergie et la consommation de glucose se produit à un taux très élevé.

OPPERDOES et BORST en 1977 localisèrent chez *T. b. brucei* un certain nombre d'enzymes de la glycolyse dans un organe appelé glycosome.

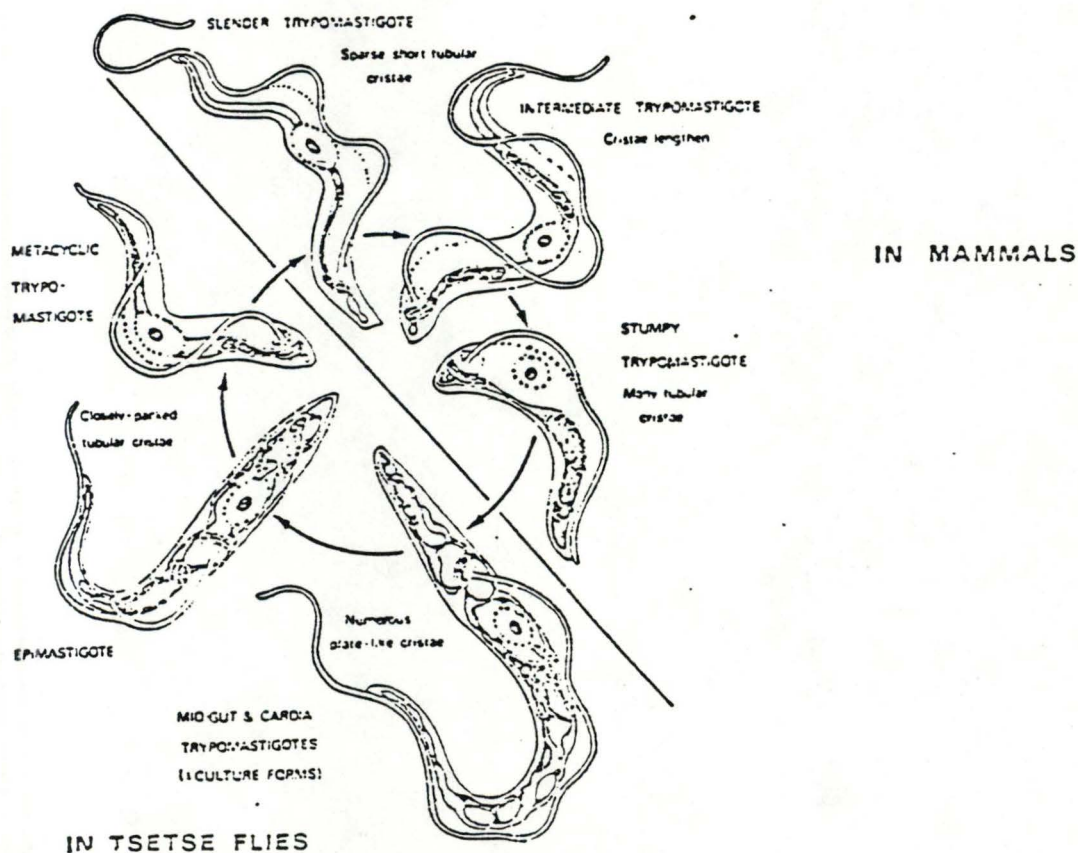


figure 1 schéma du cycle évolutif de *Trypanosoma brucei* (d'après VICKERMAN, 1965)

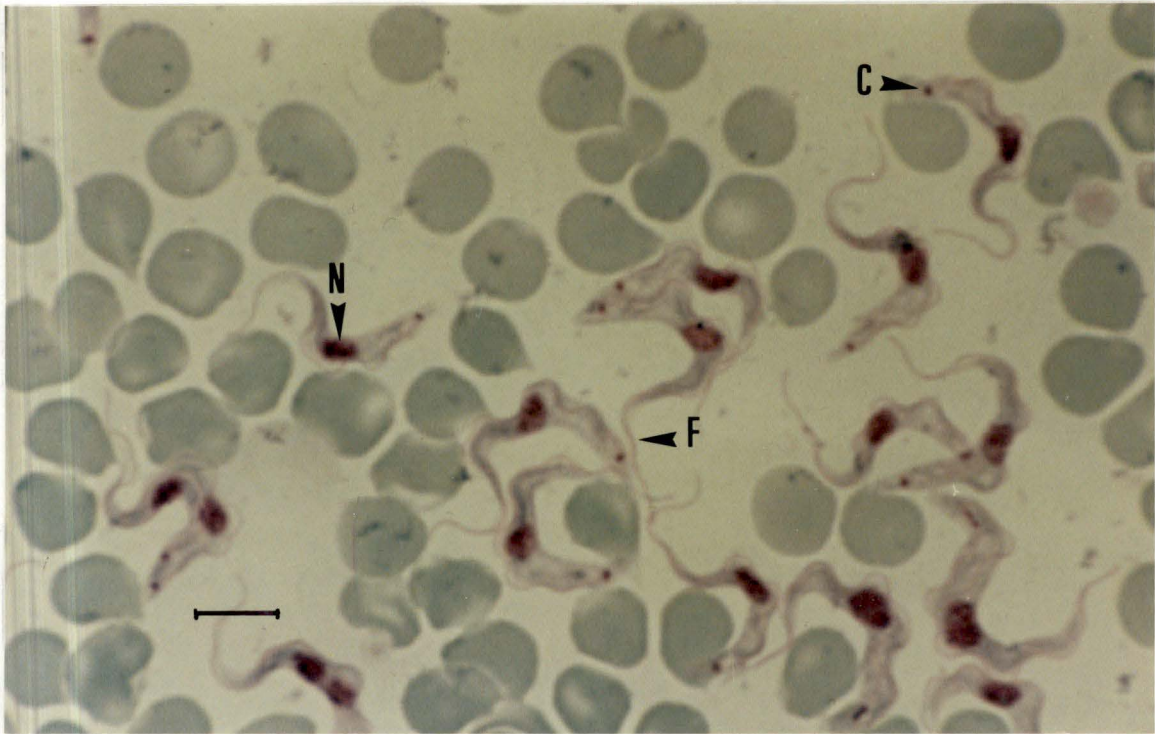


Fig.2 : Frottis sanguin de souris infestées de *Trypanosoma brucei* . C (cinétoplaste); N (noyau); F(flagelle). Cliché repris de HENKINET, 1986.
Le trait représente 10 μ m.

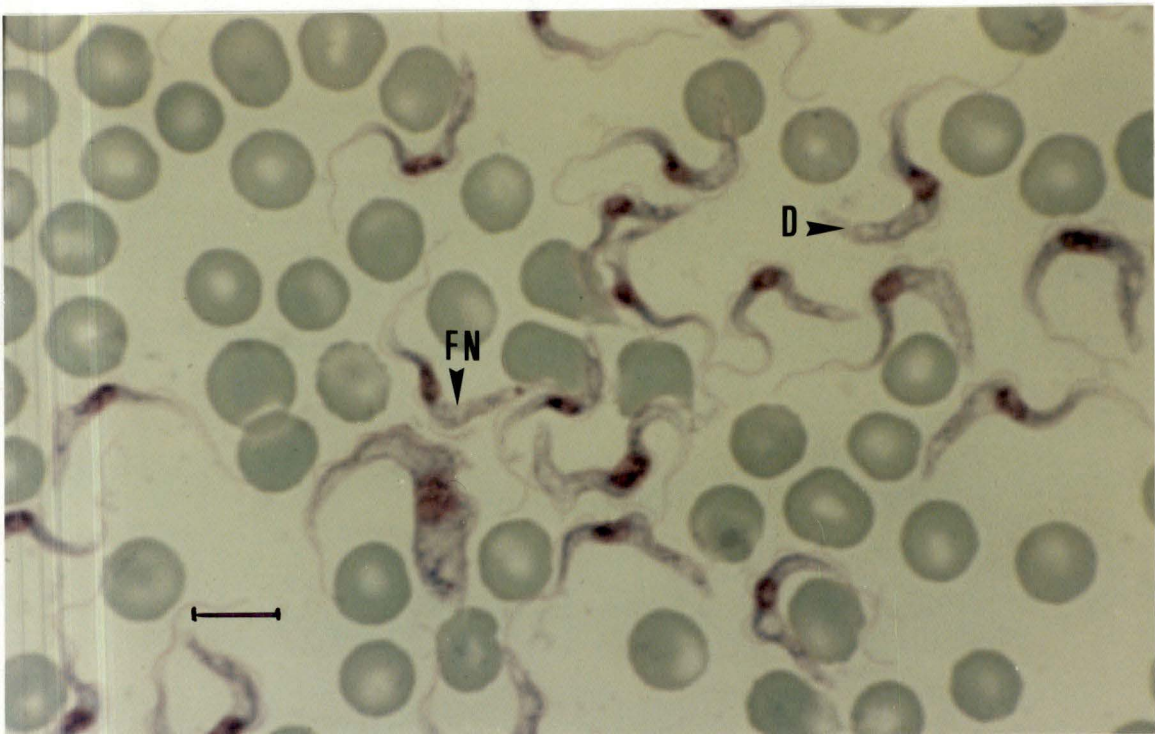


Fig.3 : Frottis sanguin de souris infestées de *T.b .brucei* après traitement à l'Antrycide.
FN (forme normale); D (forme dyscinétoplastique). Cliché repris de HENKINET, 1986.
Le trait représente 10 μ m.

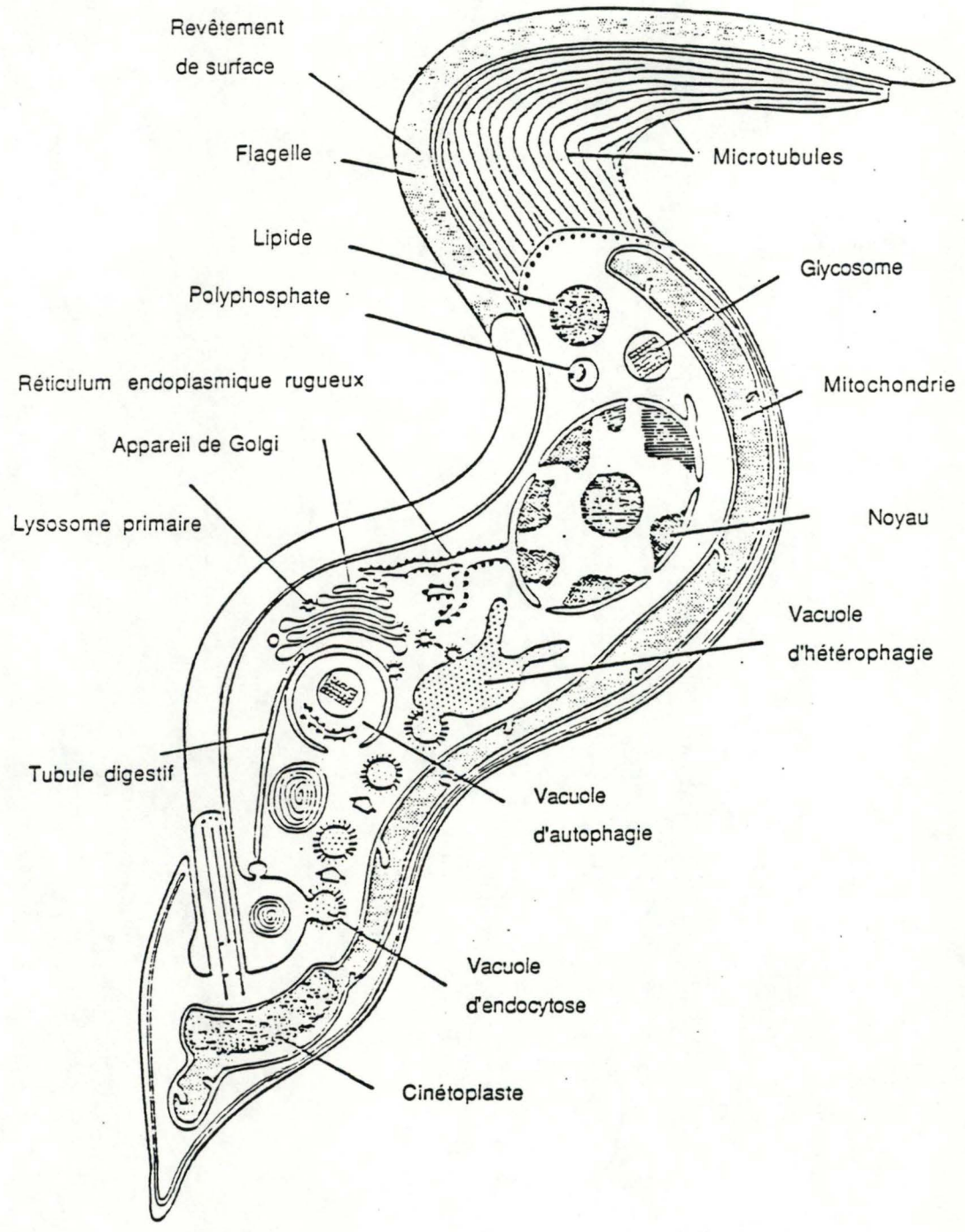


Fig.4 : Principales structures des trypanosomes africains .

1.1.3. Morphologie des Trypanosomatidae.

Les trypanosomes se présentent toujours sous la forme d'une cellule d'où émerge un flagelle. Cette cellule peut varier quant à la taille et à la forme. Les tailles peuvent aller de 2 à 3 microns pour les micromastigotes et à 120 microns pour les plus grands trypomastigotes. Les figures 2 et 3 représentent des frottis sanguins de souris infestées de *Trypanosoma brucei brucei*. Dans la figure 3, les trypanosomes ont été soumis à l'action de l'Antrycide (clichés repris de HENKINET, 1986).

La figure 4 représente un schéma de l'ultrastructure des Trypanosomatidae.

1.2. Chimiothérapie.

1.2.1. Aperçu historique.

En 1902, LAVERAN et MESNIL montrèrent que le cytoplasme de *T. brucei gambiense*, suite à l'action de l'arsénite de sodium présente de nombreuses granulations chromatiques.

De semblables observations furent faites par THOMAS en 1905 avec l'Atoxyl et de Trypan rouge.

Dans la première partie de ce siècle, des composés trypanocides plus actifs furent mis au point par EHRLICH à Francfort et par MESNIL et NICOLLE à Paris.

Au cours de ces cinquantes dernières années, un grand nombre de substances furent testées. Mais seuls certains produits se sont révélés actifs et furent utilisés couramment pour le traitement de la maladie de sommeil et du Nagana. WILLAMSON en 1979 a établi une classification de médicaments trypanocides. Sa classification est basée essentiellement sur le caractère ionique et secondairement sur la structure chimique de ces substances.

Durant ces vingt dernières années, l'utilisation de drogues plus anciennes diminua suite à l'accroissement de souches résistantes et à la toxicité de certaines drogues (MESHNICK, 1984 ; WILLIAMSON, 1976).

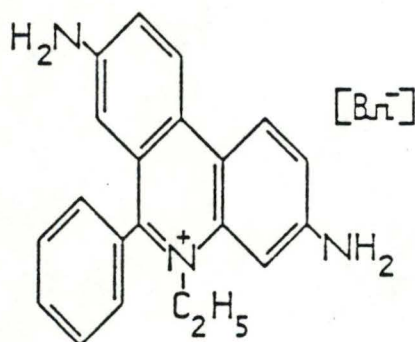
A ce moment, l'accent fut tourné vers la biochimie des trypanosomes. L'identification de différences biochimiques entre l'hôte et le parasite permet la mise au point de nouveaux médicaments. Ainsi, le système de la glycérol phosphate oxydase, système important pour le trypanosome et inexistant chez l'hôte vertébré, représente une cible pour l'acide salicylhydroxamique (SHAM) (BARNICOT et al., 1981 ; MESHNICK, 1984 ; OPPERDOES et al., 1975)

La voie de synthèse des polyamines représente une cible pour l'action d'agents chimiothérapeutiques. Ainsi, le DFMO (Difluorométhylornithine) est un puissant inhibiteur de l'ODC (Ornithine Décarboxylase) (GIFFIN et al., 1986).

1.2.2. Présentation des drogues utilisées

1.2.2.1 Bromure d'éthidium

3-8-diamino-5-éthyl-6-phénylphénantridium bromide



Le Bromure d'éthidium (B.E.) est un des composés les plus actifs parmi les aminophénantridines. Il a d'abord été testé pour son activité thérapeutique dans les affections dues aux trypanosomes du fait de l'isomérisme de la phénanthridine avec le noyau acridine de l'Acriflavine. Il a été utilisé de façon intensive dans le traitement des trypanosomes du bétail en Afrique de l'Ouest. Cette substance est, tout comme l'Acriflavine devenue un outil courant dans les études métaboliques depuis la démonstration de son effet inhibiteur spécifique sur la synthèse du DNA (NEWTON, 1957). C'est une molécule fluorescente et c'est également une drogue antimicrobienne.

Les données concernant ses effets sur la structure fine d'une variété de cellules tant d'origine animale que végétale sont beaucoup plus nombreuses que celles sur les trypanosomes. Pourtant, le Bromure d'éthidium était à l'origine destiné à éliminer les trypanosomes car il agit de façon spécifique sur le DNA du noyau et du cinétoplaste. Il a donc été utilisé dans le traitement des trypanosomiasis humaines et animales. Mais sa toxicité (voir ci-dessous) est telle que depuis plus de trente ans, il n'est guère plus utilisé chez l'homme. Il est toutefois encore utilisé en médecine vétérinaire dans certaines zones d'endémie en Afrique.

1. Mode d'action

Le Bromure d'éthidium forme aisément des complexes avec le DNA et agit sur les trypanosomes en bloquant la synthèse d'acides nucléiques au niveau de cinétoplaste et bloque aussi certaines synthèses de protéines.

2. Sélectivité

Les inhibiteurs de la synthèse d'acides nucléiques peuvent se lier à des DNA de n'importe quelle source. La sélectivité semble être une fonction de la perméabilité : la drogue pénétrerait davantage dans le protozoaire que dans les cellules de l'hôte (GUTTERIDGE et COOMBS, 1977).

3. Toxicité

La toxicité du B.E. présente plusieurs aspects : photosensibilisation, dermatite, alopecie, larmolement, nécrose tissulaire à l'endroit de l'injection et atteinte médullaire (agranulocytose) lors de longs traitements (STECK, 1972).

4. Effets sur *Trypanosoma congolense*, *T. brucei*, *T. vivax*

Le B.E. provoque chez ces espèces une dilatation très marquée de l'espace intermembranaire du noyau, suivie par la rupture et la fragmentation du nucléoplasme.

Il se forme également des agrégats de ribosomes laissant des espaces vides dans le cytoplasme.

Par ailleurs, les structures du système mitochondrial (cinétoplaste et mitochondrie) disparaissent très vite, ce qui suggère qu'elles sont une des premières cibles du B.E.

Seuls le flagelle et la membrane cellulaire semblent échapper à l'action du B.E. (TOURE, 1971)

HENKINET, en 1986, a montré par une étude morphologique chez *Trypanosoma brucei* que le Bromure d'éthidium induisait l'apparition de vacuoles d'autophagies. Il a également observé que la membrane cellulaire, la poche flagellaire et le flagelle, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique ne montraient pas d'altérations visibles.

Après avoir injecté une dose de 2,5 mg par kg de B.E., 26 heures après avoir inoculé les trypanosomes à des souris, il a précisé que le nombre de trypanosomes augmentait tout en restant inférieur à la courbe de parasitémie.

48 heures après l'injection du B.E., le nombre de trypanosomes régressait quelque peu mais pour une courte durée (< 5 heures).

5. Effets sur *Trypanosoma rhodesiense*

Selon MACADAM ET WILLIAMSON en 1974, le principal changement morphologique produit sous l'action du B.E. se localise au niveau du cinétoplaste où le DNA se condense, tandis que la lumière mitochondriale se dilate avec quelques enroulements membranaires. Ces auteurs n'ont pas fait d'études biochimiques.

La base de la sensibilité sélective du kDNA au B.E. et aux autres trypanocides cationiques repose probablement dans la combinaison de facteurs tels la forme circulaire, l'absence

d'histones, la position adjacente à la poche flagellaire très active au point de vue phagocytose (JADIN, 1970 ; STEINERT, 1971 ; WILLIAMSON et al., 1975).

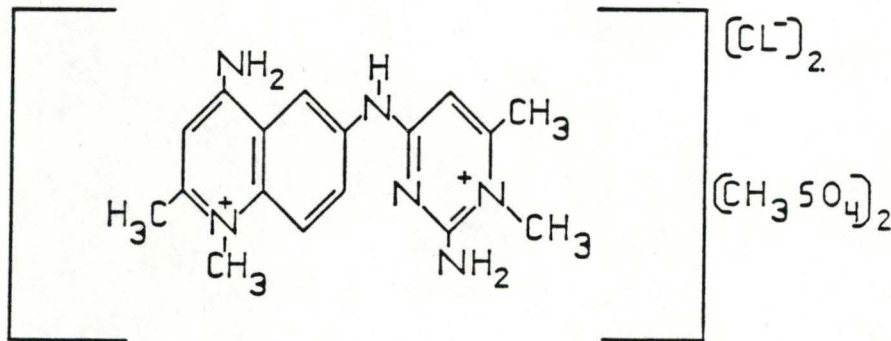
DELAIN et al., en 1971, notèrent que le mode de liaison de la drogue peut affecter le type de condensation du kDNA.

Etant donné qu'il n'y a pas d'autres effets sur les membranes que ceux observés sur celle de la mitochondrie, la dilatation de cette dernière est probablement à mettre en relation avec l'action spécifique du B.E. sur le cinétoplaste, ce qui interfère probablement avec la synthèse de la membrane mitochondriale ou altère l'environnement ionique auquel les mitochondries sont en général particulièrement sensibles (CHARRET, 1972)

Le B.E., en commun avec d'autres drogues cationiques est capable de réagir avec des groupes intracellulaires anioniques autres que ceux des acides nucléiques. Les plus importants sont les phospholipides membranaires. Par ce moyen, il y a entrée facilitée des drogues solubles dans l'eau et totalement ionisées à l'intérieur et au travers des lipides de membrane. Cela conduit à des dommages intracellulaires, tels que dilatation de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique.

1.2.2.2 L'Antrycide

4-amino-6-[(2-amino-1,6-diméthyl-pyrimidium-4-yl.) amino] quinolinium diméthosulfate.



L' Antrycide ou quinapyramine est soit sous la forme d'un sel fraîchement soluble (chlorure ou diméthosulfate) soit le plus souvent sous la forme d'un mélange de ces deux sels. C'est ce mélange qui est commercialisé sous le nom d'Antrycide prosalt.

1. Mode d'action

L'Antrycide n'agit pas comme le B.E. en ayant comme cible la synthèse de l'ADN ou de l'ARN dépendant de l'ADN, mais l'Antrycide, déplaçant des ions magnésium et des polyamines, inactive et agrège les ribosomes, ce qui a pour effet de bloquer la synthèse des protéines et donc la croissance des trypanosomes (GUTTERIDGE et COOMBS, 1977).

2. Sélectivité

In vitro, les ribosomes de mammifère s'agrègent avec la même intensité que ceux des trypanosomes. Il semblerait donc que le mécanisme de toxicité sélective soit du à une perméabilité sélective.

3. Toxicité

L'Antrycide peut provoquer chez le bétail de la transpiration excessive, de la salivation, des tremblements, une augmentation du rythme cardiaque et respiratoire et un affaiblissement temporaire. Certains animaux, ayant subi un rétablissement apparent, peuvent mourir de cette drogue, suite à des gastroentérites hémorragiques, d'oedèmes pulmonaires et péricardiques et des insuffisances rénales (STECK, 1972)

4. Effets sur *Trypanosoma congolense*, *T. brucei*, *T. vivax*

Les effets de l'Antrycide sur ces trypanosomes sont semblables à ceux produits par l'éthidium, excepté qu'ils sont produits plus lentement et le noyau est moins altéré (TOURE, 1971).

HENKINET en 1986, a montré qu'une injection de 7,5 mg/kg d'Antrycide, 72 heures après avoir inoculé les trypanosomes (*Trypanosoma brucei*) à des souris induit un ralentissement prononcé de la multiplication des trypanosomes. Des valeurs proches du nombre maximal lors d'une trypanosomiase normale sont atteintes après 36 heures de traitement. Ensuite, le nombre de trypanosomes diminue et on n'en trouve plus au niveau sanguin après 62 heures d'action.

Il a été également observé l'apparition de vacuoles subissant un processus d'autophagie. Parfois, des fragments membranaires y ont été retrouvés.

5. Effets sur *Trypanosoma rhodesiense*

L'Antrycide produit une dilatation considérable de la mitochondrie. Cette dilatation est semblable à celle décrite pour le B.E.

L'Antrycide provoque également des altérations au niveau du kDNA. Des expériences récentes ont montré qu'une dose curative d'Antrycide administrée à des souris infestées de *Trypanosoma rhodesiense* peut produire jusqu'à 31% de formes dyscinétoplastiques, 6 heures après le traitement et jusqu'à 46% après 22 heures.

L'attaque sélective de l'Antrycide sur le kDNA s'explique probablement par les mêmes raisons que celles décrites pour le B.E. (MACADAM et WILLIAMSON, 1974).

L'Antrycide produit une condensation terminale et discoïde du kDNA (DELAIN et al, 1971).

La nature exacte de la liaison Antrycide - DNA n'est pas connue.

L'Antrycide ne vise pas la synthèse du DNA ou de l'ARN dépendant de DNA. En effet, la structure nucléaire et nucléolaire n'est pas altérée.

1.3. Etudes biochimiques

1.3.1. Fractionnement subcellulaire

La technique utilisée est une technique destructive.

Elle comprend deux étapes :

- Homogénéisation des cellules et exposition de leur contenu à un environnement artificiel.
- Séparation de l'homogénat en différentes fractions et l'analyse subséquente de ces fractions. C'est le fractionnement cellulaire.

L'inconvénient de cette technique est que l'information est obtenue à partir de composants subcellulaires qui sont présents dans les fractions finales et cela ne représente pas nécessairement la situation in vivo.

Dans le fractionnement subcellulaire, deux approches peuvent être faites. L'approche préparative : elle s'intéresse à la purification d'un composant particulier de la cellule. Les techniques utilisées alors fournissent des informations sur un seul constituant cellulaire et conduisent éventuellement à la purification de celui-ci. En général, aucune information n'est obtenue sur les autres constituants.

L'approche analytique quantitative : c'est celle qui sera utilisée dans ce travail. Un homogénat cellulaire est fractionné en ses différents composants. Les propriétés les plus couramment utilisées sont le coefficient de sédimentation et la densité d'équilibre. Après le fractionnement, le matériel est récupéré quantitativement et simultanément avec l'homogénat soumis à des analyses biochimiques.

a) Principe de la centrifugation différentielle

Il faut séparer les organites les uns des autres.

Cette séparation est basée sur la formule de SVEDBERG. Toute particule sphérique soumise à un champ centrifuge subit un déplacement dont la vitesse est égale à

$$\frac{dx}{dt} = \frac{2r^2 (\rho_p - \rho_m)}{9\eta} w^2 x$$

où x représente la distance par rapport à l'axe de rotation (cm)

W : la vitesse angulaire (radian x sec⁻¹)

t : le temps de la centrifugation (sec)

r : le rayon de la sphère (cm)

ρ_p : la densité de la particule (g x cm⁻³)

ρ_m : la densité du milieu (g x cm⁻³)

η : la viscosité du milieu (poises).

Il est généralement admis que les organites cellulaires se comportent en centrifugation différentielle comme des particules sphériques.

Les organites sont donc séparés les uns des autres principalement, en fonction de leur différence de taille, la vitesse est en effet proportionnelle au carré du rayon de la particule.

La densité intervient, elle, d'une façon plus ou moins importante mais non négligeable, notamment dans la séparation de deux organites de même diamètre.

Afin de mieux décrire et d'une façon plus directe le comportement d'une particule en centrifugation, on définit un coefficient de sédimentation selon l'équation :

$$S = \frac{v}{W^2 x} = \frac{2 r^2 \rho_p - \rho_m}{9 \eta}$$

La vitesse de sédimentation devient alors :

$$V = SW^2 x$$

Elle croît linéairement le long du tube puisque x augmente au fur et à mesure que la particule migre vers le fond de celui-ci.

Si l'on tient compte de l'accélération que subit une particule dans un champ gravifique, la force centrifuge est égale à :

$$g = \frac{W^2 x}{981}$$

b) Postulat d'homogénéité biochimique

Le postulat d'homogénéité biochimique de de DUVE (1967), nous permet d'extrapoler les résultats des mesures enzymatiques aux organites eux-mêmes puisque, selon ce postulat,

la quantité d'enzymes présents dans un organite est constante au sein d'une même population. De même toujours selon ce postulat, un enzyme donné n'est présent que dans un seul type de granule.

Dans le cas des lysosomes, de la phosphatase acide et de l' α -D-mannosidase, il semblerait que ce ne soit pas tout à fait exact et qu'il faille étendre la conception de lysosomes, non seulement aux lysosomes primaires, vacuoles autophagiques, mais également à tous les éléments du GERL (Golgi - Endoplasmic- Réticulum - Lysosomes) (NOVIKOFF, 1973) pour que le postulat reste valable (FAVARD, 1978).

L'unité d'activité de la plupart des enzymes est définie comme étant la quantité d'enzymes capable de dégrader une μ mole de substrat par minute dans les conditions du dosage.

1.3.2. Choix des enzymes dosés

Il existe peu d'enzymes pouvant servir de marqueurs pour les différents composants subcellulaires chez les formes sanguines de *Trypanozoma brucei brucei*, ce qui limite sévèrement les analyses biochimiques après fractionnement subcellulaire (OPPERDOES et al., 1977, a).

Leur promitochondrie étant métaboliquement inactive, manque d'un cycle de KREBS fonctionnel et de cytochromes (BOWMAN et al., 1976). De même, tous les marqueurs typiques des peroxisomes et microsomes connus pour les eucaryotes supérieurs (ex : catalase, urate oxydase) sont présents en quantité très faible (OPPERDOES et al., 1977, b). Cependant, il a été assigné à la promitochondrie la glycérol-3-phosphate oxydase (OPPERDOES et al., 1977, c).

Un certain nombre d'enzymes de la glycolyse, dont l'hexokinase et la glucose phosphate isomérase, ont été associés à des microsomes : les glycosomes (OPPERDOES et al., 1977, a et c).

Trypanosoma brucei est aussi pauvre en hydrolases acides (STEIGER, 1979).

En effet, la plupart des hydrolases présentes chez les encaryotes supérieurs sont aussi absentes ou leur taux d'activité est trop faible que pour être utile dans des expériences de fractionnement cellulaire.

STEIGER et al. (1980) ont tenté de caractériser un certain nombre d'hydrolases et en ont donné une localisation probable chez *Trypanosoma brucei*. Ces enzymes sont des marqueurs plus ou moins valables. Nous en avons choisi six.

Un enzyme marqueur des lysosomes : α -D-mannosidase (EC3.2.1.24).

Un enzyme localisé au niveau des lysosomes, de la poche flagellaire et des tubules digestifs : la phosphatase acide (EC 3.1.3.2).

Un enzyme marqueur de la membrane plasmique : α -D-glucosidase (EC 3.2.1.20), l'hexokinase (EC 2.7.1.1.) présente uniquement dans les glycosomes et la glucose phosphate isomérase (G.P.I.) présente en partie dans les glycosomes et dans le cytosol.

Nous avons également choisi un enzyme presque totalement soluble, c'est-à-dire présent en grande majorité dans le cytosol : l'alanine amino transférase (EC 2.6.1.2).

Nous n'avons pas jugé utile de doser un enzyme de la promitochondrie, métaboliquement non active. Il aurait été intéressant de doser un enzyme marqueur du Golgi, la galactosyl transférase par exemple.

1.3.3. Localisation intracellulaire, fonctions et propriétés de latence des enzymes dosés

Les organites renferment des enzymes qui ne peuvent être actifs tant que les membranes s'opposent à l'entrée du substrat. C'est ce qu'on appelle la latence enzymatique. Cette latence disparaît si la membrane est rompue : les enzymes sont libres. L'activité libre reflète donc l'état des membranes, elle est généralement faible. Différents traitements chimiques ou physiques peuvent l'accroître.

L'activité totale mesurée lorsque toutes les membranes sont rompues, le plus souvent sous l'action d'un détergent (Triton x-100) représente l'activité maximale : la totalité de l'enzyme est libéré.

Le tableau I reprend le comportement de six enzymes particulières et solubles du T. b. brucei durant le fractionnement sucellulaire et leur localisation probable selon STEIGER et al., (1980).

Phosphatase acide

Dans les trypomastigotes sanguins, la phosphatase acide est en partie localisée dans la lumière de la poche flagellaire et partiellement associée avec des membranes intracellulaires comprenant des structures telles que le réticulum endoplasmique, le système membranaire collecteur et des tubules digestifs ainsi que les lysosomes. Cette localisation est basée sur des preuves aussi bien biochimiques (STEIGER et al., 1980 ; LANGRETH et al, 1975) que cytochimiques (JADIN, 1971). L'argument biochimique pour une localisation dans la poche flagellaire est que, dans les cellules intactes, une partie de la phosphatase est accessible à son substrat par une barrière de diffusion (STEIGER et al, 1980).

La phosphatase acide joue un rôle important dans la nutrition des formes sanguines des trypanosomes. Les macromolécules qui entrent dans la poche flagellaire doivent subir une prédigestion avant de pénétrer dans le cytoplasme, par pinocytose ou par transport actif.

Enzymes	Enrichissement					Localisation probable
	N	M	L	P	S	
Phosphatase acide	+	++	+++	++++	-	Poche flagellaire et Réticulum endoplasmique
α -d-Glucosidase	+++	+	++	+++	-	Membrane plasmique
α -d-Mannosidase	+	++++	++++	++	-	Lysosomes
Hexokinase	+	++++	++++	+++	-	Glycosomes
Alanine amino transférase	-	+	+	-	+++	Cytosol

Tableau I : Tableau représentant le comportement des enzymes particulières et solubles de *T. b. brucei* durant le fractionnement subcellulaire et leur localisation probable selon STEIGER et al., (1980).

Activité spécifique relative	
-	< 0.55
+	> 0.55; < 1.05
++	> 1.05; < 1.55
+++	> 1.55; < 2.05
++++	> 2.05

En centrifugation différentielle, la plus grande activité spécifique relative se retrouve dans la fraction microsomale, ceci serait en faveur d'une localisation au niveau d'un système membranaire subcellulaire.

Dans les cellules intactes, la phosphatase acide est fortement accessible à son substrat (LANGRETH et al, 1975). Dans l'extrait cytoplasmique, la latence est considérablement augmentée par rapport aux cellules intactes. Ceci a été interprété comme un artéfact du à l'homogénéisation. Le broyage des trypanosomes avec des grains abrasifs de silice provoque probablement la formation de vacuoles à partir de la poche flagellaire, de telle façon que la phosphatase acide, normalement accessible dans la poche intacte délimitée par des desmosomes, ne le soit plus à son substrat.

La membrane plasmique des trypanosomes est connectée avec des microtubules subpelliculaires (ANGELOPOULOS, 1970) et est conservée après homogénéisation (VOORHEIS et al, 1979). Elle est en continuité avec la membrane de la poche flagellaire durant l'homogénéisation.

α -D-mannosidase

Cet enzyme se comporte de la même manière que les enzymes lysosomiaux chez les autres organismes.

Il montre une latence de structure considérable dans l'extrait cytoplasmique. Environ 12% de l'activité de cet enzyme est libéré après traitement avec 0,1% de Triton X-100 sur l'extrait cytoplasmique.

En centrifugation différentielle, l' α -D-mannosidase est localisée essentiellement dans la fraction SG.

L' α -D-mannosidase chez les formes sanguines interviendrait dans le renouvellement des glycoprotéines de surface.

α -D-glucosidase neutre

Il semblerait qu'il soit le meilleur enzyme marqueur pour la membrane plasmique. Il est hautement accessible à son substrat dans l'extrait cytoplasmique et la majeure partie est associée à la membrane et donc sédimentable.

L'enzyme est complètement solubilisé après traitement avec 0,1% Triton X-100, ce qui suggère que l' α -D-glucosidase ne serait pas fermement attachée à la surface. De plus, elle possède un pH optimum neutre.

Une autre indication qui confirme sa présence probable sur la membrane plasmique est que

la moitié de l'activité totale se retrouve dans la fraction nucléaire dans laquelle se trouve principalement des cellules entières et des fantômes de cellules.

Les trypanosomes semblent manquer d' α -D-glucosidase acide. Il semble que l' α -D-glucosidase neutre intervienne dans le renouvellement des glycoprotéines de surface des formes sanguines des trypanosomes africains. (CROSS, 1975).

Hexokinase et glucose phosphate isomérase

Chez les formes sanguines de *Trypanosoma brucei*, une partie de la glycolyse prend place dans un organe subcellulaire : le glycosome.

Le glycosome intervient comme unité catalytique de la glycolyse et inclut donc une partie des enzymes intervenant dans la glycolyse.

La glucose phosphate isomérase n'utilise que les hexoses phosphates comme substrats et la membrane des glycosomes leur est imperméable. Mis à part la membrane du glycosome, il existe une barrière supplémentaire pour les intermédiaires de la glycolyse dans le glycosome. Dans le cas de l'hexokinase, cette barrière se comporte comme une barrière de diffusion.

Ces observations faites par NWAGWU et al., en 1982, leur ont suggéré l'existence d'une compartimentation dans le glycosome et que les enzymes de la glycolyse dans les glycosomes étaient fermement associés aux constituants de cet organe. L'hexokinase serait fortement associée au corps cristalloïde alors que la glucose phosphate isomérase est facilement solubilisée et dès lors serait plutôt un enzyme matriciel du glycosome.

L'hexokinase et la glucose phosphate isomérase montrent un maximum d'activité spécifique relative dans la fraction SG après fractionnement par centrifugation différentielle. La GPI possède cependant une grande proportion d'activité soluble. Cet enzyme serait donc en partie cytoplasmique. HART et OPPERDOES en 1984, suggérèrent sa participation dans le cycle cytosolique des pentoses phosphates.

Alanine amino transférase

Dans les formes sanguines de *Trypanosoma brucei*, l'alanine amino transférase est considérée comme un marqueur du cytosol car 80% de son activité est localisée dans le surnageant final. Son activité élevée est probablement nécessaire pour la conversion du pyruvate produit par la glycolyse, en alanine.

CHAPITRE 2 : BUT DU TRAVAIL

Le but de ce travail est de faire une étude biochimique comparative de certaines anomalies provoquées au niveau d'organites cytoplasmiques de *Trypanosoma brucei brucei* soumis à l'action de deux drogues intercalantes :
le Bromure d'éthidium et l'Antrycide.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de recherches déjà effectuées au laboratoire de parasitologie à propos de ces deux drogues.

En 1986, Robert HENKINET s'est particulièrement intéressé aux anomalies morphologiques au niveau subcellulaire, induites par ces deux substances.

Constatant combien les données biochimiques de la littérature sont abondantes en ce qui concerne le noyau et minimes en ce qui concerne les organites cytoplasmiques, c'est uniquement à ces derniers que nous nous sommes intéressés.

Nous considérons que ce travail devrait être suivi par d'autres études biochimiques, comme le fractionnement cellulaire sur gradient de saccharose.

Ce dernier permettrait de séparer les différents types de populations d'un même organite selon leur densité et d'analyser leur comportement suite à l'action des drogues.

CHAPITRE 3 MATERIEL ET METHODES

3.1 Souches de parasite et hôtes vertébrés utilisées.

3.1.1 Les hôtes vertébrés.

Nous avons utilisé des souris NMRI et des rats WISTAR mâles, tous deux disponibles à l'animalerie de la Faculté des Sciences. Ces souris et rats avaient nourriture et boisson "ad libitum". Le sexe des souris employées n'a pas été pris en considération dans nos expériences.

3.1.2 Le parasite.

Il s'agit du genre *Trypanosoma brucei brucei* et de la souche LUMP 127.

Cette souche a été isolée par des chercheurs de l'EATRO en 1962 au Kenya chez une antilope.

Elle a été testée sur des volontaires humains, puis a été remise au Professeur W.H.R .

LUMSDEN, à l'époque directeur du Département de Protozoologie Médicale de l'Institut de Médecine Tropicale de Londres. Elle a été remise au Docteur J.M. JADIN en 1971 et a été depuis lors conservée en azote liquide. Après plusieurs passages mécaniques de souris à souris, elle tue les souris en 3 à 4 jours.

3.1.3 Entretien de la souche de trypanosome

Il s'effectue par passages mécaniques répétés tous les 3 ou 4 jours. Cela se réalise par injection intrapéritonéale de sang infesté dilué dans du tampon PBS sur des souris ou des rats sains.

Formule du PBS.(Phosphate Buffer Saline)

Solution A: 21,25 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (P.M.:137.99) pour 1000 ml d' H_2O

Solution B: 18,30 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (P.M.:177.99) pour 1000 ml d' H_2O

Ces 2 solutions sont ensuite mélangées selon les proportions suivantes: 1,36 volume de solution A et 8.64 volumes de solution B (LUMSDEN et al.,1973). La quantité injectée est de 0,5 ml par souris et de 1 ml par rat.

3.2 Injection des drogues

Les drogues utilisées se présentent sous forme de poudre et sont diluées dans du PBS avant d'être injectées en une seule fois par voie intrapéritonéale.

Les doses injectées sont celles citées par WILLIAMSON, (1979).

Toutes les expériences ont été réalisées après une seule injection.

Le temps séparant l'inoculation des trypanosomes et l'injection des drogues varie en fonction de l'action plus ou moins efficace de la drogue utilisée.

3.3 Etudes biochimiques.

3.3.1 Croissance et isolement des trypanosomes.

Trypanosoma brucei brucei LUMP 127 produit une parasitémie élevée en ($>10^9$ tryp./ml de sang) en 3 à 4 jours après l'inoculation de 10^6 à des rats mâles d'environ 300 g.

Le sang de 4 rats hautement infestés est récolté par ponction cardiaque, et on utilise de l'héparine comme anticoagulant. Les rats sont préalablement endormis à l'éther. Les trypanosomes sont séparés des éléments sanguins par chromatographie échangeuse d'ions sur une colonne de DEAE- cellulose selon LANHAM et GODFREY, (1970).

L'éluat est centrifugé (10 min., 1000 x g) et le culot blanc de trypanosome est lavé 3 fois avec du tampon STE préalablement refroidi dans de la glace et contenant 0,25 M de Saccharose, 25mM Tris-HCl et 1mM d'EDTA (pH7,8).

Le dernier lavage est réalisé à 2000 x g pendant 10 minutes afin d'obtenir un culot contenant un minimum de liquide et ainsi éliminer un maximum de protéines plasmatiques.

3.3.1.1 Récolte du sang des rats par ponction cardiaque

Pour la préparation de stabilats ou pour le démarrage de cultures, il est nécessaire que le sang infesté soit récolté dans des conditions stériles, par exemple par ponction cardiaque. Pour des études biochimiques, il n'est pas alors indispensable de prendre des précautions aseptiques.

Ponction cardiaque en conditions non stériles

a. Un Erlenmeyer est rempli avec du PSG (1,5 ml pour chaque rat de 300g). On y ajoute 0,1 ml d'héparine (5000 U/ml) par rat . L'héparine et le PSG sont ensuite mélangés . Un deuxième Erlenmeyer, qui contiendra le sang, est rincé avec la solution de PSG-héparine. Les deux récipients sont placés dans de la glace.

b. Le rat est alors anesthésié dans une jarre contenant un coton imbibé d'éther.

c. On étale ensuite l' animal sur une planche à dissection face ventrale vers le haut.

d. Une incision est réalisée au dessus de la partie inférieure du xiphisternum, sans entrer dans la cavité péritonéale. La peau est coupée de part et d'autre du xiphisternum vers l'axillaire. Celle-ci est ensuite écartée et fixée sur la planche.

e. Les côtes sont alors découpées des deux côtés du sternum et la cage thoracique est

soulevée. Le coeur doit , en principe, battre encore fortement.

f. A l'aide d'une seringue de 10 ml contenant environ 1ml de solution de PSG-héparine, le sang est récolté en insérant l'aiguille dans le ventricule gauche et en aspirant doucement le sang . Dix millilitres de sang peuvent facilement être récoltés par rat de 300 g.

g. Après retrait de l'aiguille, la seringue est retournée plusieurs fois afin de mélanger l'héparine et le sang. Le sang est déchargé dans le récipient vide. L'aiguille est préalablement retirée de la seringue afin d'éviter toute hémolyse mécanique. Le sang est à nouveau mélangé.

3.3.1.2. Purification des trypanosomes selon la méthode de LANHAM

Cette méthode de purification est basée sur une différence de charge de surface entre les cellules sanguines de l'hôte et les trypanosomes. Les cellules sanguines portent une charge globale plus négative que celle des trypanosomes. Il est alors possible sous certaines conditions de pH et de force ionique d'absorber les cellules sanguines de l'hôte sur une colonne échangeuse d'anions chargée positivement (DEAE cellulose). Les trypanosomes s'éluant au travers de la colonne restent vivants et conservent leur pouvoir infectieux. (LANHAM, 1968 ; LANHAM et GODFREY, 1970).

Matériels

DEAE cellulose : whatman DE-52

Tampon PS. : Na_2HPO_4 anhydre84,3 g ($2\text{H}_2\text{O}$105.6 g)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4,3 g ($2\text{H}_2\text{O}$ 4.9 g)

NaCl 26.6 g

On porte à 10 l. avec de l'eau distillée. Le pH doit être de 8.

PSG : on ajoute du glucose au tampon PS pour avoir une concentration finale de 10g /l.

PS-AZIDE : 0,2 g NaN_3 / litre de PS

H_3PO_4 : 5%

NaCl : 0.5 M (5%)

Préparation de la DEAE -cellulose

La cellulose est resuspendue dans du tampon PS (pH±11). On ajuste alors le pH à 8 en ajoutant du H₃PO₄ (5%) et en mélangeant. Le surnageant de la cellulose sédimentée est éliminé. La cellulose est ainsi lavée à plusieurs reprises dans du tampon PS jusqu'à ce que le pH et la conductivité de la suspension de cellulose soient identiques à celle du tampon PS.

Préparation de la colonne

La cellulose fraîchement préparée est versée dans la colonne (entonnoir en verre de 500 ml muni d'un filtre en verre fritté de porosité 1). La cellulose est ensuite lavée plusieurs fois avec du PSG. Il faut un volume en cellulose environ 12 fois supérieur au volume de sang ajouté.

Elution des trypanosomes

Le sang infesté est versé délicatement à la surface de la cellulose. Dès que le sang a complètement pénétré la cellulose, on verse délicatement quelques millilitres de PSG.

Il faut s'assurer qu'il y ait en permanence un à plusieurs centimètres de ce tampon au-dessus de la cellulose. L'éluat est récolté dans un récipient placé dans de la glace. Si un nombre suffisant de trypanosomes sort de la colonne, l'éluat doit être opalescent ou laiteux. La présence d'un plus petit nombre de trypanosomes peut être vérifié par l'examen d'une goutte d'éluat au microscope à contraste de phase. L'éluat est ensuite centrifugé à 1000 xg pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot de trypanosomes est lavé deux fois dans les mêmes conditions afin de retirer le plus possible de protéines plasmatiques.

Recyclage de la colonne

La colonne est rincée abondamment avec du Na Cl 0,5 M jusqu'à ce que la couleur rouge ait disparu. La cellulose est rééquilibrée avec du tampon PS. Le pH doit être de 8.

Réutilisation de la colonne

Le jour précédant l'expérience, on prévient la multiplication de bactéries ou de champignons en utilisant le PS-AZIDE à la place du PS.

Le jour de l'expérience, la colonne est rincée avec du PSG.

En procédant de cette manière, la DEAE cellulose peut être réutilisée environ 10 fois.

3.3.2 Fractionnement subcellulaire

Le fractionnement subcellulaire comprend deux étapes : l'homogénéisation et le fractionnement.

3.3.2.1 Homogénéisation

Les trypanosomes sont homogénéisés en les broyant avec des cristaux abrasifs de carbonate de silice essentiellement selon TONER et WEBER , (1972).

Après une dilution de 5-10x de la pâte résultante avec du tampon STE (0,25M Saccharose ; 25 mM Tris-HCl ; 1 mM EDTA ; pH 7,8), le mortier est éliminé de l'homogénat en centrifugeant à 100 xg pendant 3 minutes (900 rpm)

Le culot est lavé dans 10 ml de tampon STE. Les surnageants recombinés sont alors fractionnés par la méthode de centrifugation différentielle.

3.3.2.2 Fractionnement subcellulaire

La centrifugation différentielle est réalisée à l'aide d'une centrifugeuse Sorvall RC- 5b réfrigérée (4°C) et équipée d'un rotor SS-34. Pour l'étape finale à 40000rpm, nous avons utilisé une ultracentrifugeuse préparative Beckman L5-50 munie d'un rotor n° 40 Le schéma séquentiel de la centrifugation est le suivant (fig 3.3.) : les cellules entières, noyaux et débris cellulaires sont sédimentés à 3000 rpm. (1000 xg) pendant 10 minutes (fraction N). A partir de l'extrait cytoplasmique résultant (surnageant post-nucléaire ou fraction E), on sépare une fraction à gros granules (LG) à 6500 rpm (5000 xg) pendant 10 minutes, une fraction à petits granules (SG) à 11000 rpm (14500 xg) pendant 10 minutes. La fraction microsomale (P) est séparée du surnageant final (S) à 40000 rpm (139000 xg) pendant une heure. Les volumes de chaque fraction sont soigneusement mesurés. Les culots des fractions N, LG, SG sont resuspendus dans du tampon STE (3 à 7 ml) à l'aide d'un homogénéisateur de Dounce muni d'un piston "Loose" (5 à 10 passages selon les fractions). Dans un tel homogénéisateur, les forces de cisaillement exercées sur les organites lors du passage du piston s'appliquent en un seul point, ce qui rend le procédé peu lésant.

3.3.3 Mesures enzymatiques.

Nous avons mesuré les activités de différents enzymes considérés comme enzymes de référence à l'I.C.P. Nous avons dosé la phosphatase acide, l' α -d-Mannosidase (ROBINSON et al., 1969 ; PETERS et al., 1972), l'hexokinase (BERGMEYER, 1962), la glucose phosphate isomérase (BERGMEYER, 1962) et l'alanine amino transférase. Ces dosages sont réalisés essentiellement selon les méthodes publiées. Tous ces dosages sont réalisés dans des conditions optimales de pH, de concentration en substrat, de concentration en protéines, temps d'incubation (linéarité) et d'effecteurs (cations, EGTA, Sucrose, Triton X-100 et co-facteurs). Ces conditions sont reprises dans le tableau intitulé "Conditions des dosages enzymatiques".

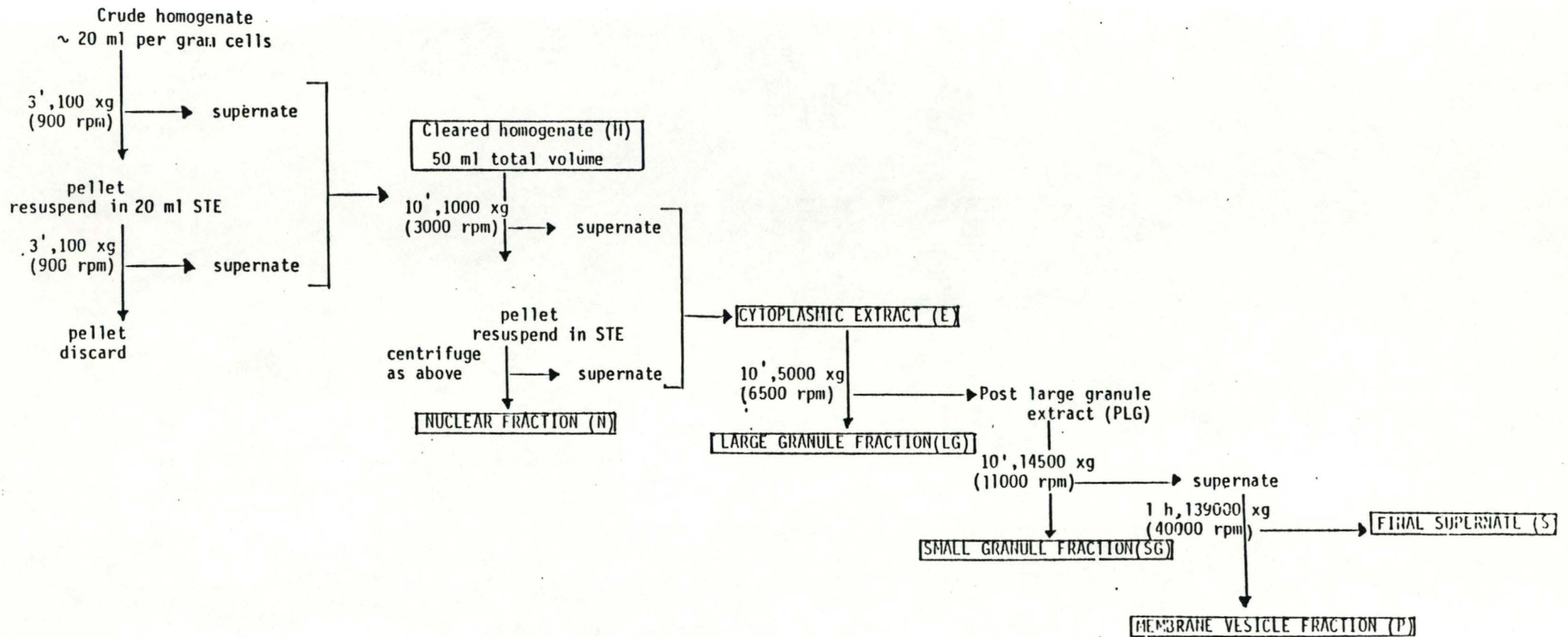


Fig.3.3 : Schéma de la centrifugation différentielle selon de DUVE (1964) modifié à l'ICP par OPPERDOES et al. (1976)

Conditions des dosages enzymatiques

Enzyme	Température	Temps d'incubation	Substrats	Concentration finale dans la mixture(mM)	[Tampon] et pH	Additifs	Mesure
Phosphatase acide	37°C	14 min	MeUmb-P	10	Acétate 0.1 M pH 5	0.1 % Triton X-100	F*-MeUmb
α -d-Manno- sidase	37°C	60 min	MeUmb-a- d-Man-p	10	Citrate 0.1 M pH 4.6	0.1 % Triton X-100 1mM MgAc2	F*-MeUmb
α -d-gluco- sidase	37°C	60 min	MeUmb-a- d-Glcp	2	Phosphate 0.1 M pH 7.0	0.1 % Triton X-100 10 mM dithiothreitol	F*-MeUmb
Hexokinase	25°C	3 min	Glucose	10	Triéthanol- amine 0.1M pH 7.6	0.1 % Triton X-100 10 mM MgCl2 0.63 mM NADP 0.72 mM ATP 0.7 U/ml Test G6PDH	S*-NADPH
Glucose phospat- isomérase	25°C	3 min	Fructose-6-P	1.28	Triéthanol- amine 0.1M pH 7.6	0.1 % Triton X-100 7.2 mM MgCl2 0.38 mM NADP 0.7 U/ml Test G6PDH	S*-NADPH
Alanine amino transférase	25°C	3 min	L-alanine 2-Oxoglutarate	200 2	Triéthanol- amine 0.087M pH 7.6	0.1 % Triton X-100 0.2 mM NAD 13.75 U/ml Test LDH	S*-NADH

F*: longueur d'onde d'extinction = 366 nm ; longueur d'onde d'émission = 460 nm

S*: longueur d'onde = 340 nm

F: fluorimétrie; S: spectrophotométrie; MeUmb-, 4-méthylumbelliféryl; P: phosphate; MeUmb, 4- méthylumbelliférone

Les dosages spectrophotométriques ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre KONTRON, de type UVIKON 820 et les dosages fluorimétriques à l'aide d'un fluoro-microphotomètre AMINCO.

3.3.3.1 Méthodes employées pour les dosages.

1. Phosphatase acide

L'activité de la phosphatase acide est mesurée au fluorimètre par la libération de méthylumbelliférone à partir du méthylumbelliféryl - phosphate.

2. α -D-mannosidase

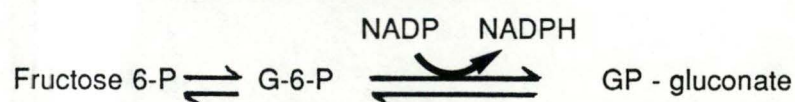
C'est le même principe que pour la phosphatase acide, excepté que le substrat est le 4-Méthylumbelliféryl- α -D-mannopyranoside.

Cet enzyme hydrolyse les résidus terminaux non réducteurs d' α -D-mannose en α -D-mannosides.

3. L' α -D-glucosidase

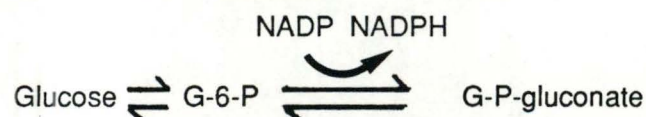
Elle hydrolyse les liaisons α 1,4 glycosidique sur une moitié terminale d'un glucose dans un oligosaccharide avec la libération d'un glucose. L'enzyme est mesuré par la libération de méthylumbelliférone fluorescent à partir du 4-méthylumbelliféryl- α -D-glucopyranoside.

4. Glucose phosphate isomérase



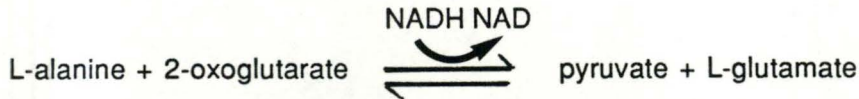
La formation de glucose-6-phosphate à partir du fructose-6-phosphate par l'action de l'isomérase est couplée à la formation d'une quantité équimoléculaire de NADPH. La production de NADPH est mesurée en continu à l'aide d'un spectrophotomètre enregistreur à 340 nm.

5. Hexokinase



C'est le même principe que la G.P.I. sauf que le substrat est le glucose.

6. Alanine amino transférase



La quantité de pyruvate produit dans la réaction est mesurée par la disparition du NADH à l'aide d'un spectrophotomètre à 340 nm.

3.3.3.2 Calculs et présentation des résultats.

Présentation des résultats.

Nous avons calculé pour chaque enzyme l'activité (milliunités dans la fraction / gr de protéines dans cette fraction) pour chaque fraction. La somme des valeurs trouvées pour N + LG + SG + P rapportée à l'activité de l'homogénat (E + N) permet de calculer la récupération. Une bonne récupération est une mesure de fiabilité du profil de distribution obtenu et donne donc une idée de la valeur du fractionnement et de la bonne conservation de l'activité enzymatique.

Nous avons également calculé les pourcentages d'activités corrigés de chaque fraction, c'est-à-dire

$$\frac{\text{activité totale dans la fraction}}{\text{la somme des activités totales des fractions N, LG, SG, P, S}} \times 100$$

Représentation graphique des résultats

Les résultats sont présentés en utilisant le procédé de DUVE et al., (1955) permettant de mettre en valeur les différentes répartitions enzymatiques dans le fractionnement.

En abscisse, on note les pourcentages de protéines

$$\frac{\text{Quantité totale de protéines dans la fraction}}{\text{Quantité de protéines dans la même fraction}} \times 100$$

de chaque fraction cumulés de gauche à droite dans l'ordre N, LG, SG, P, S. (somme = 100%).

En ordonnée nous avons placé l'activité spécifique relative égale à % activité de la fraction / par rapport à (E + N)

$$\frac{\text{\% de protéines de la fraction / par rapport à (E + N)}}{\text{\% de protéines de la fraction / par rapport à (E + N)}}$$

L'activité spécifique relative est donc le rapport entre l'activité spécifique d'un enzyme dans la fraction et l'activité spécifique de cet'enzyme dans l'homogénat. Elle donne donc une

mesure de la purification de l'enzyme et par conséquent du granule auquel il sert de référence.

Dans ce mode de représentation, chaque fraction est schématisée par un rectangle dont la hauteur est proportionnelle à la purification de l'enzyme et la surface au contenu enzymatique de la fraction.

3.4. Etudes en microscopie électronique des fractions subcellulaires de *Trypanosoma brucei brucei*.

- Un homogénat de trypanosomes est fragmenté par centrifugation différentielle en cinq fractions : N, LG, SG, P et S. La croissance et l'isolement des trypanosomes ainsi que l'homogénéisation et le fractionnement subcellulaire ont été décrits dans le paragraphe 3.3.
- Pour l'homogénat (H) et l'extrait cytoplasmique (E), nous avons prélevé un aliquot de 1,3 ml qui a été placé dans un tube de microfuge avec 0,2 ml de glutaraldéhyde 2,5 % dans du tampon PO_4 0,1 M à pH 7,2.

Tampon PO_4 0,1 M

a) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (P.M. : 138)

Solution 0,1M : 13,8 gr / 1000 cc

b) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (P.M. : 178)

Solution 0,1 M : 17,8 gr / 1000 cc

On prend 140 cc de a et on ajoute du b pour arriver à pH 7,2.

- Puis le tube a été centrifugé à la microfuge Beckman modèle B pendant 10 minutes. Le culot contenant une partie de l'homogénat et le culot contenant une partie de l'extrait cytoplasmique sont récupérés par découpe du fond du tube de la microfuge.
- Pour les fractions N, LG, SG, et P nous avons directement récoltés les culots de ces différentes fractions formés au cours de la centrifugation différentielle.
- Les culots sont ensuite fixés dans la glutaraldéhyde 2,5 % durant 2 heures 30. Remarque : Ces 2 heures 30 débutent au moment où la glutaraldéhyde est ajoutée aux aliquots de l'homogénat et de l'extrait cytoplasmique.
- Ensuite, les culots sont lavés 3 fois 10 minutes dans du tampon PO_4 0,2M PH7,2.
- La fixation est réalisée dans OsO_4 1% dans du tampon PO_4 0,1 M durant une heure.
- On relave à nouveau 3 fois 10 minutes dans du tampon PO_4 0,2 M.
- Le schéma de la déshydratation est le suivant :

alcool 50 ° : 1 x 10'

alcool 70 ° : 1 x 10'

alcool 90 ° : 1 x 10'

alcool 100°: 2 x 10'

- Inclusion : dans l' oxyde de propylène 4 x 10 minutes, puis dans le mélange oxyde de propylène / épon 2 x 15 minutes. Ensuite, le tout est placé à l'étuve à 37 ° durant 12 heures, à 47 ° durant 24 heures et à 60 ° durant 72 heures.
- Polymérisation : les sections sont effectuées à l'aide d'un ultratome Reichert Austria OMU 3.
- Coloration : les coupes semi-fines sont colorées au bleu de toluidine, les coupes ultrafines sont contrastées à l'acétate d'uranyl et au citrate de plomb (MILLONIG, 1961 ; REYNOLDS, 1963).
- Les grilles sont examinées au microscope électronique Philips EM 301 sous une différence de potentiel de 60 KV.

CHAPITRE 4 RESULTATS

4.1 Etudes biochimiques après fractionnement subcellulaire de *Trypanosoma brucei* isolés à partir de rats témoins

Dans nos expériences, nous avons travaillé à partir d'homogénats de trypanosomes provenant de rats mâles infestés depuis 3 à 4 jours, avec 10^6 trypanosomes. Ces homogénats ont été fragmentés par centrifugation différentielle en cinq fractions : nucléaire (N), à granules ayant un coefficient de sédimentation élevé (LG), à granules ayant un coefficient de sédimentation plus faible (SG), microsomale (P) et le surnageant (S).

Nos expériences nous ont amenés à mesurer l'activité de divers enzymes à localisation subcellulaire différente : la phosphatase acide localisée dans la poche flagellaire, les lysosomes, le reticulum endoplasmique (RE) et le Golgi (JADIN, 1971), l' α -D-mannosidase associée aux lysosomes, l' α -D-glucosidase située à la surface de la membrane plasmique (STEIGER et al., 1980), l'hexokinase et la glucose phosphate isomérase associées aux glycosomes, l'alanine amino transférase située dans le cytosol (OPPERDOES et al.;1977,a)

4.1.1 Arguments morphologiques montrant la qualité de l'homogénéisation et du fractionnement.

Nous avons réalisé un contrôle en microscopie électronique à transmission de toutes les fractions collationnées après centrifugation différentielle.

Quelques unes de ces fractions résumant les éléments essentiels des observations que nous vous avons faites dans ce domaine ont été sélectionnées.

Nous avons représentés respectivement dans les figures 4.1.1.1.,-2,-3,-4,-5, une section d'un homogénat, d'une fraction nucléaire, d'une fraction LG, d'une fraction SG et une section d'une fraction P.

4.1.2 Distribution et quantités totales des protéines obtenues pour quatre fractionnements témoins

Le dosage des protéines a été réalisé selon la microméthode décrite par MILLER, (1959), en utilisant comme étalon la sérum albumine bovine.

Les résultats consécutifs aux quatre fractionnements témoins sont présentés dans le tableau II.

Pour les expériences 1 et 2 réalisées à partir de 3 rats, on observe une quantité totale de protéines dans l'homogénat qui est plus ou moins semblable dans les deux cas :

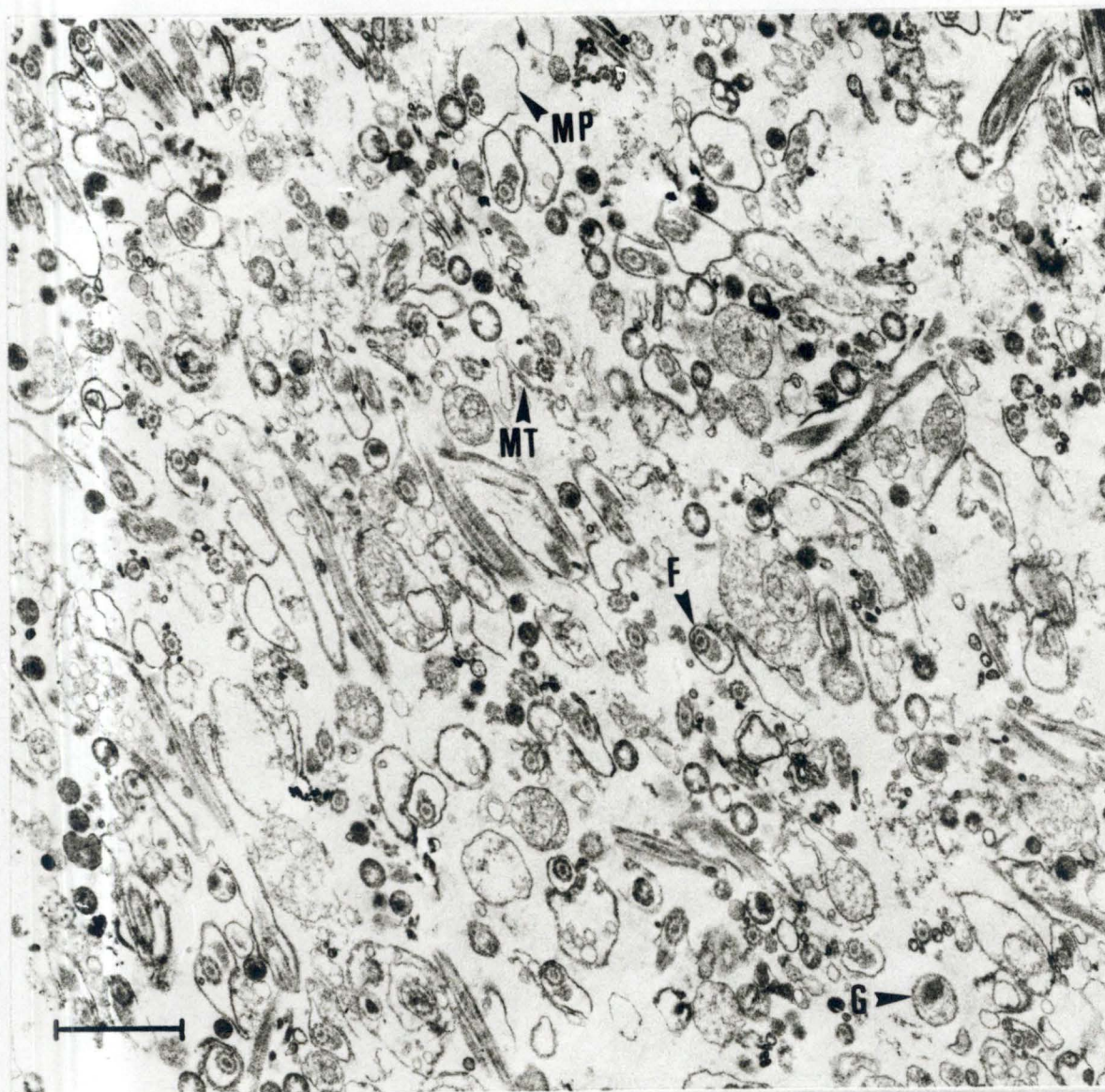


FIG. 4.1.11. Micrographie électronique d'une section d'un homogénat de *T.b.brucei* isolés à partir de rats ayant été traités avec une dose de 16 mg / kg de Bromure d'éthidium durant 9 heures . L'injection du B.E. a eu lieu le troisième jour de l'infestation . On y observe des sections de flagelles (F), de poches flagellaires (PF), de mitochondries (M) , de glycosomes (G) ainsi que des débris de membranes plasmiques (MP) associés à des microtubules (MT) .

Gross. : 18000 X



FIG. 4.1.1.2. Micrographie électronique d'une section de fraction nucléaire obtenue après centrifugation différentielle d'un homogénat de *T.b.brucei* isolés à partir de rats ayant été traités avec une dose de 2.5 mg / kg de Bromure d' éthidium. L'injection du B.E. a eu lieu le troisième jour de l'infestation. On y observe des sections de flagelles (F), de poches flagellaires (PF), de noyaux(N), ainsi que des débris de membranes plasmiques(MP).
Gross. : 280000 X



FIG. 4.1.1.3. Micrographie électronique d'une section de fraction LG obtenue après centrifugation différentielle d'un homogénat de *T.b.brucei* isolés à partir de rats non traités .

On y observe des sections de flagelles(F) et de leurs structures cristallines (SC), des sections de mitochondries(M) , de glycosomes(G), de vacuoles autophagiques(VA) et de tubules(T).

Gross. : 48000 X

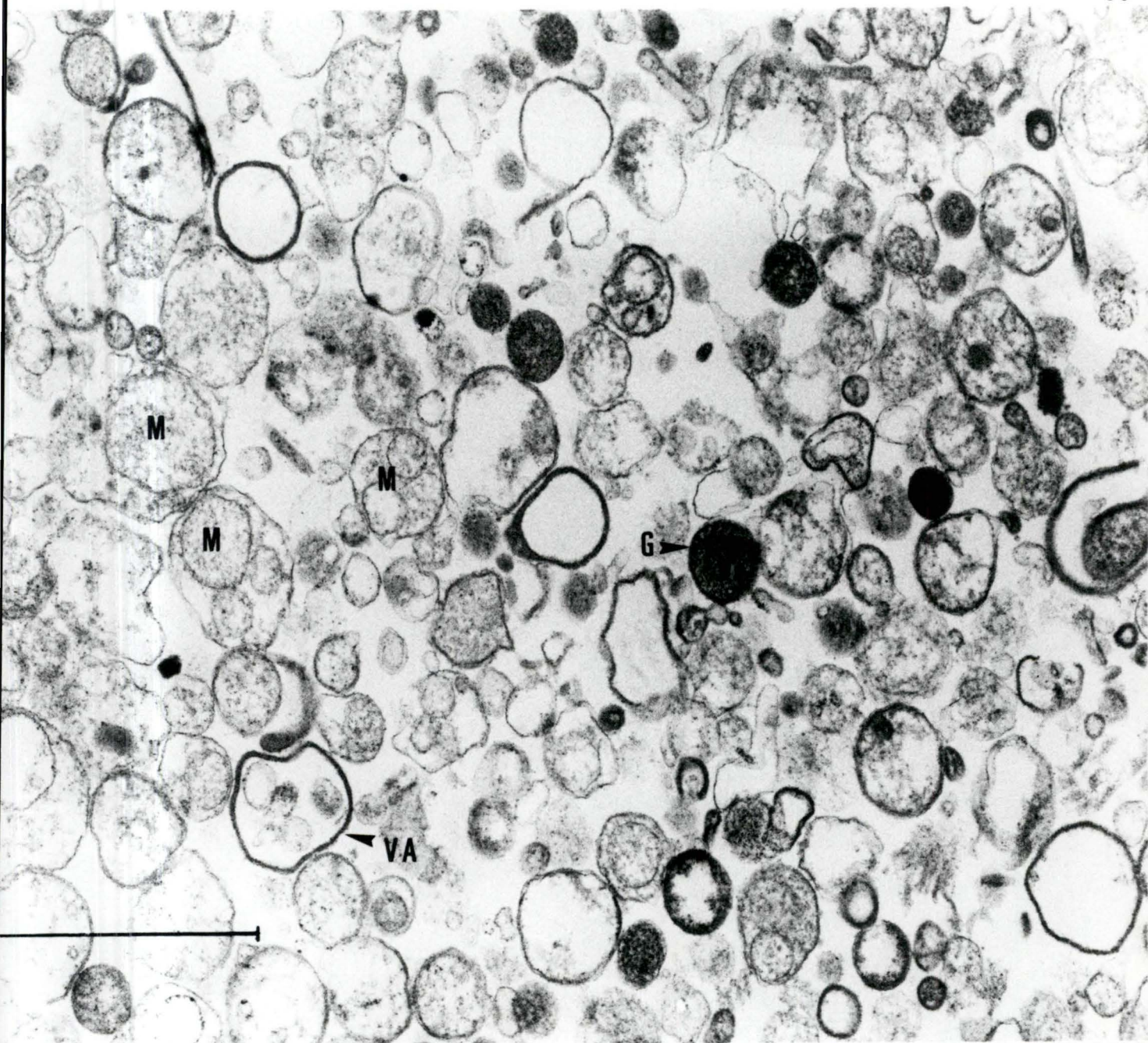


FIG. 4.1.1.4. Micrographie électronique d'une section de fraction SG obtenue après centrifugation différentielle d'un homogénat de *T.b.brucei* isolés à partir de rats traités avec une dose de 2.5 mg / kg de Bromure d'éthidium. L'injection du B.E. a eu lieu le troisième jour de l'infestation.

On y observe des sections de mitochondries(M) , de glycosomes(G) et de vacuoles autophagiques(VA).

Gross. : 48000 X

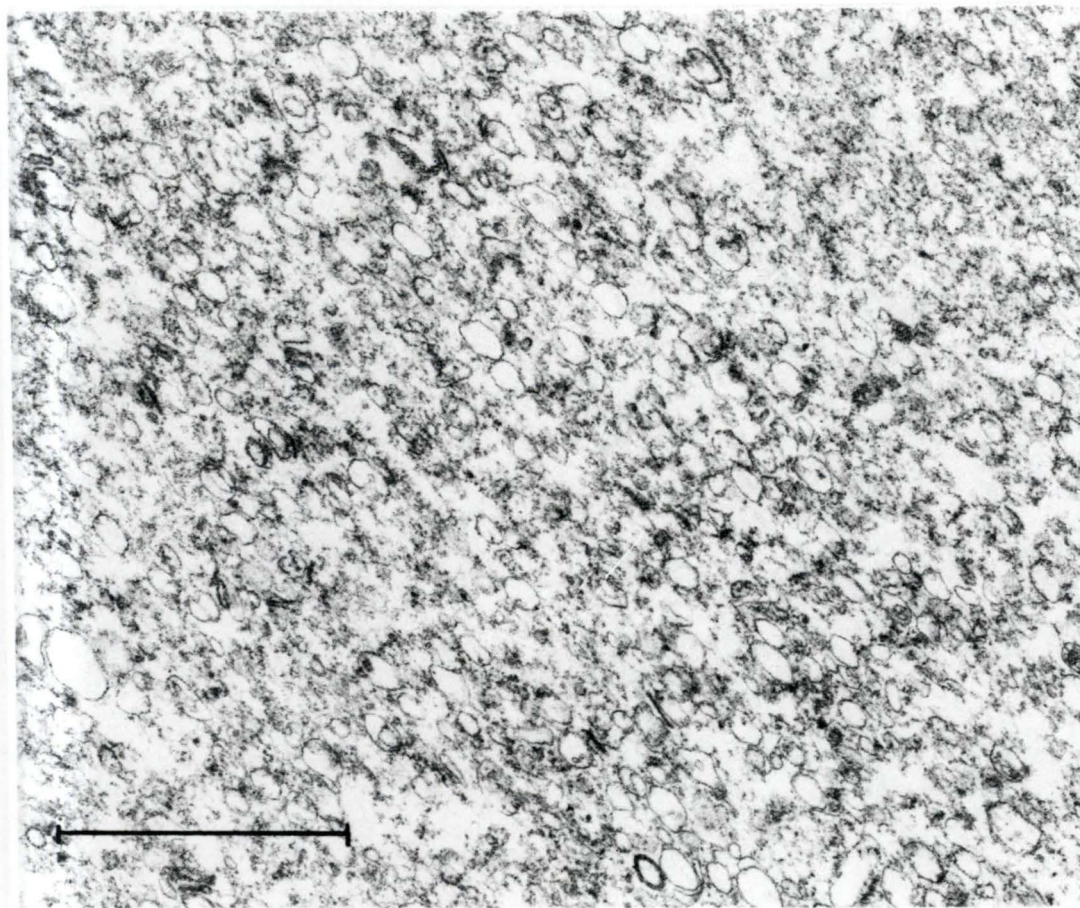


FIG. 4.1.1.5. Micrographie électronique d'une section de fraction P obtenue après centrifugation différentielle d'un homogénat de *T.b.brucei* isolés à partir de rats traités avec une dose de 16 mg / kg de Bromure d'éthidium. L'injection du B.E. a eu lieu le troisième jour de l'infestation.

Gross. : 38000 X

N° expérience	Nbre de rats	dilution d'homogénat	quantité totale Prot. (E + N)	% Activité Activité spécifique relative					% Récupération
				N	LG	SG	P	S	
1	3	50 fois	28.67	26.11	7.86	3.87	10.46	51.69	97
2	3	50 fois	33.84	18.06	16.78	6.35	10.55	48.25	111
3	4	25 fois	104.66	11.41	12.7	5.48	10.39	60.02	95
4	4	25 fois	77.1	14.03	10.19	6.66	10.24	58.88	100

Tableau II : Distribution des protéines de *T. b. brucei* provenant de rats témoins après centrifugation différentielle et séparation en cinq fractions: N, LG, SG, P et S.

Les quantités totales de protéines sont exprimées en mg. La quantité de protéines trouvée dans chaque fraction et la récupération sont exprimées en pourcentage de la quantité totale de protéines dans l'homogénat (E + N).

Enzymes	Activité Spécifique (E+N)
Protéines	99.88 ± 13.78
Phosphatase acide	215.00 ± 15.00
α-d-Mannosidase	1.45 ± 0.40
α-d-Glucosidase	3.54 ± 0.01
Hexokinase	1043 ± 128.00
Glucose phosphate isomérase	1758 ± 152.00
Alanine amino transférase	1252 ± 200.00

Tableau III : Tableau des activités spécifiques des enzymes de références de *T. b. brucei*.

Celles-ci sont exprimées en milliunités/mg de protéines de trypanosome (moyenne ± écart-type) pour les enzymes et ^{sont exprimées} les protéines en mg. Il s'agit de la moyenne de deux expériences: fractionnement de *T. b. brucei* provenant de quatre rats témoins et d'homogénats dilués 25 fois.

31, 25 ± 2,58 mg. Tandis que pour les deux expériences suivantes, faites à partir de 4 rats, il existe une différence plus grande : 90,88 ± 13,78 mg. De plus, on notera que la proportion de protéines totale de trypanosome obtenue par rat infesté est en moyenne de 10,42 ± 0,86 mg pour les expériences 1 et 2 et de 22,72 ± 3,44 mg pour les expériences 3 et 4.

Les deux fractionnements réalisés à partir d'homogénats dilués 50 fois montrent une distribution différente au point de vue du pourcentage des protéines : la fraction N du premier fractionnement (expérience 1) contient une proportion plus élevée de protéines aux dépens des fractions LG et SG. Pour le deuxième fractionnement (expérience 2), il y a moins de protéines dans la fraction N, aux profits de LG et SG. Les fractions P et S de ces deux fractionnements contiennent à peu près la même proportion de protéines.

Pour les fractionnements dont l'homogénat est dilué 25 fois (expériences 3 et 4), on notera une distribution presque semblable du pourcentage des protéines dans les différentes fractions, mais le surnageant final contient environ 10% en plus de protéines et la distribution dans les autres fractions est beaucoup plus homogène par rapport aux deux premiers fractionnements dans lesquels l'homogénat est dilué 50 fois.

4.1.3 Activités spécifiques des enzymes dosés

Nos expériences nous ont amenés à mesurer l'activité des enzymes cités ci-dessus.

Les résultats relatifs à l'ensemble de ces mesures sur ce qui correspond à l'homogénat des trypanosomes (E + N) sont rassemblés dans le tableau III. Ce tableau reprend les activités spécifiques (moyenne ± écart-type) pour les fractionnements de *Trypanosoma brucei* isolés à partir de deux lots de quatre rats et une dilution de 25 fois des homogénats qui nous servirons de références pour les expériences ultérieures.

L'activité spécifique considérée est celle mesurée dans l'homogénat. Elle est calculée en faisant le rapport entre la somme des activités totales de l'extrait cytoplasmique et de la fraction nucléaire sur la somme des quantités totales de protéines dans ces deux fractions. Cette activité est exprimée en milliunités par milligramme de protéines ou nanomoles par minute par mg de protéines.

4.1.4 Distribution des enzymes après centrifugation différentielle

La centrifugation différentielle permet d'obtenir des fractions enrichies en granules d'un type donné. Nous avons donc établi la distribution des enzymes cités ci-dessus et considérés comme enzymes de références des organites auxquels ils sont attachés (STEIGER et al., 1980).

Les résultats consécutifs aux fractionnements subcellulaires de *Trypanosoma brucei* provenant de deux lots de quatre rats témoins et une dilution de 25 fois des homogénats,

sont présentés dans le tableau IV. Nous avons représenté à la figure 4.1.4.1 la distribution reprise dans ce tableau.

Le pourcentage d'activité enzymatique représente la quantité d'enzymes que l'on récupère dans la fraction par rapport à celle de l'homogénat, ou celles cumulées de l'extrait cytoplasmique et de la fraction nucléaire. L'activité spécifique relative placée en ordonnée est le rapport entre le pourcentage de l'activité totale dans la fraction considérée sur le pourcentage de la quantité totale de protéines contenue dans cette même fraction. Elle donne donc une mesure de la purification de l'enzyme et par conséquent du granule auquel il sert de référence.

En abscisse, on a les pourcentages de protéines de chaque fraction cumulés de gauche à droite. Dans ce mode de représentation, repris de DUVE et al., (1955), chaque fraction est schématisée par un rectangle dont la hauteur est proportionnelle à la purification de l'enzyme et la surface au contenu enzymatique de la fraction.

a) Contenu enzymatique ou pourcentage d'activité dans les différentes fractions

La phosphatase acide est localisée essentiellement dans les fractions P et N avec des pourcentages d'activité d'environ 40% et 20% respectivement.

L' α -D-mannosidase est contenue dans les fractions LG, SG, P et N avec un net avantage pour LG. On observe également une solubilisation plus importante. Cette solubilisation se retrouve pour l' α -D-glucosidase et la glucose phosphate isomérase, et de façon plus importante pour la GPI. On retrouve environ 20% d'activité totale de l' α -D-glucosidase dans N et environ 11% dans LG et dans P.

L'hexokinase et la glucose phosphate isomérase se retrouvent dans LG, SG et P avec un pourcentage d'activité relativement homogène dans ces trois fractions et cela pour chacun des deux enzymes pris séparément. L'activité de l'alanine amino transférase est contenue en presque totalité dans le surnageant final.

b) Purification enzymatique ou localisation préférentielle dans les fractions

Comme nous pouvons le voir sur l'histogramme de la figure 4.1.4.1., l'alanine amino transférase se localise en grande majorité dans le surnageant final.

La phosphatase acide est, quant à elle, principalement purifiée dans la fraction microsomale. On observe de plus une activité spécifique relative "significative" dans la fraction SG et de façon moins "significative" dans les fractions N et LG.

L' α -D-mannosidase montre un maximum de purification dans SG et LG dans lesquelles on retrouve des valeurs presque identiques. La fraction P montre un enrichissement

Enzymes	Activité Spécifique (E+N)	% Activité <i>Activité spécifique relative</i>					% Récupération
		N	LG	SG	P	S	
Protéines	99.88 ± 13.78	12.72 ± 1.31	11.44 ± 1.26	6.07 ± 0.59	10.32 ± 0.07	59.45 ± 0.57	97 ± 3
Phosphatase acide	215 ± 15	19.83 ± 2.45	17.78 ± 2.04	11.85 ± 0.36	41.95 ± 1.80	8.59 ± 1.02	89 ± 3
		<i>1.55 ± 0.03</i>	<i>1.55 ± 0.02</i>	<i>1.95 ± 0.14</i>	<i>4.06 ± 0.15</i>	<i>0.14 ± 0.02</i>	
α-d-Mannosidase	1.45 ± 0.40	10.05 ± 0.21	21.75 ± 2.88	12.19 ± 1.75	12.45 ± 2.69	43.56 ± 4.97	79 ± 2
		<i>0.79 ± 0.09</i>	<i>1.90 ± 0.40</i>	<i>2.01 ± 0.09</i>	<i>1.21 ± 0.20</i>	<i>0.73 ± 0.09</i>	
α-d-Glucosidase	3.54 ± 0.01	21.74 ± 6.31	10.68 ± 0.28	5.23 ± 1.38	11.29 ± 0.13	51.06 ± 8.10	96 ± 4
		<i>1.71 ± 0.29</i>	<i>0.93 ± 0.11</i>	<i>0.86 ± 0.13</i>	<i>1.09 ± 0.02</i>	<i>0.86 ± 0.12</i>	
Hexokinase	1043 ± 128	7.12 ± 0.94	22.32 ± 2.88	29.00 ± 6.16	30.00 ± 6.74	11.56 ± 3.24	92 ± 8
		<i>0.56 ± 0.02</i>	<i>1.95 ± 0.42</i>	<i>4.78 ± 0.61</i>	<i>2.91 ± 0.62</i>	<i>0.19 ± 0.05</i>	
Glucose phosphate isomérase	1758 ± 152	5.81 ± 1.88	14.00 ± 3.22	14.71 ± 4.24	10.95 ± 0.15	54.53 ± 9.19	104 ± 6
		<i>0.46 ± 0.12</i>	<i>1.22 ± 0.37</i>	<i>2.42 ± 0.51</i>	<i>1.06 ± 0.01</i>	<i>0.92 ± 0.15</i>	
Alanine amino transférase	1252 ± 200	6.07 ± 0.03	10.43 ± 1.36	6.22 ± 0.90	4.22 ± 0.34	73.06 ± 0.09	89 ± 5
		<i>0.48 ± 0.05</i>	<i>0.91 ± 0.02</i>	<i>1.02 ± 0.05</i>	<i>0.41 ± 0.03</i>	<i>1.23 ± 0.02</i>	

Tableau IV : Distribution des enzymes de *T. b. brucei* isolés à partir de deux lots de quatre rats témoins après centrifugation différentielle des homogénats et séparation en 5 fractions: N, LG, SG, P et S. Les valeurs des activités spécifiques sont données en milliunités/mg de protéines (moyenne ± écart-type) pour les enzymes. Les protéines sont exprimées en milligrammes. Il s'agit de la moyenne de deux fractionnements. L'activité enzymatique trouvée dans chaque fraction et la récupération sont exprimées en pourcentage de l'activité de l'homogénat (E + N). [caractère droit] Les activités spécifiques relatives sont représentées en italiques.

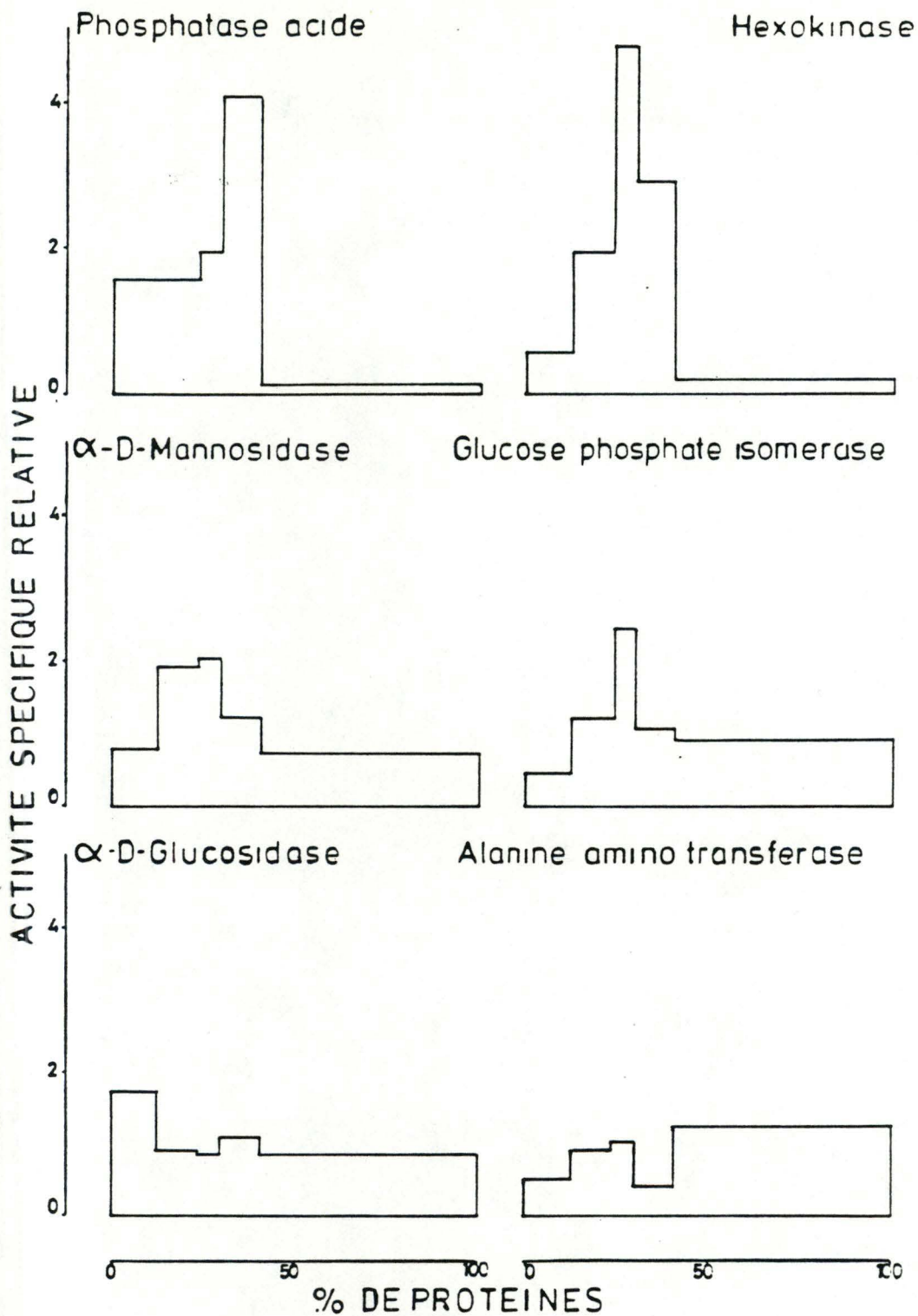


Fig 4.1.4.1. : Distribution des enzymes de *T. b. brucei* isolés à partir des rats témoins. Les fractions obtenues par centrifugation différentielle sont placées dans l'ordre de leur séparation; de gauche à droite : nucléaire (N), à gros granules (LG), à petits granules (SG), microsomal (M) et surnageant final (S).

L'ordonnée représente l'activité spécifique relative (pourcentage de l'activité totale/pourcentage de la quantité totale de protéines). L'abscisse représente le pourcentage cumulé de protéines.

Moyenne des expériences.

légèrement supérieur par rapport à l'homogénat.

L' α -D-glucosidase se retrouve essentiellement dans les fractions nucléaire (N) et microsomale(P) avec toute fois une purification supérieure dans N.

Les deux enzymes de la glycolyse montrent un profil de distribution presque identique avec un maximum d'activité dans la fraction SG. Ils ont cependant une activité spécifique relative non négligeable dans les fractions LG et P et la glucose phosphate isomérase possède une composante soluble que ne possède pas l'hexokinase.

4.2 Etudes biochimiques après fractionnement subcellulaire de *Trypanosoma brucei* isolé à partir de rats traités à l'Antrycide

La dose injectée aux rats est de 7,5 mg par kg donnée en une fois par voie intrapéritonéale. Cette dose unique a un effet thérapeutique et curatif.

Cette drogue a été injectée à la fin du troisième jour après l'inoculation des trypanosomes, moment où le nombre de ces parasites est suffisamment élevé. L'effet biochimique de l'Antrycide a été testé pour différents temps d'incubation in vivo. Ceux-ci sont de 7 heures et de 12 heures.

4.2.1 Effet de l'Antrycide sur la quantité totale de protéines

Comme dit précédemment, on pourrait estimer le nombre de trypanosomes à partir de la quantité totale de protéines présente dans l'homogénat. Il nous a semblé plus intéressant de voir l'effet de l'Antrycide sur la quantité totale de protéines dans l'homogénat de départ que de voir l'effet sur le nombre de trypanosomes (car l'Antrycide est une drogue agissant notamment en inhibant la synthèse des protéines). De plus, le dosage des protéines est plus précis et moins fastidieux que le comptage des trypanosomes.

En effet, le dénombrement des trypanosomes aurait dû être réalisé pour chaque rat d'un même fractionnement. On aurait ainsi obtenu un nombre de trypanosomes par millilitre de sang pour chaque rat qu'on aurait multiplié par le volume de sang récolté chez ces rats, et cela dans les différentes expériences. D'autre part, le nombre de trypanosomes n'est pas le même que celui trouvé après l'élution car le rendement de la colonne de DEAE n'est pas de 100%.

De plus, le nombre de rats est différent pour les deux durées de traitement, car malgré que nous ayons injecté quatre rats au départ de chaque expérience, il y a eu des rats morts le jour de l'expérience. Ceci est dû au fait que le degré d'infestation de ces derniers rats était trop élevé au moment de l'injection de la drogue.

Les résultats sont présentés au tableau V.

Expérience	Durée du trait.	Nombre de rats	Quantité totale de protéines (E + N)	Quantité de protéines par rat
Témoins		4	90.88	22.72
7.5 mg/kg	7h 00	2	6.77	3.38
7.5 mg/kg	12h 00	4	33.35	8.33

Tableau V : Quantité totale de protéines dans des homogénats (E + N) de *T. b. brucei* isolés d'une part à partir de rats témoins (moyenne de deux expériences), et d'autre part à partir de rats traités avec 7.5 mg/kg d'Antrycide respectivement pour une durée de 7 heures et une durée de 12 heures.

L'injection a lieu le troisième jour de l'infestation.

La quantité totale de protéines et la quantité de protéines par rat infesté sont exprimées en mg.

4.2.2. Effet de l'Antrycide sur les activités spécifiques.

Les valeurs des activités spécifiques pour les témoins, les 7 heures et 12 heures de traitement sont présentés dans le Tableau VI.

4.2.2.1. Effet global du traitement.

- On observe, quelque soit la durée du traitement utilisée dans nos expériences, une nette augmentation de l'activité spécifique par rapport aux témoins pour la glucose phosphatase isomérase, l'alanine amino transférase et l'hexokinase par ordre décroissant des augmentations.
- Pour la phosphatase acide et l' α -D-glucosidase, les activités spécifiques sont \pm semblables tandis que l'on observe une diminution pour l' α -D-mannosidase par rapport aux témoins.

4.2.2.2. Effet de la durée du traitement.

Pour la phosphatase acide, l' α -D-glucosidase, l'hexokinase et la GPI, l'activité spécifique est supérieur pour un traitement de 7 heures par rapport aux 12 heures de traitement. Il semblerait qu'il y ait une diminution de l'activité spécifique quand la durée du traitement augmente. Par contre, ce serait plutôt l'effet inverse pour l' α -D-mannosidase et l' alanine amino transférase.

4.2.3. Effet de l'Antrycide sur la distribution des enzymes et des protéines.

Les valeurs des pourcentages d' activités enzymatiques et des activités spécifiques relatives sont présentées dans le tableau VI. Les figures 4. 2. 3. 1.,-2,-3, représentent les distributions des enzymes reprises dans ce tableau.

4.2.3.1. Pourcentage de protéines dans les différentes fractions.

Pour les 7 heures et les 12 heures de traitement, on observe globalement un déplacement du pourcentage des protéines dans les fractions sédimentables au dépens de la fraction soluble. On remarque surtout une nette augmentation dans SG chez les rats traités par rapport aux témoins. Dans le traitement de courte durée on voit que le pourcentage de protéines est réparti de façon très homogène ($\pm 15\%$) dans les fractions N, LG, SG et P tandis que pour les 12 heures de traitement il est aussi d'environ 15% dans LG et SG mais il est plus faible dans N et P.

Enzymes	Expériences	Activité Spécifique (E+N)	% Activité relative					% Récupération
			N	LG	SG	P	S	
Protéines	Témoins	90,88 ± 13.7	12.72 ± 1.31	11.44 ± 1.26	6.07 ± 0.59	10.32 ± 0.07	59.45 ± 0.57	97 ± 3
	7 heures	6.78	15.05	13.51	16.07	14.96	40.41	107
	12 heures	33.35	9.09	14.81	15.81	11.29	49	99
Phosphatase acide	Témoins	215 ± 15	19.83 ± 2.45 <i>1.55 ± 0.03</i>	17.78 ± 2.04 <i>1.55 ± 0.02</i>	11.85 ± 0.36 <i>1.95 ± 0.14</i>	41.95 ± 1.80 <i>4.06 ± 0.15</i>	8.59 ± 1.02 <i>0.14 ± 0.02</i>	89 ± 3
	7 heures	244	9.55 <i>0.63</i>	10.24 <i>0.76</i>	17.73 <i>1.1</i>	39.17 <i>2.62</i>	23.31 <i>0.58</i>	88
	12 heures	196	6.55 <i>0.72</i>	16.75 <i>1.13</i>	21.88 <i>1.38</i>	49.49 <i>4.38</i>	5.33 <i>0.11</i>	99
α-d-Mannosidase	Témoins	1.45 ± 0.40	10.05 ± 0.21 <i>0.79 ± 0.09</i>	21.75 ± 2.88 <i>1.90 ± 0.40</i>	12.19 ± 1.75 <i>2.01 ± 0.09</i>	12.45 ± 2.69 <i>1.21 ± 0.20</i>	43.56 ± 4.97 <i>0.73 ± 0.09</i>	79 ± 2
	7 heures	0.33	18.41 <i>1.22</i>	24.65 <i>1.82</i>	17.08 <i>1.06</i>	17.41 <i>1.16</i>	22.45 <i>0.55</i>	106
	12 heures	0.68	8.82 <i>0.97</i>	30.08 <i>2.03</i>	28.29 <i>1.79</i>	13.67 <i>1.21</i>	19.14 <i>0.39</i>	100
α-d-Glucosidase	Témoins	3.54 ± 0.01	21.74 ± 6.31 <i>1.71 ± 0.29</i>	10.68 ± 0.28 <i>0.93 ± 0.11</i>	5.23 ± 1.38 <i>0.86 ± 0.13</i>	11.29 ± 0.13 <i>1.09 ± 0.02</i>	51.06 ± 8.10 <i>0.86 ± 0.12</i>	96 ± 4
	7 heures	5.37	4.04 <i>0.27</i>	8.65 <i>0.64</i>	8.12 <i>0.5</i>	12.73 <i>0.85</i>	66.46 <i>1.64</i>	97
	12 heures	4.57	9.41 <i>1.03</i>	16.4 <i>1.11</i>	16.48 <i>1.04</i>	18.42 <i>1.63</i>	39.29 <i>0.8</i>	96
Hexokinase	Témoins	1043 ± 128	7.12 ± 0.94 <i>0.56 ± 0.02</i>	22.32 ± 2.88 <i>1.95 ± 0.42</i>	29.00 ± 6.16 <i>4.78 ± 0.61</i>	30.00 ± 6.74 <i>2.91 ± 0.62</i>	11.56 ± 3.24 <i>0.19 ± 0.05</i>	92 ± 8
	7 heures	1917	7.32 <i>0.49</i>	26.97 <i>2</i>	34.95 <i>2.17</i>	29.39 <i>1.96</i>	1.37 <i>0.03</i>	90
	12 heures	1717	4.64 <i>0.51</i>	28.78 <i>1.94</i>	46.46 <i>2.94</i>	17.3 <i>1.53</i>	2.82 <i>0.06</i>	100
Glucose phosphate isomérase	Témoins	1758 ± 152	5.81 ± 1.88 <i>0.46 ± 0.12</i>	14.00 ± 3.22 <i>1.22 ± 0.37</i>	14.71 ± 4.24 <i>2.42 ± 0.51</i>	10.95 ± 0.15 <i>1.06 ± 0.01</i>	54.53 ± 9.19 <i>0.92 ± 0.15</i>	104 ± 6
	7 heures	5273	2.57 <i>0.17</i>	18.07 <i>1.34</i>	25.61 <i>1.59</i>	16.94 <i>1.13</i>	36.81 <i>0.91</i>	94
	12 heures	3090	5.49 <i>1.65</i>	22.96 <i>1.55</i>	38.74 <i>2.45</i>	13.21 <i>1.17</i>	19.6 <i>0.4</i>	96
Alanine amino transférase	Témoins	1252 ± 200	6.07 ± 0.03 <i>0.48 ± 0.05</i>	10.43 ± 1.36 <i>0.91 ± 0.02</i>	6.22 ± 0.90 <i>1.02 ± 0.05</i>	4.22 ± 0.34 <i>0.41 ± 0.03</i>	73.06 ± 0.09 <i>1.23 ± 0.02</i>	89 ± 5
	7 heures	1937	2.07 <i>0.14</i>	6.51 <i>0.48</i>	4.46 <i>0.28</i>	4.64 <i>0.31</i>	82.32 <i>2.04</i>	91
	12 heures	2406	3.23 <i>0.35</i>	9.34 <i>0.63</i>	14.79 <i>0.93</i>	4.18 <i>0.37</i>	68.46 <i>1.4</i>	104

Tableau VI : Distribution des enzymes de *T. b. brucei* après centrifugation différentielle d'homogénats provenant d'une part de rats témoins (moyenne de deux expériences ± écart-type) et d'autre part de rats traités avec une dose de 7.5 mg/kg d'antricyde respectivement pour une durée de 7 heures et une durée de 12 heures.

L'injection a lieu le troisième jour de l'infestation.

Les valeurs des activités spécifiques sont données en milliunités/mg de protéines pour les enzymes et les protéines sont exprimées en mg. L'activité enzymatique trouvée dans chaque fraction et la récupération sont exprimées en pourcentage de l'activité de l'homogénat (E + N).

[caractère droit]

Les activités spécifiques relatives sont représentées en italique.

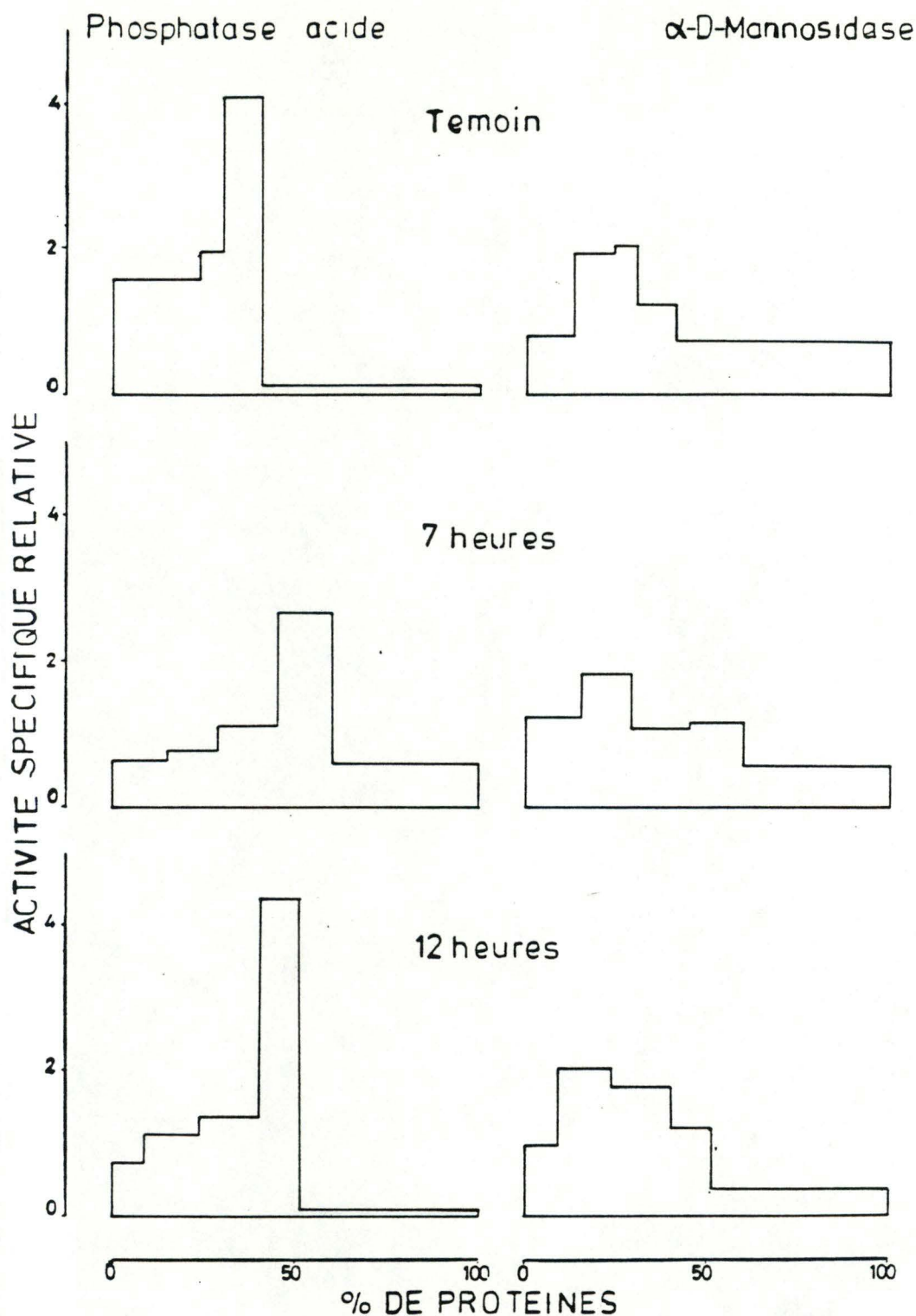


Fig 4.2.3.1. : Distribution des enzymes de *T.b. brucei* isolés d'une part à partir des rats témoins et d'autre part à partir des rats traités avec 7,5 mg/kg d'Antrycide pour des durées 7 heures et de 12 heures.

Les fractions obtenues par centrifugation différentielle sont placées dans l'ordre de leur séparation; de gauche à droite : nucléaire (N), à gros granules (LG), à petits granules (SG), microsomal (M) et surnageant final (S).

L'ordonnée représente l'activité spécifique relative (pourcentage de l'activité totale/pourcentage de la quantité totale de protéines). L'abscisse représente le pourcentage cumulé de protéines.

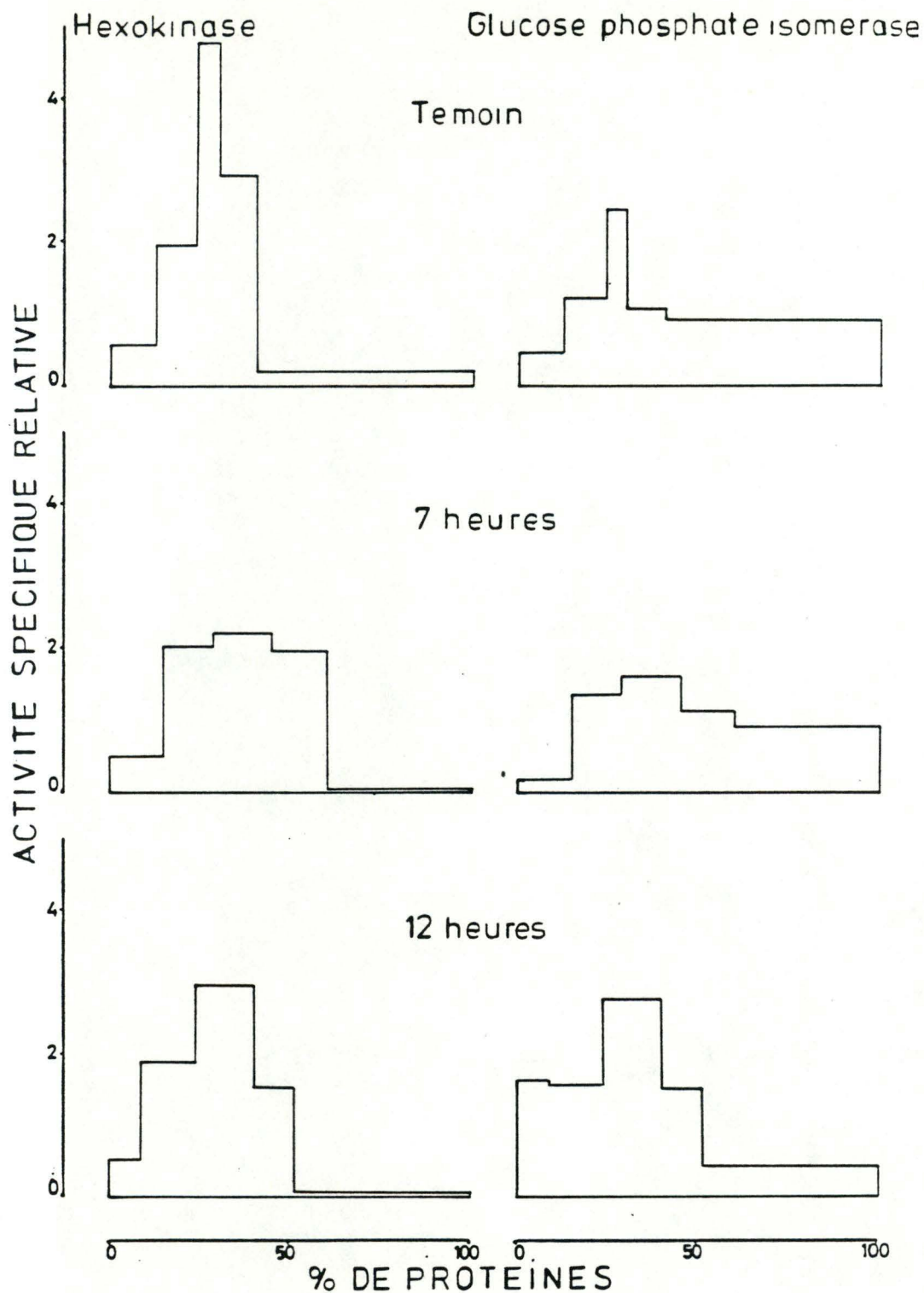


Fig 4.2.3.2. : Distribution des enzymes de *T.b. brucei* isolés d'une part à partir de rats témoins et d'autre part à partir de rats traités avec 7,5 mg/kg d'Antrycide pour des durées de 7 heures et de 12 heures.

Les fractions obtenues par centrifugation différentielle sont placées dans l'ordre de leur séparation; de gauche à droite : nucléaire (N), à gros granules (LG), à petits granules (SG), microsomal (M) et surnageant final (S).

L'ordonnée représente l'activité spécifique relative (pourcentage de l'activité totale/pourcentage de la quantité totale de protéines). L'abscisse représente le pourcentage cumulé de protéines.

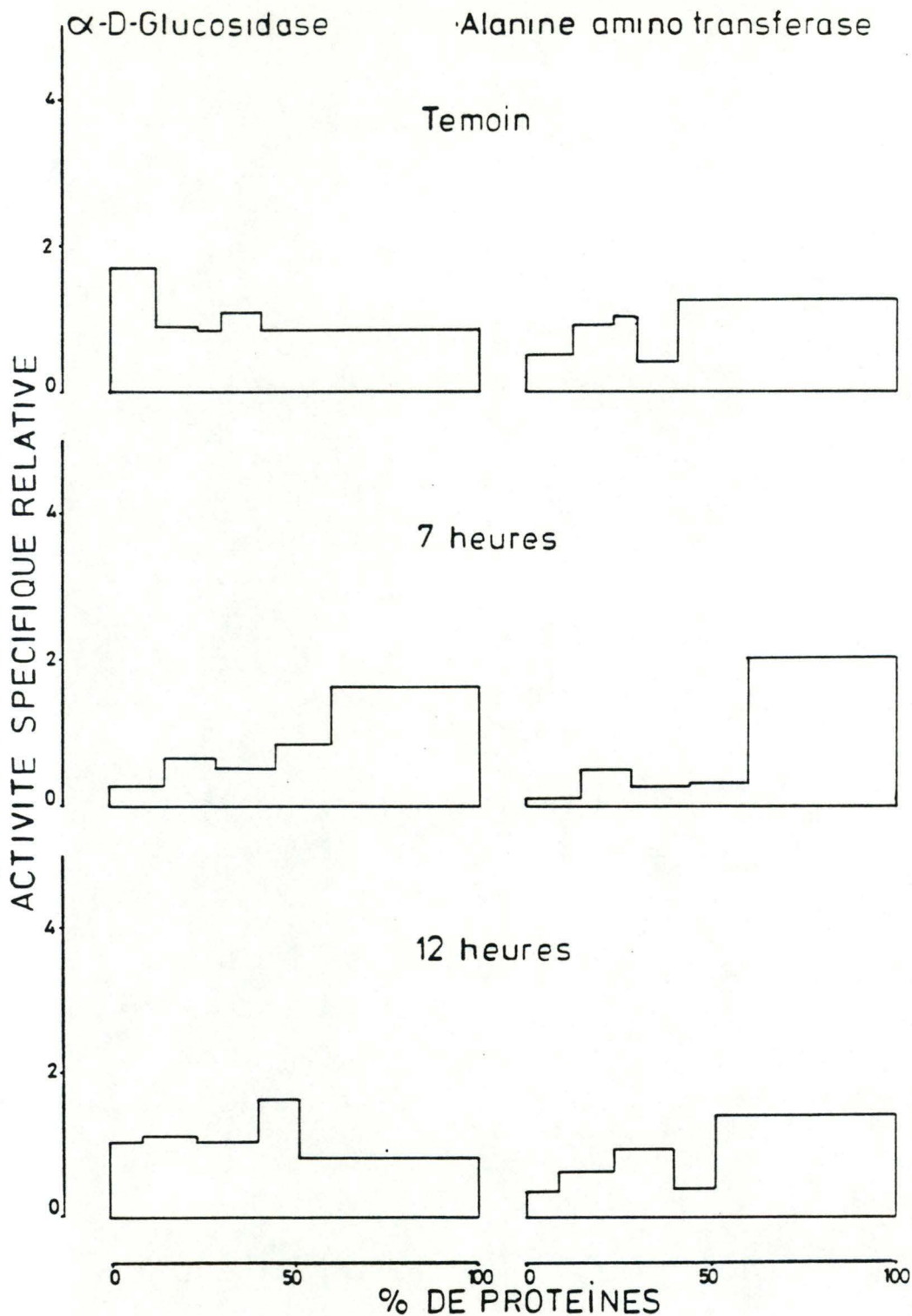


Fig 4.2.3.3. : Distribution des enzymes de *T.b. brucei* isolés d'une part à partir de rats témoins et d'autre part à partir de rats traités avec 7,5 mg/kg d'Antrycide pour des durées de 7 heures et de 12 heures.

Les fractions obtenues par centrifugation différentielle sont placées dans l'ordre de leur séparation; de gauche à droite : nucléaire (N), à gros granules (LG), à petits granules (SG), microsomal (M) et surnageant final (S).

L'ordonnée représente l'activité spécifique relative (pourcentage de l'activité totale/pourcentage de la quantité totale de protéines). L'abscisse représente le pourcentage cumulé de protéines.

4.2.3.2. Distribution des enzymes

a) Contenu enzymatique ou pourcentage d'activité dans les différentes fractions.

Comme pour les protéines, on remarque une augmentation des activités des différents enzymes dans les fractions LG, P et surtout dans SG dans le cas des trypanosomes soumis à l'action de l'Antrycide.

Il faut cependant remarquer que pour les 7 heures de traitement la phosphatase acide et l' α -D-glucosidase ont une activité supérieure au témoin dans le surnageant final et cette différence est plus importante pour la phosphatase acide. L'augmentation du pourcentage d'activité au niveau des fractions LG et SG par rapport aux témoins est plus nette pour le traitement de 12 heures. Ceci s'observe pour tous les enzymes dosés. Il semblerait qu'il n'y ait pas de différence "évidente" de l'activité dans la fraction P dans le cas de la phosphatase acide et l'alanine amino transférase comparativement aux valeurs de références. Mais les activités trouvées dans la fraction microsomal sont supérieures par rapport aux activités témoins pour l' α -D-manosidase et la glucose phosphate isomérase du traitement d'une durée de 7 heures et pour l' α -D-glucosidase pour les 12 heures de traitement. Le pourcentage d'activité est inférieur pour l'hexokinase dans le cas d'une durée de 7 heures. On notera également que la fraction N contient un pourcentage d'activité presque double pour l' α -D-manosidase pour un traitement de 7 heures.

b) Purification enzymatique ou A.S.R.

Quelque soit la durée du traitement, nous n'avons pas observé de modifications importantes dans le profil de purification des enzymes dosés par rapport aux témoins. En effet pour 5 des 6 enzymes dosés, le maximum d'A.S.R. se retrouve toujours dans la même fraction que chez les témoins. En effet la phosphatase acide se localise à chaque fois, préférentiellement dans la fraction microsomal (P) l' α -D-mannosidase dans la fraction à gros granules (LG), l'hexokinase et la glucose phosphate isomérase dans la fraction SG. Cependant, l' α -D-glucosidase après 7 heures de traitement a une A.S.R. maximale dans le surnageant, alors que pour les fractionnements témoins et les fractionnements après un traitement de 12 heures on retrouve une localisation bimodale à savoir dans la fraction N et P.

4.3. Etudes biochimiques après fractionnement subcellulaire de *T. brucei* isolé à partir de rats traités avec du Bromure d'ethidium.

Les doses injectées aux rats sont de 2,5 mg/kg et de 16 mg/kg données en une fois par voie intrapéritonéale. Les doses uniques de 2.5 et 16 mg ont un effet thérapeutique mais non curatif.

L'injection du Bromure d'éthidium est réalisée le troisième jour après l'inoculation de 10^6 trypanosomes, moment où le nombre de ces parasites est suffisamment élevé. L'effet biochimique du Bromure d'éthidium a été testé, d'une part pour des durées de traitement de 8 et 13 heures à la dose de 2,5 mg/kg et d'autre part pour une durée de 9 heures à la dose de 16 mg/kg. Nous n'avons réalisé qu'un seul fractionnement pour chacun des deux traitements et deux fractionnements pour les témoins.

4. 3. 1. Effet du Bromure d'éthidium à la dose de 2.5 mg/kg.

4. 3. 1. 1. Effet sur la quantité totale de protéines.

Les résultats représentant les quantités totales de protéines dans l'homogénat et les quantités de protéines par rat dans chaque expérience sont présentés dans le tableau VIIa, et sont exprimées en milligramme.

Le nombre de rats par expérience étant différent, nous avons choisis de ramener la quantité totale de protéine dans l'homogénat (E + N) à la quantité de protéines de trypanosomes obtenues par rat. Nous avons préféré voir l'effet sur la quantité de protéines par rat pour les mêmes raisons que celles évoquées pour l'Antrycide. Le Bromure d'éthidium diminue apparemment la quantité de protéines de trypanosomes par rats infestés par rapport aux témoins. Cependant cette diminution n'est importante que pour les 13 heures de traitement, et il n'y a pratiquement pas de différence entre les témoins et le traitement de 8 heures.

4. 3. 1. 2. Effet sur les activités spécifiques.

Les valeurs des activités spécifiques pour les témoins, les 8 heures et les 12 heures de traitement dans le tableau VIIb.

a) Effet Global du traitement.

On n'observe pas d'effet global du traitement sur les activités spécifiques qui aille dans le sens d'une augmentation ou d'une diminution lorsque la durée du traitement augmente.

b) Effet de la durée du traitement.

Pour le traitement le plus long on remarque systématiquement que les activités sont

Tableau VIIa

Expérience	Durée du trait.	Nombre de rats	Quantité totale de protéines (E + N)	Quantité de protéines par rat
Témoins		4	90.88	22.72
2.5 mg/kg	8h 00	4	80.28	20.07
2.5 mg/kg	13h 00	2	28.34	14.2

Tableau VIIa : Quantité totale de protéines dans des homogénats (E + N) de *T. b. brucei* isolés d'une part à partir de rats témoins (moyenne de deux expériences), et d'autre part à partir de rats traités avec 2.5 mg/kg de Bromure d'éthidium respectivement pour une durée de 8 heures et une durée de 13 heures.

L'injection a lieu le troisième jour de l'infestation.

La quantité totale de protéines et la quantité de protéines par rat infesté sont exprimées en mg.

inférieures par rapport aux témoins pour la phosphatase acide, l' α -D-mannosidase, l' α -D-glucosidase et l'hexokinase.

Mis à part la glucose phosphate isomerase et l' α -D-glucosidase pour lesquels il semblerait y avoir une augmentation de l'activité spécifique après 8 heures de traitement on n'observe pas de différences frappantes par rapport aux témoins pour cette durée de traitement.

4. 3. 1. 3. Effet B.E. sur la distribution des enzymes et des protéines.

Les valeurs des pourcentages des activités enzymatiques et des activités spécifiques relatives sont présentés dans le tableau VIIIb. Les figures 4. 3. 1. 1.,-2,-3 représentent les distributions des enzymes reprises dans ce tableau.

a) Distribution des protéines.

La distribution des protéines dans le cas du fractionnement après 8 heures de traitement est pratiquement la même que celle des témoins.

Pour le traitement de 13 heures, on note un pourcentage de protéines légèrement supérieures dans N et LG par rapport aux témoins et donc par rapport aux 8 heures d'incubation au dépens du surnageant.

b) Distribution enzymatique.

Pour la phosphatase acide et l'hexokinase, les distributions des pourcentages d'activités sont pratiquement identiques dans les trois types de fractionnement : témoins, 8 heures et 13 heures de traitement. De plus on n'observe aucune délocalisation de ces enzymes après action du B.E. Dans les deux durées de traitements, l' α -D-mannosidase a une activité qui se concentre en plus grande proportion dans les fractions LG, SG et P par rapport aux témoins où son activité se localise essentiellement dans S et N.

En ce qui concerne, la glucose phosphate isomérase, nous obtenons une solubilisation de moitié inférieure par rapport aux témoins et aux 8 heures d'incubation. Et cela au profit de la fraction SG.

L'activité de l' α -D-glucosidase se délocalise depuis la fraction nucléaire vers la fraction P chez les rats traités par rapport aux rats témoins. Que ce soit chez les trypanosomes normaux ou soumis à l'action du B.E., l'alanine amino transférase se situe à 80 % dans le surnageant final et se comporte donc comme un enzyme soluble.

Enzymes	Expériences	Activité Spécifique (E+N)	% Activité Activité spécifique relative					% Récupération
			N	LG	SG	P	S	
Protéines	Témoins	90.88 ± 13.78	12.72 ± 1.31	11.44 ± 1.26	6.07 ± 0.59	10.32 ± 0.07	59.45 ± 0.57	97 ± 3
	8 heures	80.28	8.01	10.78	7.09	11.9	62.22	96
	13 heures	28.34	14.41	18.8	7.19	10.1	49.5	85
Phosphatase acide	Témoins	215 ± 15	19.83 ± 2.45 <i>1.55 ± 0.03</i>	17.78 ± 2.04 <i>1.55 ± 0.02</i>	11.85 ± 0.36 <i>1.95 ± 0.14</i>	41.95 ± 1.8 <i>4.06 ± 0.15</i>	8.59 ± 1.02 <i>0.14 ± 0.02</i>	89 ± 3
	8 heures	230	10.75 <i>1.34</i>	14.37 <i>1.33</i>	14.07 <i>1.98</i>	47.85 <i>4.02</i>	12.96 <i>0.21</i>	90
	13 heures	120	13.63 <i>0.94</i>	23.58 <i>1.25</i>	16.07 <i>2.23</i>	37.33 <i>3.69</i>	9.39 <i>0.19</i>	111
α-d-Mannosidase	Témoins	1.45 ± 0.4	10.05 ± 0.21 <i>0.79 ± 0.09</i>	21.75 ± 2.88 <i>1.90 ± 0.40</i>	12.19 ± 1.75 <i>2.01 ± 0.09</i>	12.45 ± 2.69 <i>1.21 ± 0.20</i>	43.56 ± 4.97 <i>0.73 ± 0.09</i>	79 ± 2
	8 heures	1.2	7.66 <i>0.95</i>	31.37 <i>2.91</i>	19.19 <i>2.71</i>	16.89 <i>1.42</i>	24.89 <i>0.4</i>	95
	13 heures	0.87	7.75 <i>0.54</i>	34.47 <i>1.83</i>	20.55 <i>2.86</i>	14.36 <i>1.42</i>	22.87 <i>0.46</i>	99
α-d-Glucosidase	Témoins	3.54 ± 0.006	21.74 ± 6.31 <i>1.71 ± 0.29</i>	10.68 ± 0.28 <i>0.93 ± 0.11</i>	5.23 ± 1.38 <i>0.86 ± 0.13</i>	11.29 ± 0.13 <i>1.09 ± 0.02</i>	51.06 ± 8.10 <i>0.86 ± 0.12</i>	96 ± 4
	8 heures	4.18	9.16 <i>1.14</i>	9.98 <i>0.92</i>	8.03 <i>1.13</i>	19.3 <i>1.62</i>	53.53 <i>0.86</i>	101
	13 heures	3.08	7.67 <i>0.53</i>	15.96 <i>0.85</i>	15.04 <i>2.09</i>	20.72 <i>2.05</i>	40.61 <i>0.82</i>	105
Hexokinase	Témoins	1043 ± 128	7.12 ± 0.94 <i>0.56 ± 0.02</i>	22.32 ± 2.88 <i>1.95 ± 0.42</i>	29.00 ± 6.16 <i>4.78 ± 0.61</i>	30.00 ± 6.74 <i>2.91 ± 0.62</i>	11.56 ± 3.24 <i>0.19 ± 0.05</i>	92 ± 8
	8 heures	1347	4.76 <i>0.59</i>	17.59 <i>1.63</i>	29.87 <i>4.21</i>	36.34 <i>3.05</i>	11.44 <i>0.18</i>	91
	13 heures	829	6.36 <i>0.44</i>	28.05 <i>1.49</i>	34.52 <i>4.8</i>	21.73 <i>2.15</i>	9.34 <i>0.19</i>	94
Glucose phosphate isomérase	Témoins	1758 ± 152	5.81 ± 1.88 <i>0.46 ± 0.12</i>	14.00 ± 3.22 <i>1.22 ± 0.37</i>	14.71 ± 4.24 <i>2.42 ± 0.51</i>	10.95 ± 0.15 <i>1.06 ± 0.01</i>	54.53 ± 9.19 <i>0.92 ± 0.15</i>	104 ± 6
	8 heures	2173	3.29 <i>0.41</i>	9.86 <i>0.91</i>	14.45 <i>2.04</i>	13.24 <i>1.11</i>	59.16 <i>0.95</i>	103
	13 heures	1868	6.21 <i>0.43</i>	24.19 <i>1.29</i>	28.48 <i>3.96</i>	18.09 <i>1.79</i>	23.03 <i>0.46</i>	99
Alanine amino transférase	Témoins	1252 ± 200	6.07 ± 0.03 <i>0.48 ± 0.05</i>	10.43 ± 1.36 <i>0.91 ± 0.02</i>	6.22 ± 0.90 <i>1.02 ± 0.05</i>	4.22 ± 0.34 <i>0.41 ± 0.03</i>	73.06 ± 0.09 <i>1.23 ± 0.02</i>	89 ± 5
	8 heures	1345	2.53 <i>0.31</i>	6.38 <i>0.59</i>	5.6 <i>0.79</i>	4.31 <i>0.36</i>	81.18 <i>1.3</i>	82
	13 heures	1751	1.55 <i>0.11</i>	7.05 <i>0.37</i>	3.13 <i>0.43</i>	2.66 <i>0.26</i>	85.61 <i>1.73</i>	97

Tableau VII₆: Distribution des enzymes de *T. b. brucei* après centrifugation différentielle d'homogénats provenant d'une part de rats témoins (moyenne de deux expériences ± écart-type) et d'autre part de rats traités avec une dose de 2.5 mg/kg de Bromure d'éthidium respectivement pour une durée de 8 heures et une durée de 13 heures.

L'injection a lieu le troisième jour de l'infestation.

Les valeurs des activités spécifiques sont données en milliunités/mg de protéines pour les enzymes et les protéines sont exprimées en mg. L'activité enzymatique trouvée dans chaque fraction et la récupération sont exprimées en pourcentage de l'activité de l'homogénat (E + N).

[caractère droit]

Les activités spécifiques relatives sont représentées en italique.

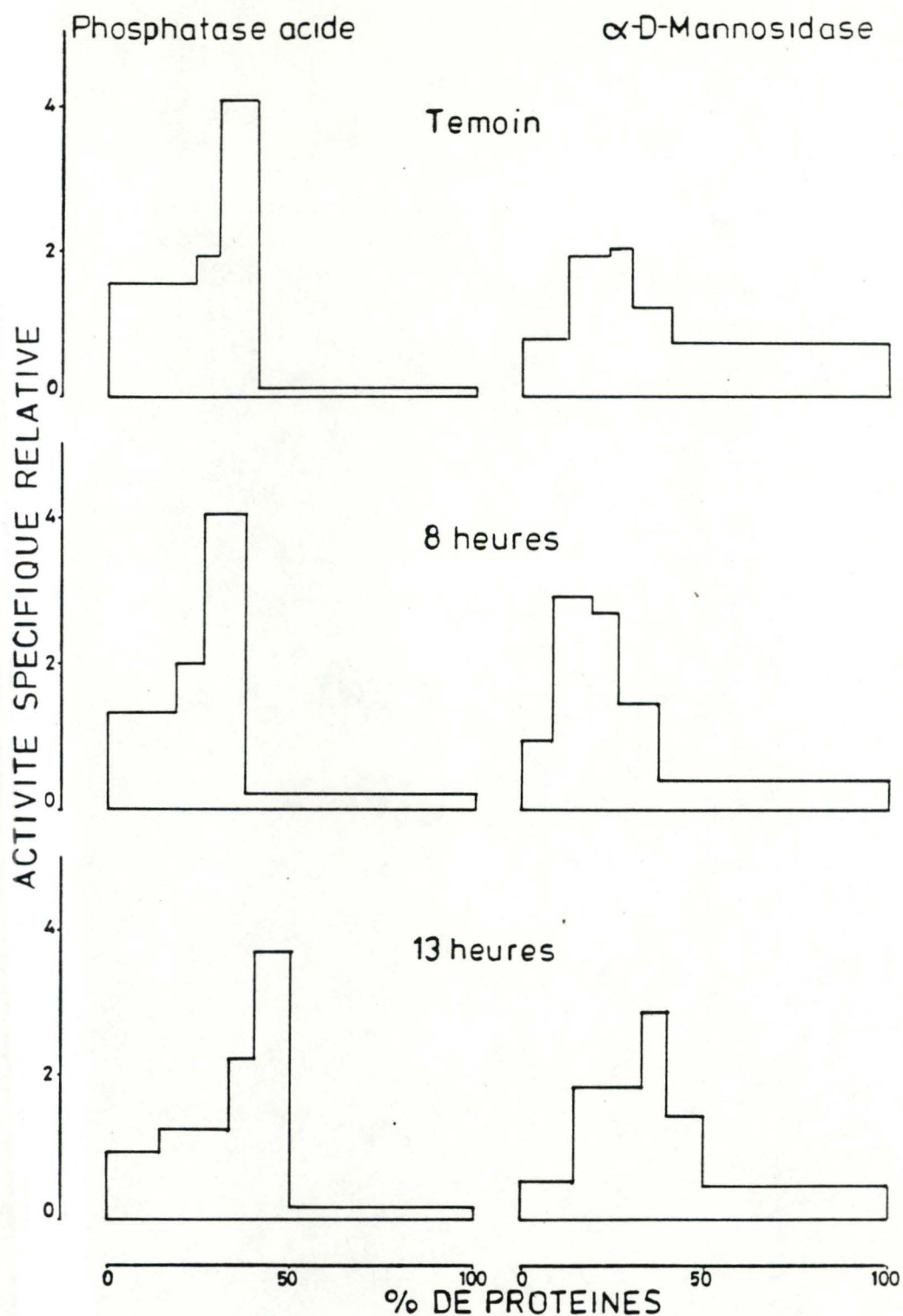


Fig 4.3.1.1. : Distribution des enzymes de *T.b. brucei* isolés d'une part à partir de rats témoins et d'autre part à partir de rats traités avec une dose de 2,5 mg/kg de Bromure d'éthidium pour des durées de 8 et 13 heures.

Les fractions obtenues par centrifugation différentielle sont placées dans l'ordre de leur séparation; de gauche à droite : nucléaire (N), à gros granules (LG), à petits granules (SG), microsomal (M) et surnageant final (S).

L'ordonnée représente l'activité spécifique relative (pourcentage de l'activité totale/pourcentage de la quantité totale de protéines). L'abscisse représente le pourcentage cumulé de protéines.

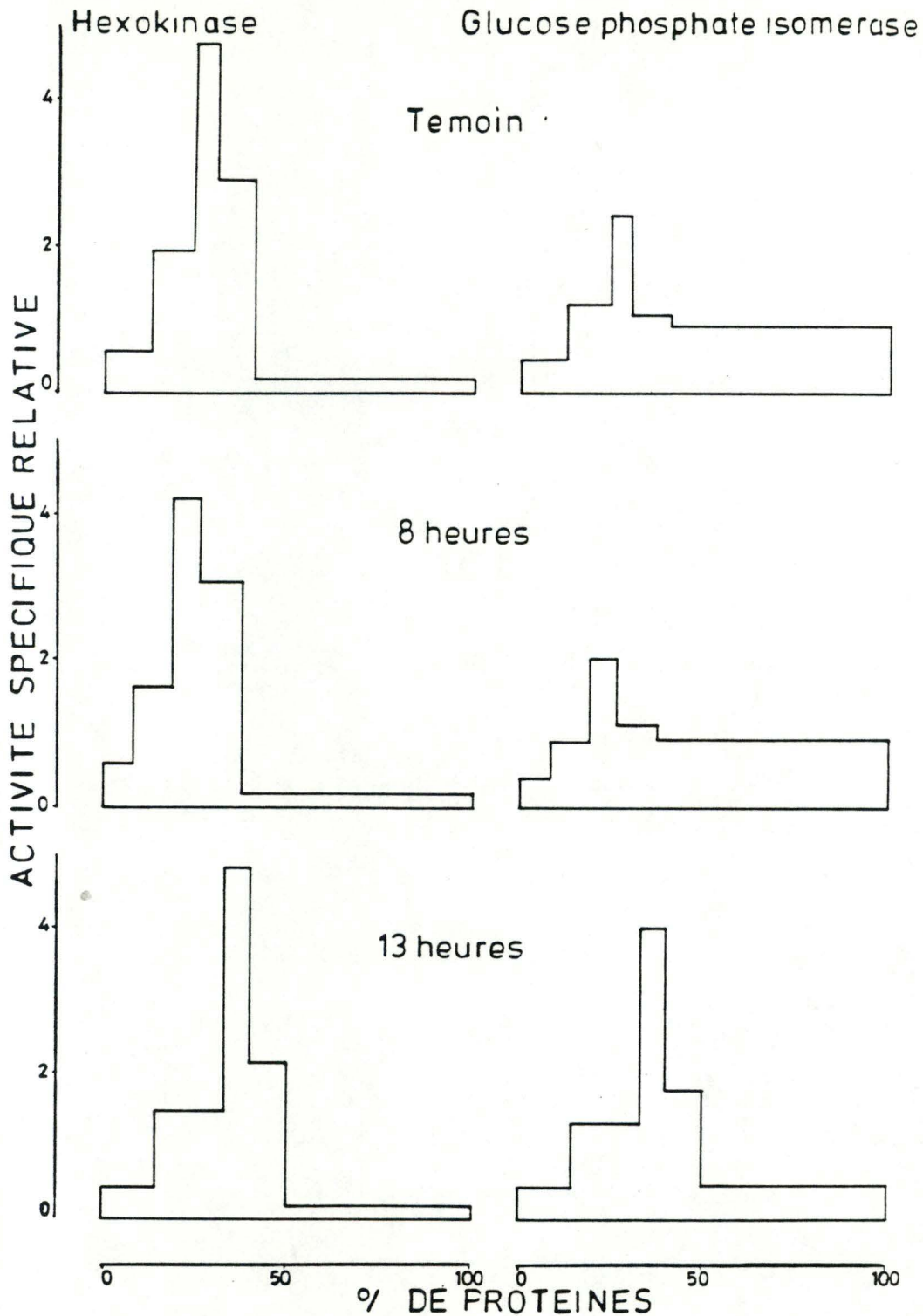


Fig 4.3.1.2. : Distribution des enzymes de *T.b. brucei* isolés d'une part à partir de rats témoins et d'autre part à partir de rats traités avec une dose de 2,5 mg/kg de Bromure d'éthidium pour des durées de 8 heures et 13 heures.

Les fractions obtenues par centrifugation différentielle sont placées dans l'ordre de leur séparation; de gauche à droite : nucléaire (N), à gros granules (LG), à petits granules (SG), microsomal (M) et surnageant final (S).

L'ordonnée représente l'activité spécifique relative (pourcentage de l'activité totale/pourcentage de la quantité totale de protéines). L'abscisse représente le pourcentage de protéines.

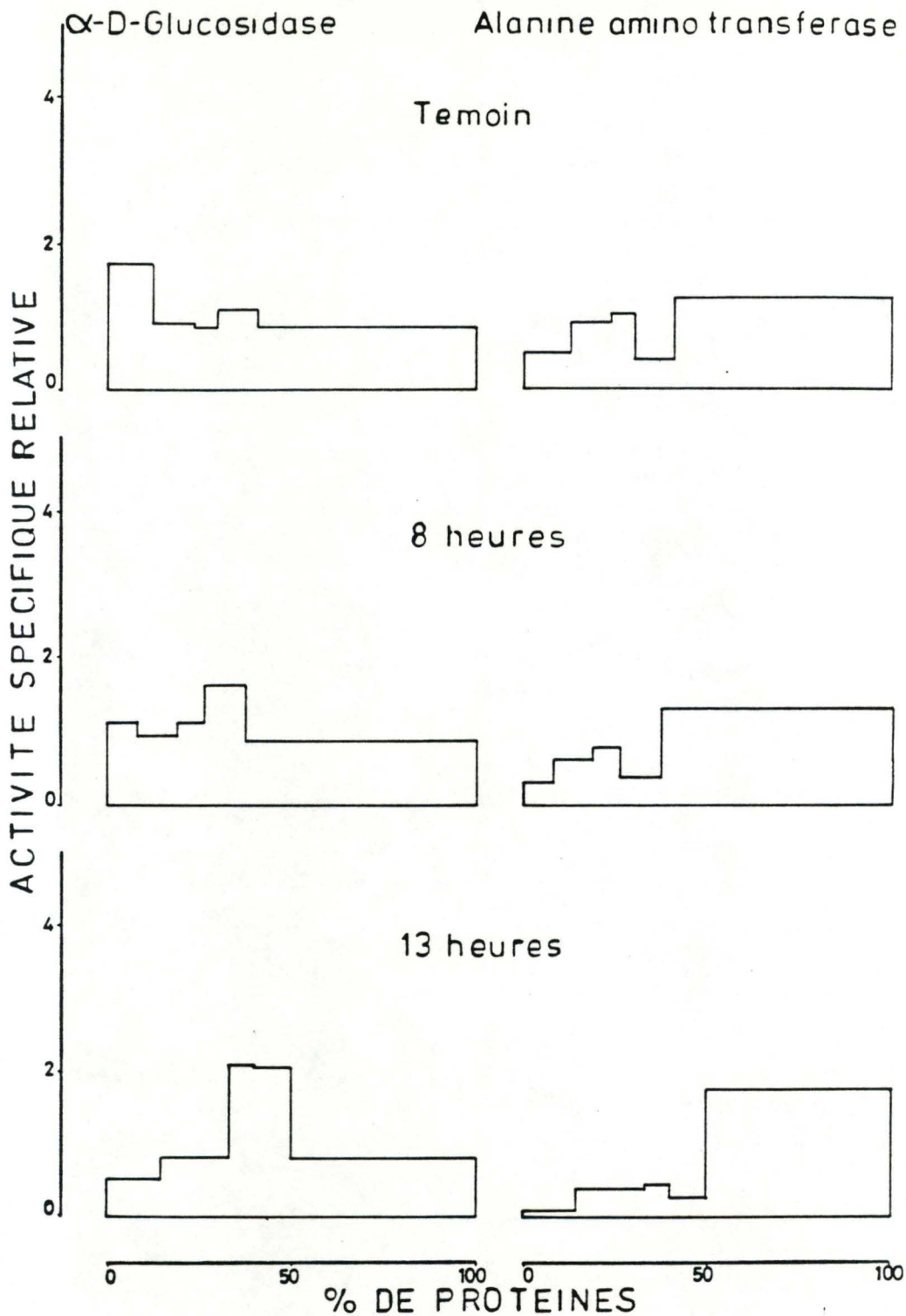


Fig 4.3.1.3. : Distributions des enzymes de *T.b. brucei* isolés d'une part à partir de rats témoins et d'autre part à partir de rats traités avec une dose de 2,5 mg/kg de Bromure d'éthidium pour des durées de 8 heures et 13 heures.

Les fractions obtenues par centrifugation différentielle sont placées dans l'ordre de leur séparation; de gauche à droite : nucléaire (N), à gros granules (LG), à petits granules (SG), microsomal (M) et surnageant final (S).

L'ordonnée représente l'activité spécifique relative (pourcentage de l'activité totale/pourcentage de la quantité totale de protéines). L'abscisse représente le pourcentage cumulé de protéines.

4. 3. 2. Effet du Bromure d'éthidium à la dose de 16 mg/kg

4. 3. 2. 1. Effet sur la quantité totale de protéines.

Les résultats sont présentés dans le tableau VIII a.

Dans ce tableau, nous observons une diminution très nette de la quantité de protéines de trypanosome par rat traité avec 16 mg/kg de B.E.

4. 3. 2. 2. Effet sur les activités spécifiques.

Les valeurs des activités spécifiques pour les enzymes des trypanosomes isolés à partir des rats témoins et à partir de rats traités avec 16 mg/kg de B.E. sont présentés dans le tableau VIII b.

Nous n'avons pas observé de changement évident au niveau des activités spécifiques pour les différents enzymes dosés.

4. 3. 2. 3. Effet sur la distribution des enzymes et des protéines.

Les valeurs des pourcentages d'activités et des activités spécifiques relatives sont présentées dans le tableau VIII b. Les figures 4.3.2.1.,-2,-3 représentent les distributions des enzymes reprises dans ce tableau. Les distributions enzymatiques témoins et celles provenant des trypanosomes soumis à l'action du B.E. ne montrent pratiquement aucune différence.

Tableau VIIIa

Expérience	Durée du trait.	Nombre de rats	Quantité totale de protéines (E + N)	Quantité de protéines par rat
Témoins		4	90.88	22.72
16 mg/kg	9h 00	4	36.76	9.19

Tableau VIIIa : Quantité totale de protéines dans des homogénats (E + N) de *T. b. brucei* isolés d'une part à partir de rats témoins (moyenne de deux expériences), et d'autre part à partir de rats traités avec 16 mg/kg de Bromure d'éthidium pour une durée de 9 heures. L'injection a lieu le troisième jour de l'infestation. La quantité totale de protéines et la quantité de protéines par rat infesté sont exprimées en mg.

Enzymes	Expériences	Activité Spécifique (E+N)	% Activité relative					% Récupération
			N	LG	SG	P	S	
Protéines	Témoins	90.88 ± 13.78	12.72 ± 1.31	11.44 ± 1.26	6.07 ± 0.59	10.32 ± 0.07	59.45 ± 0.57	97 ± 3
	9 heures	36.76	9.95	11.61	6.71	10.88	60.85	105
Phosphatase acide	Témoins	215 ± 15	19.83 ± 2.45 <i>1.55 ± 0.03</i>	17.78 ± 2.04 <i>1.55 ± 0.02</i>	11.85 ± 0.36 <i>1.95 ± 0.14</i>	41.95 ± 1.8 <i>4.06 ± 0.15</i>	8.59 ± 1.02 <i>0.14 ± 0.02</i>	89 ± 3
	9 heures	188	9.33 <i>0.95</i>	16.42 <i>1.41</i>	12.72 <i>1.88</i>	53.14 <i>4.88</i>	8.39 <i>0.14</i>	112
α-d-Mannosidase	Témoins	1.45 ± 0.4	10.05 ± 0.21 <i>0.79 ± 0.09</i>	21.75 ± 2.88 <i>1.90 ± 0.40</i>	12.19 ± 1.75 <i>2.01 ± 0.09</i>	12.45 ± 2.69 <i>1.21 ± 0.20</i>	43.56 ± 4.97 <i>0.73 ± 0.09</i>	79 ± 2
	9 heures	1.7	14.89 <i>1.49</i>	26.22 <i>2.26</i>	21.04 <i>3.13</i>	15.19 <i>1.39</i>	22.66 <i>0.37</i>	84
α-d-Glucosidase	Témoins	3.54 ± 0.006	21.74 ± 6.31 <i>1.71 ± 0.29</i>	10.68 ± 0.28 <i>0.93 ± 0.11</i>	5.23 ± 1.38 <i>0.86 ± 0.13</i>	11.29 ± 0.13 <i>1.09 ± 0.02</i>	51.06 ± 8.10 <i>0.86 ± 0.12</i>	96 ± 4
	9 heures	4.49	10.85 <i>1.09</i>	13.73 <i>1.18</i>	10.97 <i>1.63</i>	21.12 <i>1.94</i>	43.33 <i>0.71</i>	99
Hexokinase	Témoins	1043 ± 128	7.12 ± 0.94 <i>0.56 ± 0.02</i>	22.32 ± 2.88 <i>1.95 ± 0.42</i>	29.00 ± 6.16 <i>4.78 ± 0.61</i>	30.00 ± 6.74 <i>2.91 ± 0.62</i>	11.56 ± 3.24 <i>0.19 ± 0.05</i>	92 ± 8
	9 heures	1012	5.75 <i>0.58</i>	19.21 <i>1.65</i>	32.89 <i>4.9</i>	35.64 <i>3.27</i>	6.51 <i>0.11</i>	97
Glucose phosphate isomérase	Témoins	1758 ± 152	5.81 ± 1.88 <i>0.46 ± 0.12</i>	14.00 ± 3.22 <i>1.22 ± 0.37</i>	14.71 ± 4.24 <i>2.42 ± 0.51</i>	10.95 ± 0.15 <i>1.06 ± 0.01</i>	54.53 ± 9.19 <i>0.92 ± 0.15</i>	104 ± 6
	9 heures	2147	4.52 <i>0.45</i>	13.05 <i>1.12</i>	19.4 <i>2.89</i>	12.64 <i>1.16</i>	50.38 <i>0.83</i>	102
Alanine amino transférase	Témoins	1252 ± 200	6.07 ± 0.03 <i>0.48 ± 0.05</i>	10.43 ± 1.36 <i>0.91 ± 0.02</i>	6.22 ± 0.90 <i>1.02 ± 0.05</i>	4.22 ± 0.34 <i>0.41 ± 0.03</i>	73.06 ± 0.09 <i>1.23 ± 0.02</i>	89 ± 5
	9 heures	675	5.64 <i>0.57</i>	7.14 <i>0.61</i>	9.7 <i>1.44</i>	6.71 <i>0.62</i>	70.81 <i>1.16</i>	100

Tableau VIII_b: Distribution des enzymes de *T. b. brucei* après centrifugation différentielle d'homogénats provenant d'une part de rats témoins (moyenne de deux expériences ± écart-type) et d'autre part de rats traités avec une dose de 16 mg/kg de Bromure d'éthidium pendant une durée de 9 heures. L'injection a lieu le troisième jour de l'infestation.

Les valeurs des activités spécifiques sont données en milliunités/mg de protéines pour les enzymes et les protéines sont exprimées en mg. L'activité enzymatique trouvée dans chaque fraction et la récupération sont exprimées en pourcentage de l'activité de l'homogénat (E + N). [caractère droit]

Les activités spécifiques relatives sont représentées en italique.

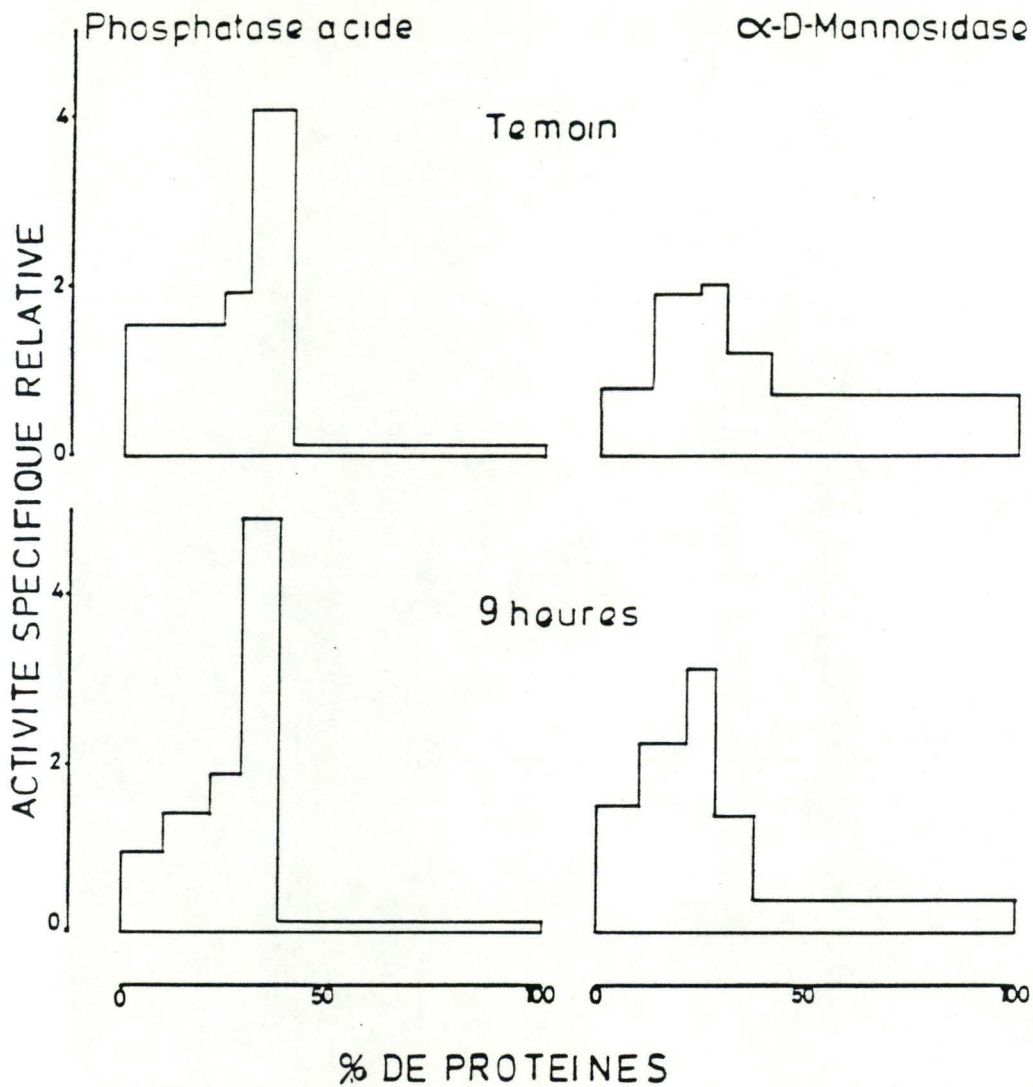


Fig 4.3.2.1. : Distribution des enzymes de *T.b. brucei* isolés d'une part à partir de rats témoins et d'autre part à partir de rats traités avec une dose de 16 mg/kg de Bromure d'éthidium pour une durée de 9 heures.

Les fractions obtenues par centrifugation différentielle sont placées dans l'ordre de leur séparation ; de gauche à droite : nucléaire (N), à gros granules (LG), à petits granules SG), microsomal (M) et surnageant final (S).

L'ordonnée représente l'activité spécifique relative (pourcentage de l'activité totale/pourcentage de la quantité totale de protéines). L'abscisse représente le pourcentage cumulé de protéines.

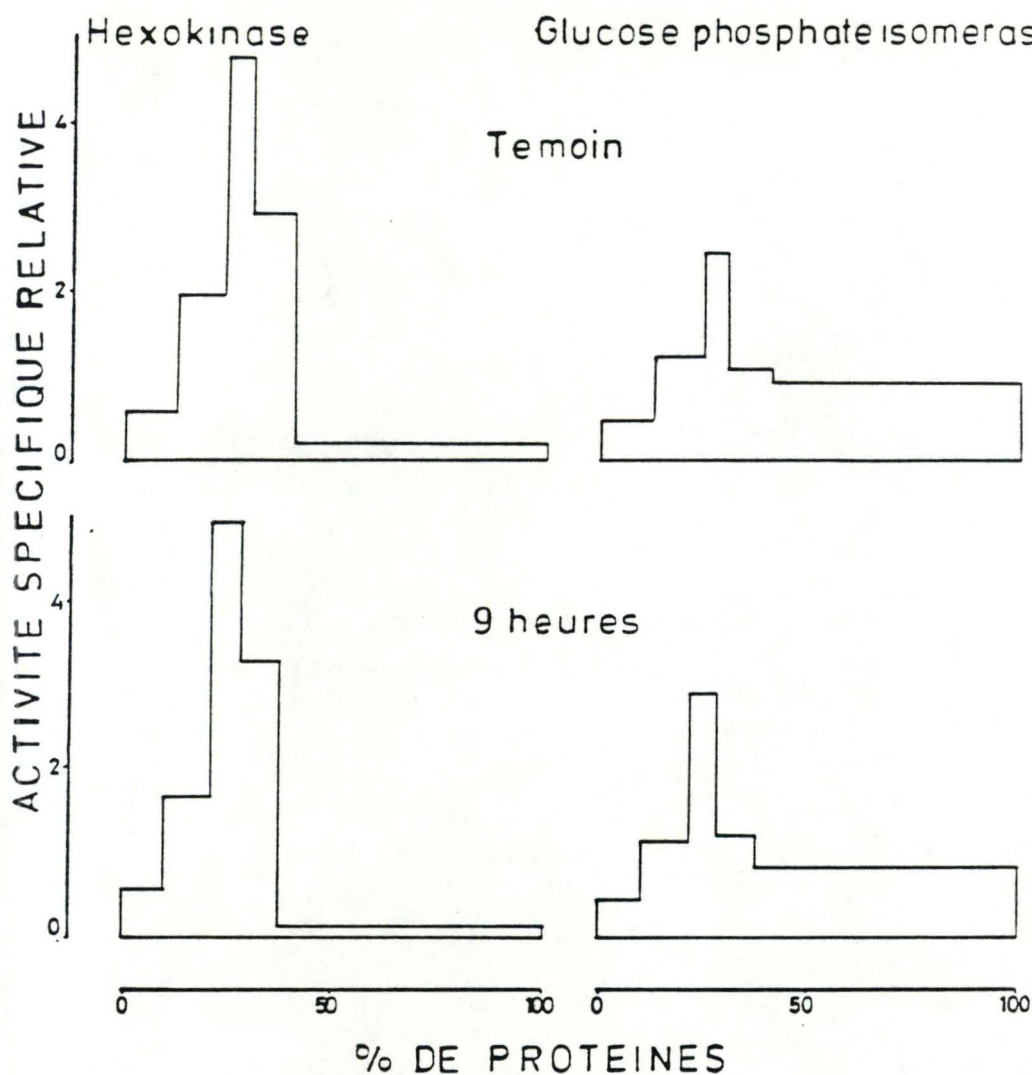


Fig 4.3.2.2. : Distribution des enzymes de *T.b. brucei* isolés d'une part à partir de rats témoins et d'autre part à partir de rats traités avec une dose de 16 mg/kg de Bromure d'éthidium pour une durée de 9 heures.

Les fractions obtenues par centrifugation différentielle sont placées dans l'ordre de leur séparation ; de gauche à droite : nucléaire (N), à gros granules (LG), à petits granules (SG), microsomal (M) et surnageant final (S).

L'ordonnée représente l'activité spécifique relative (pourcentage de l'activité totale/pourcentage de la quantité totale de protéines). L'abscisse représente le pourcentage cumulé de protéines.

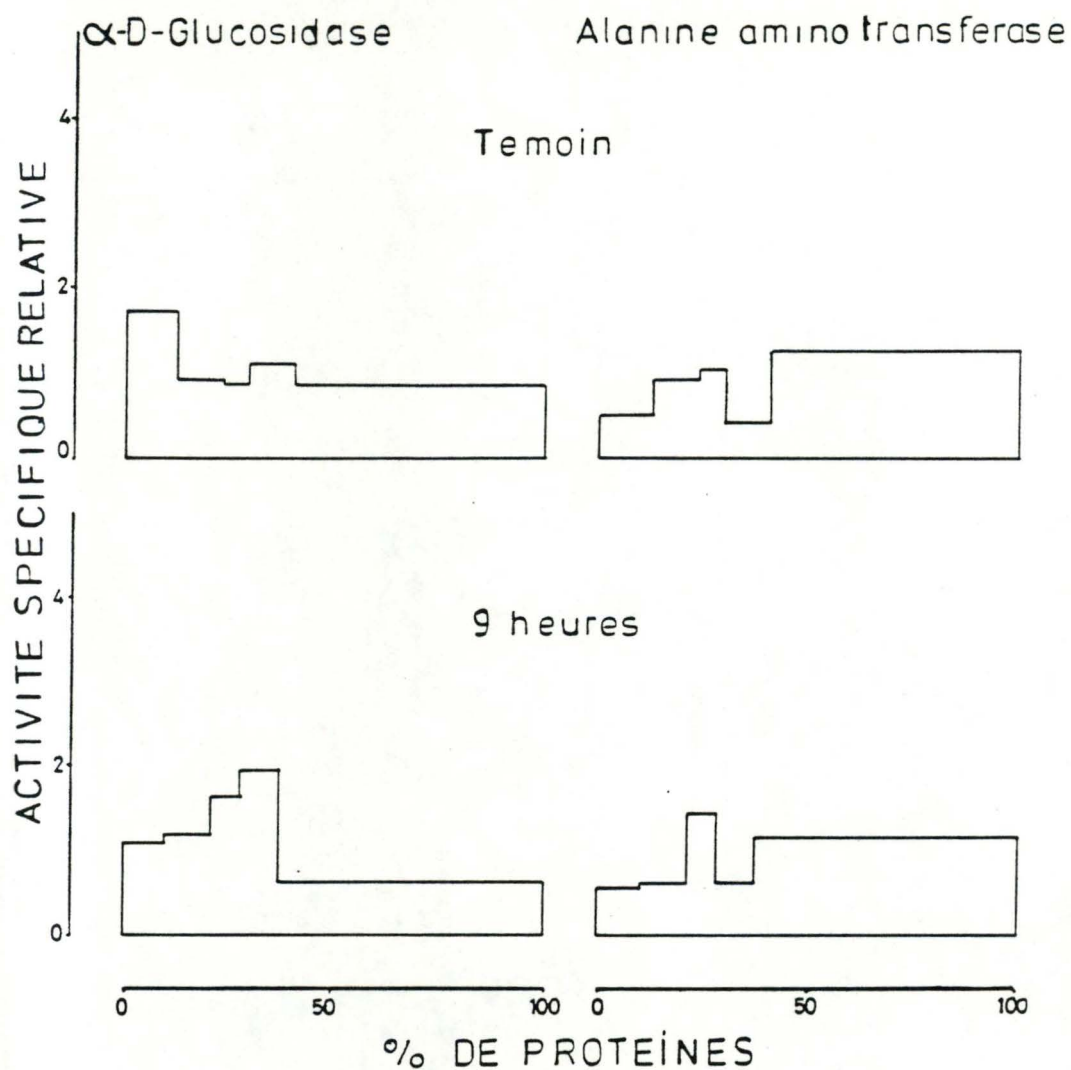


Fig 4.3.2.3. : Distribution des enzymes de *T.b.brucei* isolés d'une part à partir de rats témoins et d'autre part à partir de rats traités avec une dose de 16 mg/kg de Bromure d'éthidium pour une durée de 9 heures.

Les fractions obtenues par centrifugation différentielle sont placées dans l'ordre de leur séparation; de gauche à droite : nucléaire (N), à gros granules (LG), à petits granules (SG), microsomal (M) et surnageant final (S).

L'ordonnée représente l'activité spécifique relative (pourcentage de l'activité totale/pourcentage de la quantité totale de protéines). L'abscisse représente le pourcentage cumulé de protéines.

CHAPITRE 5 DISCUSSION

5.1 Commentaires sur les Etudes Biochimiques après fractionnement subcellulaire de *Trypanosoma brucei* provenant de rats témoins.

5.1.1 Comparaison des distributions enzymatiques et de la quantité totale de protéines obtenues pour quatre fractionnements témoins.

Il aurait été possible de calculer approximativement le nombre de trypanosome que nous avons en début de chaque fractionnement, à partir de la quantité totale de protéines présentes dans les homogénats. En effet, il a été calculé expérimentalement (DANFORTH, 1917) que 10^8 trypanosomes équivaut à 1mg de protéines. Cependant nous nous sommes moins intéressés au nombre de trypanosomes, mais plus à la quantité totale de protéines et à la distribution de celles-ci dans les différentes fractions.

Les différences observées dans les résultats du tableau II pourraient s'expliquer par la proportion de "Slender forms" et de "Stumpy forms" dans la suspension sanguine injectée (ceci ne peut se vérifier en comptant le nombre de trypanosomes sur cellule de Thomas avant l'inoculation).

En effet, les "Stumpy forms" ne se divisent pas dans le sang de l'hôte vertébré mais ce sont les "Slenders forms" qui sont responsables de l'infection de l'hôte.

Le nombre de rats par expérience et la dilution de l'homogénat de trypanosomes au départ du fractionnement sont deux paramètres importants intervenant respectivement sur la quantité totale de protéines dans l'homogénat et sur la distribution des protéines dans les différentes fractions. Dans les expériences présentées dans le tableau II, ces facteurs ont été modifiés pour les raisons suivantes :

d'une part, le nombre de trypanosomes récoltés doit être élevé afin d'avoir une quantité de matériel suffisante en début de chaque fractionnement et des dosages biochimiques qui y font suite. En sachant que les drogues utilisées ultérieurement agissent notamment en diminuant le nombre de trypanosomes vivants et que le rendement de l'élution n'est pas de 100%, nous avons choisi de prendre quatre rats.

Au point de vue de la dilution, il est important de porter l'homogénat à un volume suffisant (25 ml) afin de mieux purifier les différentes fractions. En effet, par ce biais, on dilue plus fortement les contaminants qui seront donc en proportion moindre dans les culots des fractions ne correspondant pas à leur coefficient de sédimentation. Le même phénomène intervient lors du lavage du culot de l'homogénat brut (essentiellement des grains de silice) et du lavage du culot de la fraction nucléaire. Toutefois, cette dilution ne doit pas être trop importante sinon il se peut que les enzymes à doser, qui ont déjà au départ une faible

activité dans la souche de trypanosome utilisée, soient trop dilués que pour être dosés même à l'aide de microméthodes. Comme les drogues utilisées ultérieurement pourraient agir en diminuant ou en augmentant ces activités, il était indispensable de concentrer l'homogénat (au dépens de la purification) et éventuellement de rediluer les différentes fractions obtenues lors des dosages enzymatiques. L'homogénéisation est un des paramètres le plus important pour expliquer les variations dans la distribution des protéines et des activités enzymatiques. Elle fera l'objet du paragraphe 5.1.2.

En tenant compte de tous les arguments cités, nous avons choisi de prendre comme fractionnement témoin, pour les expériences ultérieures, la moyenne des deux fractionnements avec quatre rats et une dilution de 25 fois l'homogénat.

5.1.2 Problème d'homogénéisation et de fractionnement.

5.1.2.1 Problème d'homogénéisation.

Le culot de trypanosome provenant de la centrifugation de l'éluat est broyé "à sec" avec un volume environ deux fois supérieur de grains abrasifs de "carbonate de silice". L'homogénéisation est poursuivie jusqu'à ce que 90% des cellules soient rompues (vérification au microscope à contraste de phase).

C'est l'étape la plus délicate du fractionnement cellulaire, car il faut faire un compromis entre le nombre de cellules rompues et la bonne conservation des organites. C'est expérimentalement (TONER et WEBER, 1972) qu'il a été déterminé qu'il fallait laisser environ 10% de cellules vivantes (mobiles) pour obtenir la meilleure homogénéisation. Malgré cela, d'un fractionnement à l'autre, le degré d'homogénéisation varie dans des limites qui peuvent approximativement être quantifiées par les écarts types autour des moyennes des activités spécifiques relatives et des pourcentages d'activité dans chaque fraction.

Dans les expériences ultérieures, le processus d'homogénéisation est rendu encore plus délicat, car les trypanosomes, soumis à l'action de l'Antrycide et du Bromure d'éthidium, présentent de nombreuses vacuoles anormales dues à l'action de ces drogues (HENKINET R., 1986) et sont beaucoup plus fragiles à l'homogénéisation. Il faut éviter que ces vacuoles n'éclatent lors de l'homogénéisation.

C'est également pour cette raison que nous avons centrifugé l'éluat à 2500 rpm pendant 20 minutes au lieu de 5000 rpm pendant 10 minutes. Ainsi, nous avons diminué la pression hydrostatique exercée sur les organites lors de la centrifugation. Les conditions de centrifugation ont été les mêmes pour les deux lavages y faisant suite.

Si l'homogénéisation est trop longue, on altère ou on rompt une partie des organites et on libère leur contenu enzymatique. Les enzymes libérés vont principalement se retrouver dans la fraction soluble ou s'absorber non spécifiquement sur des structures membranaires.

Les débris membranaires de ces organites rompus ou partiellement altérés vont changer de taille et de densité et donc sédimenter, avec une partie de leurs enzymes, principalement dans les fractions contenant des organites à plus faible coefficient de sédimentation. Ceci a pour conséquence de déplacer les pourcentages d'activités enzymatiques et de protéines vers le surnageant final et les fractions à faible coefficient de sédimentation, et la purification sera moins bonne dans la ou les fractions dans lesquelles les enzymes marqueurs d'organites sédimentent habituellement.

Il se peut aussi que des enzymes fortement latents, tels que les enzymes contenus dans les glycosomes, voient leur purification augmentée. Les glycosomes, par exemple, étant plus résistants à une longue homogénéisation sont donc libérés des cellules en plus grand nombre, ce qui entraîne un enrichissement accru de la fraction où ceux-ci doivent sédimenter.

Lors d'une homogénéisation modérée, on libère une moins grande proportion d'organites. Ceux-ci vont, durant le fractionnement, sédimenter en plus grand nombre dans la fraction nucléaire avec les cellules entières et partiellement rompues, mais les organites libérés conserveront une structure plus proche de leur structure in vivo. On aura, dans ce cas, moins d'activité enzymatique et de protéines solubilisées, mais on aura une meilleure purification dans les fractions correspondant aux différents organites, avec toutefois un enrichissement dans N supérieur aux autres fractions.

5.1.2.2 Conditions de fractionnement.

Les problèmes concernant la dilution de l'homogénat au départ du fractionnement ont été discutés dans le paragraphe 5.1.1. En plus de ces problèmes, il peut également se produire des changements de distribution des divers enzymes lors des décantations durant un fractionnement. Lorsque nous prélevons l'extrait cytoplasmique et les surnageants des fractions LG puis SG, il y a de faibles quantités des culots N, LG et SG qui sont prélevés et viennent contaminer les fractions E, SG et P respectivement. Cet artéfact de manipulation entraînerait automatiquement un déplacement dans la distribution des enzymes vers les fractions sédimentant à grande vitesse de centrifugation.

Ces problèmes de contamination lors des décantations sont d'autant plus probables que les volumes des culots sont importants et que ceux-ci sédimentent à faible vitesse de centrifugation. Car ces derniers culots sont moins compacts que des culots moins volumineux et sédimentant à grande vitesse de centrifugation.

Il faut également veiller à bien respecter les temps de centrifugation lors du fractionnement car, là aussi, se posent des problèmes de contamination.

5.1.3. Activités spécifiques.

Les résultats ont été présentés dans le tableau III.

Les deux enzymes de la glycolyse (hexokinase et glucose phosphate isomérase) montrent une activité spécifique élevée. Il faut se rappeler que les formes sanguines de *T. brucei* sont entièrement dépendantes de la glycolyse pour leur production d'ATP.

L'activité spécifique élevée de l'alanine amino transférase est probablement nécessaire pour la conversion du pyruvate produit par la glycolyse en alanine.

Il se peut aussi que la présence d'une grande quantité d'alanine amino transférase, nécessaire à la croissance des formes procycliques de trypanosomes en culture sur milieu enrichi en proline (GUTTERIDGE et COOMBS, 1977), reste présente dans les formes sanguines de *Trypanosoma brucei*.

Nous observons également une activité spécifique élevée pour la phosphatase acide. Celle-ci serait sûrement en rapport direct avec le rôle important que jouent les hydrolases dans la nutrition des formes trypomastigotes des trypanosomatidés. Ce rôle important de la phosphatase acide dans la digestion est soutenu par sa localisation subcellulaire diverse au sein du trypanosome (voir introduction).

L' α -D-mannosidase et l' α -D-glucosidase ont une activité beaucoup plus faible par rapport aux quatre enzymes précédents. Ces deux enzymes auraient probablement un rôle dans le changement des glycoprotéines de surface (voir introduction). Ceci indiquerait que le taux d'hydrolyse de ces deux enzymes serait plus faible que pour les enzymes intervenant dans la prédigestion et digestion (phosphatase acide), dans la glycolyse (hexokinase et glucose phosphate isomérase) et dans la transformation du pyruvate (alanine amino transférase) en alanine.

5.1.4 Distribution des enzymes de *T. brucei* après centrifugation différentielle.

Les résultats ont été présentés à la figure 4.1.4.1. correspondant aux valeurs du tableau IV. L'enzyme cytoplasmique de référence de *T. brucei*, à savoir l'alanine amino transférase, se retrouve également en faible quantité dans les fractions autres que le surnageant final. Ceci pourrait être dû à une adsorption non spécifique de cet enzyme sur des membranes.

Il semblerait plus probable que ce soit dû à un phénomène de vésiculation provenant de débris de membranes plasmiques ou de membranes d'organites qui isolent une partie de l'A.A.T., ce qui provoque la sédimentation partielle de cet enzyme en centrifugation différentielle.

La majeure partie de l'activité spécifique relative de la phosphatase acide se retrouve dans la fraction microsomale, ceci serait en faveur d'une localisation au niveau d'un système membranaire subcellulaire. De plus, la poche flagellaire où se localise une grande partie

de cet enzyme est facilement dissociable de la membrane plasmique et forme des vésicules qui sédimentent en partie dans la fraction nucléaire mais également dans les autres fractions.

La phosphatase acide étant un enzyme s'adsorbant facilement, sa libération lors de l'homogénéisation perturbera sa distribution lors du fractionnement.

L' α -D-mannosidase, associée aux lysosomes de *T. brucei* se comporte de la même manière, en centrifugation différentielle, que les enzymes lysosomiaux des encaryotes supérieurs (voir introduction).

La localisation bimodale de l' α -D-glucosidase s'explique par le fait que celle-ci, étant rattachée à la surface de la membrane plasmique, va sédimenter principalement dans la fraction nucléaire contenant, entre autres, des débris de membranes plasmiques et quelques cellules entières, tandis qu'elle sédimentera dans la fraction microsomale (P) car celle-ci reste accrochée à de toutes petites vésicules formées par des portions de membranes plasmiques dissociées de leurs microtubules sous-jacents.

Les glycosomes se répartissent plus ou moins uniformément dans les fractions LG, SG et P.

5.1.5. Comparaison de la répartition des enzymes et des mesures biochimiques obtenues dans nos expériences témoins avec les données de la littérature.

5.1.5.1. Comparaison des activités spécifiques obtenues dans nos expériences témoins avec les données de la littérature.

Les données de la littérature qui nous ont servi comme référence ont été reprises de deux travaux publiés, d'une part par STEIGER et al., 1980 et, d'autre part par OPPERDOES et al., (1977,a). Ces données sont présentées dans les tableaux IX a et IX b.

Au cours de ces deux travaux, les différents auteurs ont utilisé comme parasite : *Trypanosoma brucei brucei* EATRO 427. Nous avons utilisé dans nos expériences le même parasite mais de la souche LUMP 127. Ces deux souches ont la même origine. La souche originelle dénommée stock EATRO 127 a été conservée à l'Université de Liverpool d'où la dénomination LUMP 127 (Liverpool University Medical Protozoology) Transférée en Belgique, cette souche a été clonée. Le clone obtenu s'est révélé beaucoup moins pathogène que la souche originelle. Elle a été rebaptisée EATRO avec la référence 427.

Selon STEIGER et al., 1980, les caractéristiques enzymatiques, testées sur des extraits cytoplasmiques provenant de *Trypanosoma brucei* EATRO 427 sont les mêmes que pour la souche LUMP 127, excepté pour les activités spécifiques des enzymes, sélectionnés comme marqueurs, qui sont deux à huit fois supérieurs que dans la souche LUMP 127. Cependant,

Enzymes	Activité Spécifique (E + N)	% Activité Activité spécifique relative					% Récupération
		N	LG	SG	P	S	
Protéines	131.5	35	5	5	11	44	95
Phosphatase acide	130	35 1	6 1.2	10 2	48 4.36	1 0.02	92
α -d-Mannosidase	1.2	25 0.71	24 4.8	30 6	16 1.45	5 0.11	97
α -d-Glucosidase	0.6	55 1.57	5 1	6 1.2	20 1.82	14 0.32	99
Hexokinase	930	3.6 1.03	18 3.6	26 5.2	18 1.64	2 0.04	97
Alanine amino transférase	523	13 0.37	3 0.6	4 0.8	3 0.27	77 1.75	99

Tableau IX a : Distribution des enzymes de *T. b. brucei* après centrifugation différentielle et séparation en cinq fractions : N, LG, SG, P et S (reprise de STEIGER et al, 1977).

Enzymes	Activité Spécifique (E + N)	% Activité Activité spécifique relative				% Récupération
		N	LG	P	S	
Protéines	144	26	16	15	42	119
Glucose phosphate isomérase	540	21 0.81	39 2.44	25 1.67	15 0.36	90

Tableau IX b : Distribution des enzymes de *T. b. brucei* après centrifugation différentielle et séparation en quatre fractions : N, LG, P et S (reprise de OPPERDOES et al, 1977).

Les valeurs des activités spécifiques sont données en milliunités/mg de protéines pour les enzymes et les protéines sont exprimées en mg. L'activité enzymatique trouvée dans chaque fraction est exprimée en pourcentage de l'activité de l'homogénat.

nous avons obtenu, dans nos expériences, des valeurs d'activités spécifiques supérieures pour quatre des six enzymes dosés.

Les activités spécifiques de l' α -D-mannosidase et de l'hexokinase ont des valeurs comparables dans les deux cas. L' α -D-glucosidase, la glucose phosphate isomérase, l'alanine amino transférase et la phosphatase acide sont respectivement et de façon approximative 6 fois, 3 fois, 2 fois et 1,5 fois plus "actives" que dans la littérature citée. Ces différences sont-elles dues à l'expérimentateur ou proviennent-elles des souches elles-mêmes ?

Il aurait été intéressant, dans nos expériences, que le même manipulateur réalise les mêmes dosages pour la souche EATRO 427 et ainsi apporter un élément nouveau à la question posée. Il est évidemment souhaitable de multiplier le nombre des expériences pour un même type de fractionnement afin de mieux quantifier les variations qui se produisent.

5.1.5.2. Comparaison des distributions enzymatiques de *Trypanosoma brucei* de référence avec les distributions des enzymes dans la littérature.

Les données de la littérature pour établir la comparaison des distributions enzymatiques témoins obtenues dans nos expériences sont celles citées ci dessus.

D'une manière générale, les distributions enzymatiques dans les différentes fractions de nos expériences restent les mêmes mais la purification est moins bonne et plus étalée. De plus, nous avons un pourcentage d'activité plus élevé dans le surnageant final que ceux cités dans la littérature, ce qui voudrait dire que nous avons homogénéisé d'une manière plus drastique. Nous avons donc libéré plus d'organites au départ mais nous en avons également rompus un plus grand nombre. Ceci a eu pour conséquence d'appauvrir la fraction N et d'enrichir la fraction soluble. Mais comme je l'ai dit précédemment, l'homogénéisation est une opération délicate et la vérification au microscope à contraste de phase n'est pas si aisée.

Il est évident que le manipulateur intervient de façon primordiale et par conséquent, il est obligatoire de comparer des expériences réalisées dans les mêmes conditions.

5.2. Comparaison de la répartition des enzymes et des mesures biochimiques réalisées sur *T.b.brucei* isolés à partir de rats traités à l'Antrycide avec nos données de références.

L'Antrycide agit en déplaçant des ions Mg^{2+} et des polyamines, ce qui inactive et agrège les ribosomes cytoplasmiques. Nous avons injecté une seule dose de 7,5 mg/Kg d'Antrycide pour des durées de traitement de 7 heures et de 12 heures.

Essentiellement par manque de temps, un seul fractionnement par traitement a été réalisé.

5.2.1. Effet de l'Antrycide sur la quantité totale de protéines.

5.2.1.1. Effet global de l'Antrycide.

Les résultats sont présentés dans le tableau V. L'Antrycide diminue fortement la quantité totale de protéines de trypanosome par rat infesté (plus de la moitié). Ceci est à mettre en rapport direct avec le mode d'action de l'Antrycide sur les trypanosomes (voir ci-dessus).

5.2.1.2. Effet de la durée du traitement.

Il est à marquer que l'on obtient une quantité totale de protéines de trypanosome par rat plus élevée pour la durée de traitement le plus long. Cette différence paradoxale pourrait s'expliquer par un degré d'infestation plus élevé au moment de l'injection de la drogue aux rats devant subir 12 heures de traitement. En effet la proportion de "Slender forms" et de "Stumpy forms" dans la suspension sanguine ayant servi à l'inoculation des trypanosomes (voir ci-dessus) pouvait être différente d'une expérience à l'autre.

Il se peut aussi que le volume de sang prélevé par rat traité ait été un peu plus important pour les 12 heures par rapport aux 7 heures de traitement. Cependant, nous avons veillé à prélever un volume constant pour chaque rat (12 ± 2 ml).

Un autre facteur pouvant expliquer cette différence est le rendement et le temps mis pour l'élution des trypanosomes. En effet, il faut à la fois élué un maximum de trypanosomes à partir du sang infesté et le faire en un minimum de temps. Les trypanosomes ont été élués dans du tampon PSG, contenant du glucose pour leur permettre de survivre, et récoltés dans un Becher placé dans de la glace, afin de diminuer les réactions enzymatiques. Ces conditions sont toute fois insuffisantes pour permettre une longue survie des trypanosomes (quelques heures).

En effet, les formes sanguines de *Trypanosoma brucei brucei* se maintiennent et prolifèrent difficilement en culture (JADIN , 1978).

5.2.2. Effet de l'Antrycide sur les activités spécifiques.

Etant donné que nous n'avons réalisé qu'un seul fractionnement pour les rats traités, essentiellement par manque de temps, il est difficile de donner un avis définitif quant à l'action de la drogue sur les activités spécifiques. Cependant, les valeurs d'activités spécifiques témoins résultent de la moyenne de deux fractionnements et les écarts-types correspondant peuvent nous donner une idée de la variation des activités spécifiques dans l'homogénat pour les différents enzymes. Ces valeurs sont reprises dans le tableau VI.

Il semble que les activités spécifiques après 7 heures de traitement soit plus éloignées des

valeurs obtenues pour les témoins que les activités spécifiques après 12 heures de traitement.

Que l'effet global de l'Antrycide sur l'activité spécifique aille dans le sens d'une diminution ou d'une augmentation (après traitement) les valeurs obtenues après 12 heures sont plus proches des valeurs témoins. Peut être est-ce dû à l'effet dissipatif de la drogue ?

Une exception, cependant, a été observée à ce phénomène général : l'alanine amino transférase, où l'on remarque une augmentation de l'activité spécifique après traitement mais qui est encore plus prononcée pour l'incubation la plus longue.

Il faut également rester prudent face à ces résultats car le nombre de trypanosomes par millilitres de sang chez les rats traités est certainement inférieur par rapport aux rats témoins (voir effet de l'Antrycide sur la quantité totale de protéines).

Dès lors, il se peut que les activités métaboliques des trypanosomes en plus faible nombre chez un rat soient plus importantes que chez des rats fortement infestés.

Ceci peut s'exprimer par la courbe de parasitémie, celle-ci atteignant un plateau quand le nombre de trypanosomes est approximativement de 10^9 trypanosomes / ml de sang chez un rat de 300 grammes.

Certaines valeurs d'activité spécifiques chez les rats traités étant tellement supérieures à celle des témoins, que l'effet de l'Antrycide n'est pas négligeable et doit être pris en considération.

5. 2. 3. Effet de l'Antrycide sur la distribution des enzymes et des protéines.

Comme nous l'avons dit au paragraphe 5. 3. 1., il est difficile d'interpréter les changements de distribution étant donné que nous n'avons pu réaliser qu'un seul fractionnement par traitement.

Les résultats sont présentés dans le tableau VI et les figures 4.2.3.1.,-2,-3, représentent les distributions des enzymes reprises dans ce tableau.

5. 2. 3. 1. Effet sur la distribution des protéines.

Les différences que nous avons observées au paragraphe 4. 2. 3. 1. d'une part entre la distribution des protéines des fractionnements après traitement à l'Antrycide pris globalement et la distribution témoin, et d'autre part entre les distributions des deux durées de traitement ne correspondent pas à des résultats statistiques (voir ci-dessus). La raison la plus plausible pour expliquer ces déplacements du pourcentage de protéines est sans doute la façon d'homogénéiser. En effet il semblerait que nous ayons homogénéisé d'une manière moins drastique les culots de trypanosomes isolés à partir de rats traités à l'Antrycide, car nous avons observé une solubilisation moins grande des protéines après 7 et 12 heures de traitement. Il pourrait y avoir également des différences au point de vue du

fractionnement lui même : pour les 7 heures de traitement la répartition des protéines est très homogène tandis que pour les témoins et les 12 heures de traitement les contenus en protéines sont plus individualisés au niveau de certaines fractions. Ceci pourrait être dû à des décantations différentes, à des variations au niveau des temps de centrifugation et à bien d'autres raisons que nous avons discutées au paragraphe 5. 1. 2.

Cependant l'augmentation du pourcentage de protéines dans les fractions sédimentables pourrait quand même être dû à l'action de l'Antrycide, car cette drogue déplaçant des Mg^{2+} et des polyamines provoque l'aggrégation des ribosomes cytoplasmiques et entraîne la formation d'espace vide dans le cytoplasme. Les ribosomes ainsi agrégés voient leur taille augmenter. Cette aggrégation va leur conférer un coefficient de sédimentation supérieur aux ribosomes isolés ou aux polyribosomes et leur permettre de sédimenter à des vitesses moins rapides de centrifugation. C'est à dire dans les fractions N, LG et SG au dépens de la fraction P où ils sédimenteraient habituellement.

De plus il semble que, quand la durée du traitement s'allonge, la fraction P voit son pourcentage de protéines diminuer. Mais il faut rester prudent car ce sont des observations basées sur des fractionnements uniques.

5. 2. 3. 2. Effet sur la distribution des enzymes

L'augmentation d'activité des enzymes particulières dans les fractions sédimentables par rapport aux activités enzymatiques de référence s'expliquerait pour les mêmes raisons que pour les variations observées dans la distribution des protéines. A savoir des différences au point de vue des homogénéisations et au point de vue des conditions de fractionnement.

5.3. Comparaison de la répartition des enzymes et des mesures biochimiques réalisées sur *T. brucei* isolés à partir de rats traités avec du Bromure d'éthidium avec nos données de références.

5. 3. 1. Effet du Bromure d'éthidium à la dose de 2.5 mg/ kg.

5.3.1.1. Comparaison des quantités totales de protéines.

Les résultats sont présentés dans le tableau VIIa.

La diminution de la quantité de protéines de trypanosome par rat infesté après traitement au Bromure d'éthidium résulte sûrement de l'action de cette drogue sur le nombre de trypanosomes, car elle diminue le taux de division de ceux-ci en bloquant leur synthèse d'acides nucléiques. Toutefois le B.E. à cette dose n'est pas suffisant pour éliminer la totalité des trypanosomes sanguins. On voit qu'il faut un temps relativement long pour que la drogue agisse. Il se peut aussi que cette diminution de protéines de trypanosomes par rat infecté et

traité au B.E. soit un artéfact de manipulation car n'ayant pu réaliser qu'une seule expérience pour une durée de traitement, nous ne pouvons pas certifier nos observations.

5. 3. 1. 2. Comparaison des activités spécifiques.

Les résultats sont présentés dans le tableau VIIb.

Les différences que nous avons observés dans le paragraphe 4. 3. 1. 2. entre les activités spécifiques des enzymes de *T. brucei* isolés à partir de rats témoins et de rats traités au B.E., peuvent difficilement être interprétables. Car d'une part elles ne sont pas très importantes et d'autre part les valeurs observées ne parviennent que d'une seule expérience, excepté pour les valeurs témoins. Toutefois on pourrait penser que la drogue soit, quand même en partie, responsable de ces différences d'activité car elle perturbe nécessairement le bon déroulement du métabolisme du trypanosome en bloquant la synthèse d'acide nucléique, en dilatant la membrane du réticulum endoplasmique et celle de la métochondrie. De plus, en commun avec toutes les drogues cationiques, le B.E. est capable de réagir avec des groupes intracellulaires amioniques autres que ceux des acides nucléiques.

5. 3. 1. 3. Comparaison des distributions enzymatiques.

Les valeurs des pourcentages des activités et des activités spécifiques relatives sont présentées dans le tableau VII b. Les figures 4. 3. 1. 1. , -2 et -3.

Malgré que nous n'ayons réalisé qu'un seul fractionnement par durée de traitement, il semblerait que le B.E. n'ait pas d'effet sur le comportement de la phosphatase acide, l'hexokinase et l'alanine amino transférase après fractionnement en centrifugation différentielle.

Cette remarque n'est valable évidemment que pour une dose de 2,5 mg/kg de B.E. et des traitements d'une durée de 8 heures et de 13 heures. La délocalisation partielle de l' α -D-manosidase et de l' α -D-glucosidase après traitement est peut-être due à l'action du B.E.)

En effet le B.E. induit la formation d'un certain nombre de vacuoles d'autophagie (HENKINET, 1986).

Il semblerait donc que le processus de digestion du trypanosome soit susceptible d'être augmenté sous l'action du B.E. Ce phénomène pourrait expliquer l'augmentation de taille des organites contenant l' α -D-manosidase puisque les vacuoles de types autophagiques fusionnent avec les lysosomes.

De même la fragilisation du trypanosome sous l'action du B.E. faciliterait les processus de vésiculations lors de l'homogénéisation. Ceci aurait pour conséquence de déplacer l'activité

de l' α -D-glucosidase depuis la fraction N (dans laquelle sédimentent les débris de membranes plasmiques associés à leurs microtubules) vers la fraction P (dans laquelle sédimentent de toutes petites vésicules). Il faut toutefois rester prudent vis à vis de ce genre d'extrapolation surtout si le nombre d'expériences est peu important.

5. 3. 2. Effet du Bromure d'éthidium à la dose de 16 mg/kg.

Les résultats sont présentés dans les tableaux VIII a et VIII b. Le tableau VIII a reprend les quantités totales de protéines et les figures 4.3.2.1.,-2,-3 représentent les distributions des enzymes repris dans le tableau VIII b.

Il semblerait qu'il n'y ait pas d'effet du B.E. à la dose de 16 mg/kg pendant un traitement de 9 heures sur le comportement en centrifugation différentielle de six enzymes que nous avons dosés.

La localisation des différents enzymes reste la même et la répartition du pourcentage de protéines est à peu près semblable.

CHAPITRE 6 : CONCLUSION

Dans ce travail nous avons utilisé la souche *Trypanosoma brucei brucei* LUMP 127 dont le pouvoir pathogène a une action létale entre le troisième et le quatrième jour de l'infestation .

Par la technique du fractionnement subcellulaire et la séparation subséquente d'un homogénat de trypanosomes en plusieurs fractions, nous avons tenté d'analyser quantitativement les modifications biochimiques produites au sein du trypanosome suite à l'action du Bromure d'éthidium et à l'Antrycide.

Il apparaît que l'Antrycide produit des changements dans la distribution et au niveau des activités spécifiques des 6 enzymes dosés, nettement plus importants, que le Bromure d'éthidium.

Ces substances agiraient plutôt en augmentant ou en diminuant l'importance de l'activité enzymatique de certaines voies métaboliques faisant intervenir les enzymes dosés (phosphatase acide, α -D-mannosidase, α -d-glucosidase, hexokinase, glucose phosphate isomérase, alanine amino transférase) qu'en altérant ou en modifiant les propriétés physiques des organites auxquels ces enzymes servent de référence. Nous voulons toutefois rester prudent quant à ces hypothèses.

Ce travail pourrait être suivi par des études biochimiques complémentaires abordant d'autres propriétés des organites subcellulaires telles la densité d'équilibration en gradient de saccharose.

BIBLIOGRAPHIE

- _ ANGELOPOULOS E., 1970.
J.Protozool., 17 , 39-51.
- _ BARNICOT A.J., VAN T HOFF W.G., MORRISSON P.J., ROGERS H.J., 1981.
Experientia, 37, 1290-1291.
- _ BARRETT A.J., HEATH M.F., 1977.
In: Lysosomes. A laboratory Handbook (Dingle, J.T., cd)
19-145, North-Holland, Amsterdam.
- _ BERGMEYER H.U., 1962.
Methoden der Enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim.
- _ BOWMAN I.B.R., FLYNN I.W., 1976.
In: Biology of the kinetoplastides
(LUMSDEN W.H.R., EVANS D.A., eds)
1, 435-476, Academic Press, New-York.
- _ CHARRET R., 1972.
J. Microscopie, 14 , 279-298.
- _ CROSS G.A.M., 1975.
Parasitology, 71, 393-417.
- _ CROSS G.A.M. ,1978.
Biochem.Sci., 3, 49-51.

_ DANFORTH W.F., 1967.

In: Research in Protozoology, (Tze-Tuan CHEN, ed)
1, 201-306, Pergamon Press, Oxford.

_ de DUVE C., PRESSMAN B.C., GIANETTO R., WATTIAUX R., APPELMANS F., 1955.

Biochem. J., 60, 604-617.

_ de DUVE C., 1967.

In: Enzymes cytology (D.B., Loodyn, Ed)
1-26, Ac. Press, Londres et New-York.

_ DELAIN E., BRACK C., RIOU G., FESTY B., 1971.

J. Ultrastruct. Res., 37, 200-218.

_ FAVARD P., 1978.

In: Biologie et Physiologie cellulaire
2, Herman, Paris.

_ GIFFIN B.F., Mc CANN P.P., BITONTI A.J., BACCHI C.J., 1986.

J. Protozool., 33 (n° 2), 238-243

_ GUTTERIDGE W.E., COOMBS G.H., 1977.

Biochemistry of Parasitic Protozoa.
Published by THE MACMILLAN PRESS LTD, 121-145.

_ HART D.T., OPPERDOES F.R., 1984.

Molecular and Biochemical Parasitology, 13, 159-172.

_ HENKINET R., 1986.

Mem: Lic. Sci. Zool., FNDP Namur, 1-82.

_ JADIN J.M., CREEMERS J., 1970.

Arch. Int. Physiol. Biochim., 78, 1001-1002.

_ JADIN J.M., 1971.

Acta Zool. Path. Antwerpiensa, 53, 1-168.

- _ JADIN J.M., 1978.
Cercle Hydrobiologique. Brux., 10, 1-205
- _ LANGRETH S.G., BALBER A.E., 1975.
J. Protozool., 22, 40-53.
- _ LANHAM S.M., 1968.
Nature, 218, 1273-1274.
- _ LANHAM S.M., GODFREY D.G., 1970.
Exp. Parasitol., 28, 521-534.
- _ LAVERAN, MESNIL, 1902.
Ann.Inst.Pasteur, 16, 785-817.
- _ LUMSDEN W.H.R., HERBERT W.J., Mc NEILLAGE G.J.C., 1973
Parasitology, 57, 21-22.
- _ MACADAM R.F., WILLIAMSON J., 1974.
Ann. Trop. Med. Paradiol., 68, 291-299.
- _ MESHNICK S.R., 1984.
Mansfield Parasitic Disease Tome II: Chemotherapy, 165-199.
- _ MILLER, 1959.
Protein method. Anal. Chem., 81, 964.
- _ MILLONIG G., 1961.
J.Biophys.Biochem.Cytol., II, 736-739.
- _ NEWTON B.A., 1957.
J. Gen. Microbiol., 17, 718-730.
- _ NEWTON B.A., CROSS G.A.M. et BAKER J.R., 1973.
IN :SMITH J.E., ASHWORTH J.M. eds, Microbiol.Differentiation, 23 rd Symposium 9
Soc.gen.Microbiol., Cambridge University Press, 339-373.

- _ NOVIKOFF A.B., 1973.
In: Lysosomes and Storage diseases (HERS H.G., et VAN HOOFF F., Eds)
1-41, Ac. Press., New-York.
- _ NWAGWU M., OPPERDOES F.R., 1982.
Acta Tropica, 39, 61-72.
- _ OPPERDOES F.R., BORST P., FONCK K., 1975.
Febs.letters, 62, 169-172.
- _ OPPERDOES F.R., BORST P., de RIJKE D., 1976.
Comp. Biochem. Physiol., 55 B, 25-30.
- _ OPPERDOES F.R., BORST P., 1977 , a.
FEBS Lett., 80, 360-364.
- _ OPPERDOES F.R., BORST P., SPITS H., 1977, b.
Eur. J. Biochem., 76, 21-28.
- _ OPPERDOES F.R., BORST P., BAKKER S., LEENE W., 1977, c.
Eur. J. Biochem., 76, 29-39.
- _ OPPERDOES F.R., NWAGWU M., 1980.
In: The host-invasor Interplay (VAN DEN BOSSCHE H., éd)
683-686, ELSEVIER / North Holland Biomedical, Amsterdam.
- _ PETERS T.J., MULLER M., de DUVE C., 1972.
J. Exp. Med., 136, 117-1139.
- _ REITMAN S., FRANKEL S., 1957.
Am. J. Clin. Pathol., 28, 56-62.
- _ REYNOLDS E.S., 1963.
J.Cell.Biol., 17 , 208-212.

- _ RIOU G., 1970.
Biochem. Pharmac., 19, 1524-1526.
- _ ROBINSON D., WILLCOX P., 1969.
Biochim. Biophys. Acta, 191, 183-186.
- _ STECK E.A., 1972.
IN : The Chemotherapy of protozoan diseases, vol. II ; Section 3; II.101-II.110.
- _ STEIGER R.F., 1973.
Acta Trop., 30, 64-168.
- _ STEIGER R.F., VAN HOOF F., BONTEMPI J., NYSSSENS-JADIN M., DRUETZ J.E., 1979.
Acta Trop., 36, 335-341.
- _ STEIGER R.F., OPPERDOES F.R., BONTEMPI J., 1980.
Eur. J. Biochem., 105, 163-175.
- _ STEINERT M., VAN ASSEL S., STEINERT G., 1969.
Exp. Cell. Res., 56, 69-74.
- _ STEINERT M., 1971.
In: Advances in cytopharmacology (CLEMENTI F., and CECCARELLI B., eds)
229-240, Raven Press, New-York.
- _ THOMAS H.W., 1905.
Brit.Med.J.i., 1140-1142.
- _ TONER J.J., WEBER M.M., 1972.
Biochem. Biophys. Res. commun, 46, 652-660.
- _ TOURE S.M., 1971.
Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop., 24, 381-392.
- _ VAN HOOF F., 1972.
Thesis, Université Catholique de Louvain, Belgium.

_ VICKERMAN, 1965.

Nature, 208 (n° 5012), 762-766.

_ VOORHEIS H.P., GALE J.S., OWEN M.J., EDWARDS W., 1979.

_ WIJERS D.J.B. et WILLET K.C., 1960

Ann .Trop.med.Parasitol., 54 (n° 3), 341-350.

Biochem. J., 180, 11-24.

_ WILLIAMSON J., MACADAM R.F., DIXON H., 1975.

Biochem. Pharmac., 24, 147-151.

_ WILLAMSON J., 1976.

Trop.Dis.Bull., 73, 531-542.

_ WILLIAMSON J., 1979.

Pharmac. Ther., 7, 445-512.