

ÉTUDE DE LA TRANSAMINATION CHEZ *GALLERIA MELLONELLA*

INFLUENCE D'UNE INFECTION VIRALE (« VIROSE A NOYAUX DENSES »)
SUR L'ACTIVITÉ TRANSAMINASIQUE

P. LAVIOLETTE et G. BONNOT

*Laboratoire de Biologie, Institut national des Sciences appliquées,
69 - Villeurbanne*

SOMMAIRE

L'étude du pH optimal de la glutamique-oxalacétique transaminase d'un extrait de *G. mellonella* nous a conduit à admettre l'existence de deux enzymes dont l'activité est respectivement maximale pour les pH 7,2-7,3 et 8,5-9,0.

La seconde enzyme a besoin d'être activée par incubation à 37°C et ne serait pas présente à l'état actif chez l'insecte sain. Par contre, elle apparaît en plus grande quantité lorsque l'extrait provient d'insectes atteints d'une « virose à noyaux denses » (VND).

I. — INTRODUCTION

La transamination est une réaction fondamentale dans le métabolisme des produits azotés. Ce processus permet à l'organisme de concilier ses besoins en acides aminés avec les possibilités offertes par l'assimilation et de régler, en fin de compte, son amino-acidémie.

La glutamique-pyruvique transaminase et la glutamique-oxalacétique transaminase sont les deux transaminases les plus généralement répandues et les plus étudiées. Leur importance fondamentale provient du fait qu'elles utilisent des substrats issus du catabolisme des glucides : acide pyruvique, acide α -cétoglutarique, acide oxalacétique, pour former des acides aminés.

Les insectes sont capables d'effectuer de nombreuses transaminations (FUKUDA, 1956 et FUKUDA, 1957). Les organes les plus riches en transaminase sont le muscle, le corps adipeux, la glande séricigène, alors que l'activité transaminasique de l'hé-

molymphe est faible (FUKUDA, 1957 ; BELZECKA, RACZYNSKA-BOJANOWSKA et HELLER, 1959) ou nulle (KILBY et NEVILLE, 1956).

Le coenzyme des transaminases est, chez l'insecte comme dans le cas le plus général, le phosphate de pyridoxal. (BHEEMESWAR et SREENIVASAYA, 1952) coenzyme fortement lié à l'apoenzyme (RACZYNSKA-BOJANOWSKA et BELZECKA, 1962) puisque le complexe n'est pas détruit par dialyse.

Lorsque des insectes subissent une administration de chloromycétine incorporée à leur nourriture, leur hémolymphe présente une activité transaminasique accrue. (SHYAMALA et BHAT, 1955).

Par contre, au cours de diverses manifestations pathologiques, on note des perturbations considérables de l'acido-aminoémie des insectes (DRILHON et VAGO, 1953).

Il nous a paru intéressant d'étudier l'activité transaminasique d'extraits d'un insecte : *G. mellonella* et de rechercher si les modifications qualitatives et quantitatives de l'acido-aminoémie au cours d'une maladie virale n'ont pas pour origine un fonctionnement aberrant d'une enzyme importante du métabolisme des acides aminés : la glutamique-oxalacétique transaminase (GOT).

Remarquons que chez l'homme le taux des transaminases sériques est considérablement augmenté au cours de diverses maladies, notamment l'infarctus du myocarde et la pancréatite aiguë hémorragique. De même, l'activité transaminasique sérique est accrue par l'irradiation X à doses sublétales. Ces constatations peuvent être rapprochées de l'hypothèse selon laquelle les transaminases ne seraient pas des constituants sanguins proprement dits mais proviendraient de lysés cellulaires, physiologiques ou pathologiques.

II. — MATÉRIEL, ET MÉTHODES

a) Extraits enzymatiques.

Cent *Galleria* au stade prénympe sont écrasées dans une presse de Fischer. Le liquide ainsi exprimé est recueilli sous toluène et à froid, puis dilué par 10 ml de tampon phosphate 0,01 M (pH 6,5). Après centrifugation à froid, seule la fraction aqueuse est recueillie et traitée par l'acétone selon la méthode exposée par MORTON (1955) : addition lente de 10 volumes d'acétone pure anhydre à — 20°C sous agitation rapide. Essorage sur bûchner équipé d'un filtre Whatmann n° 1, trois lavages du précipité par chaque fois 3 volumes d'acétone anhydre à — 20°C.

La poudre acétonique ainsi obtenue se conserve dans un dessiccateur à 4°C.

Cent larves fournissent en moyenne 0,98 g de poudre.

b) Substrats.

Les substrats sont toujours des solutions respectivement 0,1 M en aspartate et en α -cétoglutarate dans des tampons phosphates 0,1 M.

c) Incubation.

Un millilitre d'une suspension aqueuse contenant 50 mg de poudre acétonique est ajouté à 10 ml de substrat tamponné. La réaction s'effectue à 37°C au bain-marie, avec agitation permanente.

Des prises d'essai de 1 ml sont effectuées en fonction du temps écoulé et versées dans 1 ml d'acide trichloracétique à 5 p. 100 pour bloquer la réaction et précipiter les protéines qui sont éliminées par centrifugation.

d) Chromatographie et dosage.

Les différents surnageants obtenus sont chromatographiés sur couche mince de poudre de cellulose avec le solvant : *n*-butanol, acide acétique, eau 3-1-1 v/v/v.

Le chromatogramme est révélé de façon partielle par une légère pulvérisation de ninhydrine à 0,25 p. 100 dans l'acétone.

Le support cellulosique correspondant à chacune des taches d'acide aspartique et d'acide glutamique est prélevé et recueilli dans des tubes à hémolyse.

La révélation est achevée après addition dans chaque tube de 2 ml de ninhydrine à 3 p. 100 dans le méthyl-cellosolve et chauffage à 100° pendant 15 mn.

La coloration ainsi obtenue est stabilisée en ajoutant 1 ml de CuSO_4 à 1 p. 1 000.

Après une centrifugation éliminant la poudre de cellulose, la densité optique des éluats est mesurée au photomètre à 5 200 Å, maximum d'absorption du pourpre de Ruhman dans ces conditions.

Avec cette méthode, la coloration des éluats suit la loi de Beer-Lambert. Mais le coefficient de proportionnalité entre la densité optique et la concentration en acide aminé varie beaucoup en fonction des conditions dans lesquelles la révélation s'est effectuée, notamment du temps et de la température de chauffage. Aussi ne doit-on comparer directement que des résultats provenant d'une même série d'essais menés d'une façon parfaitement homogène (chromatographie sur la même plaque, révélation et élution simultanées).

Les comparaisons entre séries différentes sont autorisées par l'incorporation à chaque série de témoins d'acide glutamique et d'acide aspartique servant à la détermination des coefficients de colorabilité au sein de cette série.

III. — RÉSULTATS

A — *Transamination glutamique-oxalacétique chez Galleria mellonella*

1° Influence du pH.

Les substrats tamponnés à des pH compris entre 4,0 et 9,0 ont été proposés à la GOT de la poudre acétonique d'insecte sain.

L'activité de la transaminase a été exprimée par le rapport du nombre de moles d'acide glutamique formé à celui d'acide aspartique restant, rapport indépendant de la quantité de milieu déposé sur le chromatogramme.

pH	4,0	5,0	6,1	7,0	7,5	7,75	8,0	8,5	9,0
Activité GOT	1,10	2,60	5,85	14,95	12,2	8,65	10,8	24,35	20,65

Dans ces conditions, nous avons mis en évidence deux pH optimum.

l'un à 7,2 — 7,3
l'autre à 8,5 — 9,0 (fig. 1)

Deux séries de mesures ont été effectuées pour confirmer la position des points obtenus ; la première a été menée avec des dépôts de témoins incorporés avant migration du chromatogramme, la seconde après migration.

Dans le premier cas, les résultats diffèrent des précédents de moins de 1,5 p. 100 et n'altèrent pas l'allure de la courbe.

Avec la seconde série de dosages, nous avons obtenu une courbe qui peut se déduire de celle représentée dans la figure 1 par affinité orthogonale par rapport à l'axe des abscisses.

En effet, on note au cours du développement du chromatogramme une perte de substance, perte variable notamment en fonction de la nature du produit chromatographié, ce qui conduit dans le cas de témoins non développés à l'évaluation par défaut des quantités déposées. De plus, les pertes en migration sont supérieures

pour l'acide glutamique à celles de l'acide aspartique d'où l'obtention de rapports de concentration en acide glutamique par rapport à celle de l'acide aspartique, inférieurs à ceux obtenus précédemment.

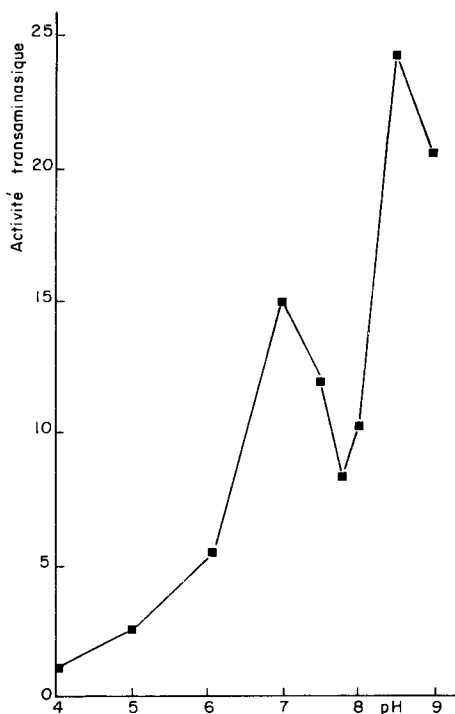


FIG. 1. — Variation de l'activité transaminasique en fonction du pH. En ordonnée, le nombre de moles d'acide glutamique formé pour 100 moles d'acide aspartique restant (Incubation 75 mn à 37°).

2° Influence de la durée de l'incubation.

L'analyse de la concentration en acide glutamique des milieux réactionnels, pour chaque pH étudié, en fonction du temps d'incubation fournit la série de courbes de la figure 2, traduisant la cinétique de la réaction aux pH considérés.

Ces diagrammes montrent que pour les pH neutres ou faiblement basiques (7,0 ; 7,5) la vitesse initiale de réaction est relativement élevée. Au cours de l'incubation, la vitesse est assez peu modifiée dans le temps avant de s'annuler lorsque la concentration en acide glutamique atteint 6 $\mu\text{moles/ml}$ de milieu.

A pH 8,5 la vitesse initiale est sensiblement deux fois moindre que précédemment, mais après 50 minutes d'incubation, on observe une brusque augmentation de la vitesse de réaction. L'équilibre est réalisé lorsque le milieu réactionnel contient $9,9 \times 10^{-8}$ moles d'acide glutamique par 10 μl , soit 9,9 $\mu\text{moles/ml}$.

A pH 9,0 la vitesse initiale est pratiquement nulle. L'accélération de la réaction a lieu après une incubation de 45 minutes, mais on n'atteint plus, après 90 minutes, qu'une concentration de 7,2 $\mu\text{moles/ml}$.

B — Influence de la « virose à noyaux denses »
sur l'activité de la GOT de *G. mellonella*

Nous avons effectué les analyses sur des larves atteintes d'une virose apparue dans nos élevages (MEYNADIER, VAGO, PLANTEVIN, ATGER, 1964) et qui, depuis, a été décrite et étudiée par VAGO et ses collaborateurs (VAGO, MEYNADIER, DUTHOIT, 1964 ; AMARGIER, VAGO, MEYNADIER, 1965 ; VAGO et LUCIANI, 1965) (1).

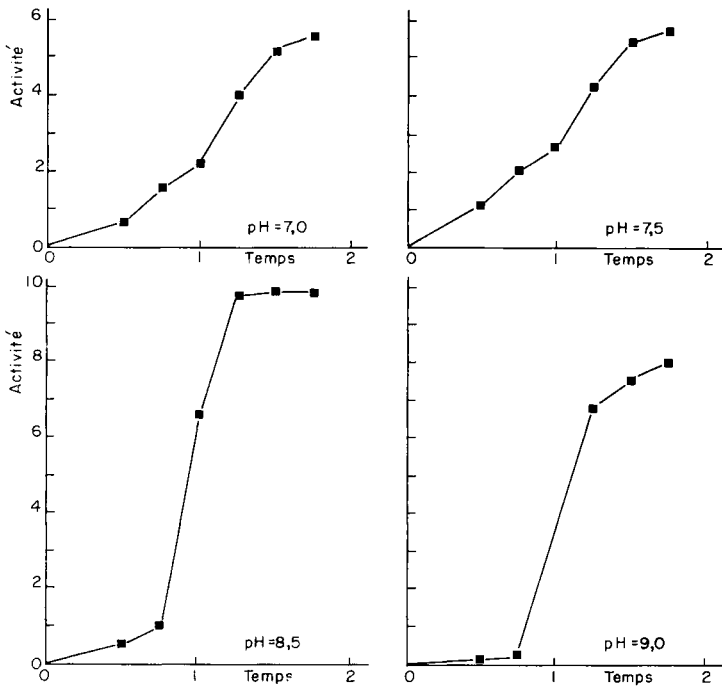


FIG. 2. — Intensité de la réaction de transamination glutamique-oxalacétique (micromoles d'acide glutamique apparues dans 1 ml de milieu) en fonction du temps exprimé en heures d'incubation à 37° pour différentes valeurs de pH.

Des poudres acétoniques ont été réalisées à partir d'insectes malades, à deux stades de l'évolution de la virose.

a) Larves ayant un aspect lactescent et présentant une motricité altérée : mises sur le dos, elles mettent longtemps à se retourner.

b) Larves complètement paralysées à l'exception des mandibules.

Le niveau d'activité transaminasique chez les insectes virosés se révèle nettement différent de celui des insectes sains.

(1) Cette virose nouvelle (VND) très contagieuse, est caractérisée par une forte hypertrophie nucléaire atteignant de très nombreux tissus (tissu adipeux, hypoderme, hémocytes, cellules pérित्रachéales entre autres). Le virus isolé est parasphérique et s'accumule en un volumineux corps d'inclusion intra-nucléaire.

Ses caractères cytologiques confèrent à cette maladie virale, distincte de toutes les polyédries ou granulososes connues chez les Lépidoptères, une position originale parmi les affections à virus des Invertébrés.

Ainsi, testés dans des conditions identiques (incubation à 37°C pendant 1 heure) nous avons relevé les taux de transamination suivants exprimés en quantité d'acide glutamique formé aux pH de 7,2 et de 8,8.

	Insectes sains	Insectes virosés (a)	Insectes virosés (b)
pH 7,2.....	3,40	3,16	2,36
pH 8,8.....	2,36	2,64	3,20

Il apparaît que la transamination est profondément altérée au cours de l'évolution de la maladie. Ainsi le taux de transamination à pH 7,2 diminue alors que l'activité à pH 8,8 s'accroît lors du développement de la virose (fig. 3).

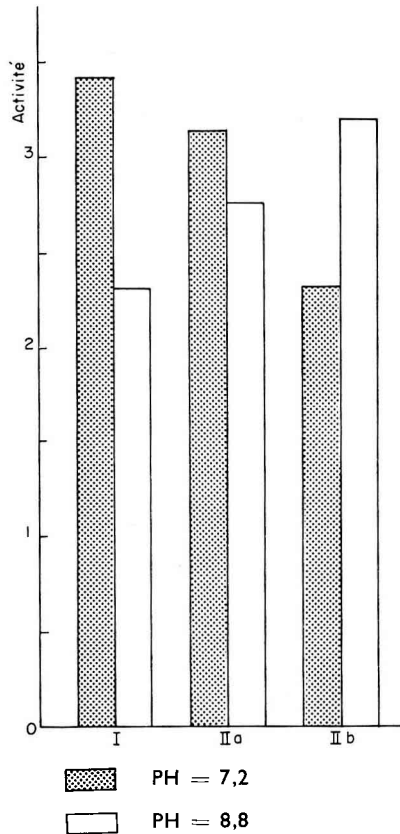


FIG. 3. — *Activité transaminasique exprimée en micromoles d'acide glutamique formé, après une heure d'incubation à 37°C, dans 1 ml de substrat, comparée entre insecte sain et insecte virosé*

Seuls ont été étudiés les pH optima 7,2 et 8,8 :

I : transamination chez l'insecte sain.

IIa : transamination chez l'insecte atteint de la virose à noyaux denses (VND) et ne présentant que de légers troubles de motricité.

IIb : transamination chez l'insecte atteint de la virose à noyaux denses (VND) et présentant une paralysie totale à l'exception des mandibules

C — *Influence de la sonication des extraits enzymatiques*

Les expériences de révélation d'enzymes cryptiques et en particulier des transaminases réalisées par LAWRENCE et MELNICK (1961) sur les β -lipoprotéines du sérum humain nous ont suggéré de soumettre nos extraits enzymatiques aux ultrasons.

Les premiers résultats obtenus dans des conditions identiques à celles utilisées par les auteurs précités n'ont mis en évidence qu'une dénaturation notable de l'enzyme.

Des expériences complémentaires sont nécessaires à l'analyse de ce facteur.

IV. — DISCUSSION

Il semble que les extraits de larve de *Galleria* étudiés contiennent deux GOT distinctes dont l'une est fonctionnelle au pH physiologique (6,3), l'autre ne pouvant avoir qu'une action très discrète à ce même pH.

D'autre part, de l'examen de la cinétique de la réaction, il ressort que lorsque le pH est faible et proche du pH physiologique, la vitesse initiale est importante. Au contraire, elle est pratiquement nulle lorsque le pH est élevé.

Cette observation suggère que l'enzyme dont le pH optimum se situe à 8,5-9,0 n'existe pas à l'état actif dans les extraits réalisés. Mais cette transaminase serait activée par une incubation d'environ 45 minutes à 37°C.

Nous pouvons également noter que lorsque le pH est élevé, la quantité d'acide glutamique découverte dans le milieu après incubation est plus importante que pour les pH plus bas. Cette remarque s'explique si l'on admet que la poudre acétonique contient de nombreuses enzymes dont certaines peuvent être capables de cataboliser en partie l'acide glutamique formé, et cela d'autant mieux que le pH du milieu est voisin de leur pH optimum.

Au cours du développement de la VND chez l'insecte, on note une sorte de suppléance de la transaminase à pH optimal élevé qui pallie à la défaillance progressive de l'enzyme native. Des tests de ce type permettraient sans doute de compléter utilement nos connaissances de la pathogenèse virale en ce qui concerne les perturbations provoquées au niveau du métabolisme protéique de l'hôte.

Reçu pour publication en octobre 1965.

SUMMARY

TRANSAMINATION IN « GALLERIA MELLONELLA ». INFLUENCE OF A VIRAL INFECTION (VIRUS DISEASE WITH DENSE NUCLEI) ON TRANSAMINASE ACTIVITY

In this work glutamic oxaloacetic acid transaminase activity of an acetone powder of *Galleria mellonella* was studied. The transamination products were estimated by thin-layer chromatography on cellulose. Quantitative measurements were made from the colour developed in the eluates of the chromatogram after reaction with ninhydrin. The effect of pH (fig. 1) demonstrated that there

were two different enzymes for which optimum pH was 7.2 to 7.3 and 8.5 to 9.0, respectively. The latter enzyme did not seem to be physiologically active. It only appeared in the medium after incubation for one hour at 37°C (fig. 2).

During the development of virus disease with dense nuclei (VND) transaminase activity at pH 7.2 diminished progressively, and the activity which had been best at pH 8.8 increased during the same time (fig. 3).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMARGIER A., VAGO C., MEYNADIER G., 1965. Étude histopathologique d'un nouveau type de virose mise en évidence chez le Lépidoptère *Galleria mellonella*. *Arch. gesamte Virusforsch.*, **5**, p. 659-667.
- BELZECKA K., RACZYNSKA-BOJANOWSKA K., HELLER J., 1959. Studies on transamination in insects : II : Aspartate α -ketoglutarate transaminase in *Celerio euphorbiae*. *Acta Biochim. Polon.*, **6**, 195-203.
- BHEEMESWAR B., SREENIVASAYA M., 1952. Occurrence of transaminase in the silkworm *B. mori*. *Current Science*, **21**, 253-255.
- DRILHON A., VAGO C., 1953. Modifications dans la figure chromatographique des acides aminés libres et des substances fluorescentes de l'hémolymphe de *B. mori*, consécutives à une paralysie d'origine microbienne. *Experientia*, **9**, 143-145.
- FUKUDA T., 1956. Biochemical studies on the formation of the silkprotein. III. Conversion of C¹⁴ labelled phenyl-alanine to tyrosine. *J. Bioch. (Tokyo)*, **43**, 137-142.
- FUKUDA T., 1957. Biochemical studies on the formation of the silkprotein. IV. Conversion of pyruvic acid to alanine in the silkworm larva. *J. Bioch. (Tokyo)*, **44**, 505-510.
- KILBY B. A., NEVILLE E., 1956. Amino acid metabolism in locust tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 389-390.
- LAWRENCE SH., MELNICK P. J., 1961. Enzymatic activity related to human serum β -lipoprotein. *Proc. Soc. exper. Biol. med.*, **107**, 998-1001.
- MEYNADIER G., VAGO C., PLANTEVIN G., ATGER P., 1964. Virose d'un type inhabituel chez le Lépidoptère *Galleria mellonella*. *Rev. Zool. agric. appl.*, **63**, 207-208.
- MORTON R. K., 1955, in COLOWICK S. P., KAPLAN N. O., vol. **1**, 25-51. Acad. Press., N. Y.
- RACZYNSKA-BOJANOWSKA K., BELZECKA K., 1962. Transamination in Insects. III. The effect of metal ions on aspartate α -ketoglutarate aminotransferase in *Celerio euphorbiae*. *Acta biochim. polon.*, **9**, 111-115.
- SHYAMALA M. B., BHAT S. V., 1955. Effect of chloromycetin supplementation on the transaminase activity of the silkworm *Bombyx mori*. *J. sci. Industr. Res. (New Delhi)*, **14 C**, 97-99.
- VAGO C., MEYNADIER G., DUTHOIT J. L., 1964. Étude d'un nouveau type de maladie à virus chez les Lépidoptères. *Ann. Éphytites*, **15**, 475-479.
- VAGO C., LUCIANI J., 1965. Développement du virus de la maladie des noyaux denses de *Galleria mellonella* en culture de tissus de Lépidoptères. *Experientia*, **21**, 393.