

Vitamine A et infection pasteurellique expérimentale du porc

Fluctuations de l'activité cholinestérasique érythrocytaire et plasmatique

par Y. RUCKEBUSCH, L. JOUBERT, M. JEAN-BLAIN et J. OUDAR

On sait la grande importance biologique des diastases hydrolysant les substances qui jouent le rôle de « médiateurs » entre le système nerveux et les effecteurs (muscles et viscères).

Parmi ces diastases, les cholinestérases ont été fort bien étudiées, en raison du rôle essentiel des mécanismes cholinergiques dans le maintien de l'équilibre vago-sympathique et de la fréquence de ses altérations au cours de troubles organo-végétatifs.

Des recherches, déjà anciennes, ont établi l'existence de deux types de cholinestérases :

— l'un, présent dans le sérum et divers organes, capable d'hydrolyser tous les esters de la choline (benzoyl- et butyrylcholine, aussi bien que l'acétylcholine), appelé *cholinestérase* « S » par ZELLER et BISSEGER (1) ou *pseudo-cholinestérase* par MENDEL, MUNDELL et RUDNEY (2) ;

— l'autre, présent dans les tissus nerveux et dans les hématies, hydrolysant les seuls esters acétiques de la choline, appelé *cholinestérase* « E » par ZELLER ou *cholinestérase Vraie* par MENDEL et ses Collaborateurs.

Le rôle physiologique des deux types de cholinestérases est loin d'être précis, surtout pour le dernier.

Il a été montré que l'activité estérasique du tissu nerveux ou des hématies (cholinestérase « E ») est toujours fortement abaissée lors d'hypertonie vagale. En particulier, le pouvoir cholinestérasique érythrocytaire est pratiquement nul au cours des syndromes d'hyperactivité cholinergique, dont la sialorrhée, l'hypermotricité gastro-intestinale, la difficulté respiratoire, les fasciculations musculaires sont les manifestations extrêmes.

C'est là, d'ailleurs, le mode d'action de certaines substances parasymphatomimétiques, du type de l'ésérine, ainsi que celui des insecticides organo-phosphorés.

Le rôle de la cholinestérase sérique est beaucoup plus obscur. L'étude de sa répartition, comme celle de ses variations pathologiques, incite à penser qu'elle n'a aucun rôle fondamental dans le système cholinergique (3).

Absente chez certaines espèces, par exemple les Bovidés, elle est abaissée dans de nombreux cas pathologiques, tels que l'insuffisance hépatique (4), sans qu'il soit possible d'établir un parallélisme quelconque entre sa chute et l'intensité des troubles organo-végétatifs observés. De plus, il semble n'exister aucun rapport entre la teneur de l'organisme en cholinestérase vraie et en pseudo-cholinestérase.

La relation des manifestations morbides extrêmes de type cholinergique avec la seule chute de l'activité cholinestérasique érythrocytaire, les fluctuations de la pseudo-cholinestérase au cours de la plupart des syndromes pathologiques (l'activité cholinestérasique érythrocytaire restant alors normale) sont déconcertantes et laissent place aux hypothèses les plus contradictoires.

* * *

Désireux de connaître les fluctuations à long terme de l'activité cholinestérasique vraie et pseudo-cholinestérasique de mêmes sujets, au cours de carences vitaminiques et d'agressions diverses (infection microbienne en particulier), nous avons choisi un lot de 12 Porcelets, comprenant 3 sujets témoins et 9 sujets carencés en Vitamine A, soumis à une infection expérimentale répétée, à *Pasteurella Septica* par voie aérienne, dans les conditions décrites ailleurs (5).

Le but recherché était de connaître quelle était la fraction estérasique du sang modifiée de façon significative au cours de l'infection chez des sujets prédisposés ; aussi a-t-on mesuré, sur les 432 prélèvements de sang effectués régulièrement durant les 4 mois d'observation :

a) le pouvoir cholinestérasique vrai des globules rouges (hydrolyse de l'iodure d'acétylcholine) ;

b) le pouvoir pseudo-cholinestérasique des globules rouges (hydrolyse d'un ester non acétique de la choline : iodure de butyrylcholine) ;

c) le pouvoir cholinestérasique vrai du plasma (hydrolyse de l'iodure d'acétylcholine) ;

d) le pouvoir pseudocholinestérasique du plasma (hydrolyse de l'iodure de butyrylcholine).

MÉTHODE UTILISÉE

La libération d'acide acétique ou butyrique peut être, dans certaines conditions précises, appréciée par les variations de pH provoquées dans un laps de temps défini.

La méthode d'évaluation retenue fut celle de MICHEL (6), adaptée par HANSSON (7) et modifiée par nous (8) ;

a) Séparation des fractions plasmatique et globulaire :

— *Plasma* : séparé du culot de centrifugation et dilué à raison de 1 vol. à 3 avec de l'eau distillée.

— *Hématies* : le culot globulaire est remis en suspension par addition de trois fois son volume environ de sérum physiologique, à la seule fin de réaliser « le lavage » des hématies et d'éliminer le plasma restant après une nouvelle centrifugation (vingt minutes à 4.000 t/m). Les hématies sont alors mises en solution à raison de 1 vol. à 3 avec une solution de saponine (0,1 pour 100).

b) Hydrolyse enzymatique :

Dans un pèse-filtre, on introduit successivement : 3 ml de solution-tampon, 2,4 ml d'eau distillée, 0,6 ml de solution enzymatique (plasma en globules). Mise en place dans un bain-marie à 25° C, pendant 10 minutes pour égalisation de la température.

— Addition du substrat : 0,6 ml d'une solution préparée extemporanément et neutralisée (concentration M/10) : lecture du pH initial ;

— Lecture du pH final au bout de 15 minutes pour les globules rouges et de 30 minutes pour le plasma.

c) Précautions :

Le dosage ne doit être retenu que si les quatre précautions suivantes ont été respectées :

— 1° *Incubation* à 25° C, en raison de la variation de pH lue pour des écarts de température de + 1° C ;

— 2° *pH d'incubation voisin de pH* : 8,0, car l'activité enzymatique est affaiblie, voire nulle, à pH = 6,5 : or, l'hydrolyse peut entraîner une variation de pH de 1,5 ;

* 4,12 g de diéthylmalonylurée sodée, 0,54 g de PO₄H₂K, 44,70 g de KCl, et 28 ml HCl à 0,1 N. Compléter à 3.000 ml.

Solution à conserver à la glacière, après addition de quelques gouttes de toluène, pH : 8,1 à 25° C.

— 3° *Volume final constant de 6,6 ml* : pour l'étude de l'inhibition, *in vitro*, la quantité d'eau distillée ajoutée est diminuée du volume de la substance additionnée ;

— 4° *Temps d'incubation constant* : la courbe de l'activité enzymatique des hématies montre que la durée optimum d'incubation est de quinze à vingt minutes environ ; celle du plasma doit, en revanche, être prolongée à trente minutes ; au delà, des erreurs sont introduites par suite de l'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine.

L'évaluation du pouvoir cholinestérasique est ensuite établie de la manière suivante : la différence existant entre le pH initial et le pH final traduit la libération progressive d'acide acétique ou d'acide butyrique, à partir de l'acétylcholine ou de la butyrylcholine.

Pour être à l'abri d'éventuelles perturbations du milieu sanguin, les pH correspondant à l'addition progressive d'acide acétique N/100 au plasma et aux hématies, sont mesurés en milieu tamponné et en l'absence d'acétylcholine. Cette technique permet le tracé d'une courbe correspondant au pouvoir tampon du sang. La valeur du pH trouvée dans l'essai, rapportée sur cette courbe, donne directement en abscisse, la concentration du milieu en ml d'acide acétique N/100.

RÉSULTATS

I. — *Valeur moyenne de l'activité cholinestérasique* :

— L'activité cholinestérasique érythrocytaire vraie (substrat = acétylcholine) est de l'ordre de 4, à 5 μ mol/ml/heure.

— L'activité pseudo-cholinestérasique érythrocytaire (substrat = butyrylcholine) au contraire, est très faible : elle n'excède guère 0,5 à 0,8 μ mol/ml/heure.

— Le plasma présente une activité cholinestérasique vraie (substrat = acétylcholine) de l'ordre de 1 μ mol/ml/heure. Cette valeur est très voisine de celle de l'activité pseudo-cholinestérasique (substrat = butyrylcholine).

II. — *Influence de la carence vitaminique.*

L'examen du diagramme n° 1 montre que l'activité cholinestérasique érythrocytaire vraie des sujets carencés (n° 1 à 9) ne diffère pas de façon nette de celle des sujets témoins (n° 10, 11 et 12).

L'analyse statistique (Système T de SCHELLING) indique cependant un écart de 10 % (9).

En ce qui concerne l'activité cholinestérasique du plasma, il n'existe pas de différence significative.

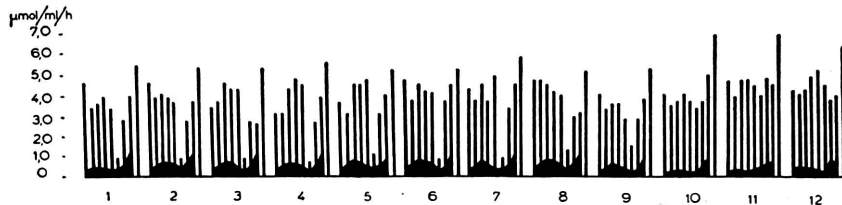


DIAGRAMME 1. — Evolution de l'activité cholinestérasique érythrocytaire vraie des sujets carencés (n° 1 à 9) et des témoins (n° 10 à 12). Noter son renforcement au cours du dernier contrôle, après suralimentation des douze sujets. Le trait plein correspond à l'activité pseudo-cholinestérasique.

III. — Influence de l'agression microbienne :

Inopérante sur l'activité cholinestérasique érythrocytaire chez les sujets témoins, l'agression microbienne a été suivie d'une chute spectaculaire (80 % environ) de cette activité cholinestérasique érythrocytaire vraie chez les sujets carencés (Diagramme, n° 2).

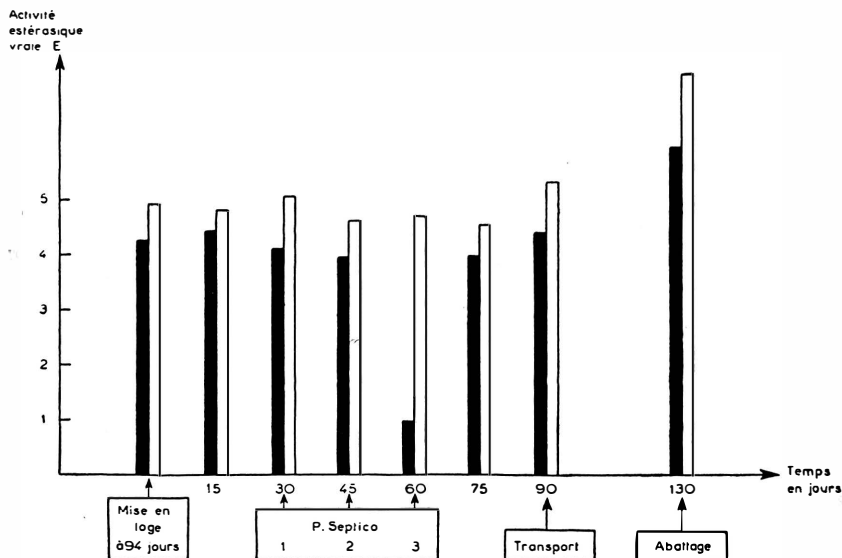


DIAGRAMME 2. — Effondrement de l'activité cholinestérasique érythrocytaire des sujets carencés (en noir) au soixantième jour. L'activité cholinestérasique des témoins (en clair), légèrement supérieure, n'est pas modifiée au cours de cette agression microbienne.

En revanche, l'activité cholinestérasique plasmatique est légèrement diminuée, aussi bien chez les sujets témoins que chez les sujets carencés.

En tout état de cause, la prise de l'infection chez les sujets carencés en vitamine A contrôlée par les résultats cliniques (toux) et vérifiée par les données anatomo-cliniques (lésions macroscopiques et microscopiques), a coïncidé avec une fluctuation biochimique importante : la diminution du pouvoir estérasique des globules rouges vis-à-vis de l'acétylcholine.

IV. — *Influence de facteurs divers.*

Au cours d'un transport dans de mauvaises conditions, l'activité estérasique du sang n'a pas été modifiée.

Par ailleurs, au cours de la période de suralimentation et de régime hypervitaminé ayant précédé l'abattage des animaux, le pouvoir estérasique érythrocytaire s'est relevé de 15 %.

DISCUSSION

Le fait que l'activité cholinestérasique érythrocytaire vraie s'abaisse légèrement au cours de la carence vitaminique, se relève au moment de la suralimentation, s'effondre chez les seuls sujets carencés lors d'une infection expérimentale, établit entre la déficience organique et ce test biologique une relation curieuse, mais incontestable.

Elle laisse supposer que les mécanismes cholinergiques sont déjà partiellement modifiés par la carence en vitamine A, et profondément perturbés dans le cas d'une infection expérimentale.

La dépression brutale du système acétylcholine-cholinestérase, constatée dans ce travail, rentre dans le cadre général, semble-t-il, des modifications neuro-hormonales et hydro-ioniques de cette espèce, déjà prouvées par les variations de la kaliémie, par l'hyperthermie, l'acidité, l'exsudation et la dépigmentation de certaines viandes, par les fluctuations du taux de l'adrénaline et de la nor-adrénaline dans le sang.

Elle signe, en quelque sorte, la réceptivité d'un sujet à une infection expérimentale conditionnée par la seule carence alimentaire. Elle pose le problème d'une relation éventuelle, plus directe, entre la vitamine A et l'activité cholinestérasique érythrocytaire.

CONCLUSIONS

L'activité cholinestérasique du plasma, non modifiée de façon significative par la carence vitaminique A, est abaissée, passagèrement, au cours d'une infection expérimentale à *Pasteurella septica*, chez le Porc, qu'il soit carencé ou non.

L'activité cholinestérasique érythrocytaire, par contre, diminuée de 10 % au cours d'une carence vitaminique prolongée, (relevée de 10-15 %, après un régime hypervitaminé), s'effondre brutalement à un niveau inférieur de 80 % par rapport au taux initial, au cours de l'infection expérimentale à *Pasteurella septica*.

Cette chute, qui ne s'observe que chez les seuls sujets carencés, apparaît en l'occurrence comme une modification biochimique importante d'une carence alimentaire conditionnant la « prise de l'infection ».

(Travail des Laboratoires de Physiologie,
de Bactériologie et de Zootechnie de l'Ecole
Nationale Vétérinaire de Lyon)

BIBLIOGRAPHIE

1. ZELLER, E. und BISSEGER, A. — Helv. Chim. Acta, 1943, 26, 1619.
2. MENDEL, B., MUNDELL, D. and RUDNEY. — Biochem. J., 1943, 37, 473.
3. VINCENT, D. — XV^e Réunion Assoc. Physiol., Toulouse. J. de Physiol., 1947, p. 211.
4. DARRASPEN, E., FLORIO, R. et MAZIÈRE, Ch. — C. R. Soc. Biol., 1952, 146, 1725.
5. JEAN-BLAIN, M., JOUBERT, L., RUCKEBUSCH, Y. et OUDAR, J. — Bull. Acad. Vét. France, 1960.
6. MICHEL, H. O. — in HAWK et al., Practical Physiological Chemistry, 1954, p. 638.
7. HANSSON, C. H. — Acta Pharmacol. Toxicol., 1957, 14, 6-12.
8. RUCKEBUSCH, Y. et RUCKEBUSCH, M. — Rev. Méd. Vét., Toulouse, 1959, 110, 627-638.
9. RUCKEBUSCH, Y., RUCKEBUSCH, M. et JOUBERT, L. — Arch. Intern. Pharmacodyn., 1960, 124, 495-504.