

L'ANHYDRASE CARBONIQUE CHEZ *SPHAEROMA SERRATUM* (F.) (CRUSTACÉ ISOPODE).

par

Louise Dresco-Derouet

Laboratoire de Zoologie, Faculté des Sciences, Paris.

Résumé

L'anhydrase carbonique existe dans les divers tissus de *Sphaeroma serratum*. Malgré sa richesse dans les pléopodes, elle n'intervient pas de manière significative dans la respiration. L'enzyme joue par contre un rôle important dans la régulation osmotique ; son inhibition provoque une diminution des ions Na et K qui entraîne un déséquilibre entre le milieu intérieur de l'animal et le milieu environnant.

INTRODUCTION

L'anhydrase carbonique, qui a été isolée du sang de Bœuf (Meldrum et Roughton, 1934), est l'enzyme qui catalyse la réaction réversible :



et influe sans doute aussi sur la dissociation en ions qui suit immédiatement. Chez les Mammifères, on la trouve à concentration élevée dans les hématies, elle joue un rôle important dans la respiration tissulaire, le transport du gaz carbonique par le sang et l'équilibre acido-basique sanguin. Dans le cortex rénal, il semble qu'elle provoque une réabsorption d'ions Na^+ , d'eau, de gaz carbonique d'où résulterait une acidification des urines. Dans l'estomac et le pancréas, l'anhydrase interviendrait, semble-t-il, dans la détermination du volume et de l'acidité des sucs digestifs sécrétés. Dans le cerveau et la moelle épinière, enfin, et à moindre concentration, elle semble avoir une action encore mal connue (Vivien, 1955).

Chez divers Poissons Téléostéens (Maetz, 1956), l'activité de l'anhydrase carbonique paraît favorable au maintien de la concentration ionique du milieu intérieur. On l'a trouvée, également et sans que son rôle ait toujours été élucidé, dans le sang et les divers tissus de nombreux Invertébrés : Myriapodes, Insectes, Crustacés, Vers, Coelenterés (Sobotka, Kann, 1941 ; Ferguson, Lewis et Smith, 1937 ; van Goor, 1948).

Nous avons recherché l'anhydrase carbonique chez un Crustacé Isopode, *Sphaeroma serratum* (F.), ainsi que son rôle dans la respiration et la régulation osmotique.

RÉPARTITION DE L'ANHYDRASE CARBONIQUE

L'espèce étudiée provient de deux stations assez voisines, situées sur les côtes de Bretagne : Roscoff (Nord-Finistère) et Louannec (Côtes-du-Nord). Les animaux sont maintenus à la température de 10 à 12° C dans des cristallisoirs renfermant des gravillons, quelques cailloux ainsi que des *Fucus* dans lesquels ils trouvent leur nourriture.

L'hémolymphé est recueillie dans la cavité générale du Sphérome, au niveau des pléopodes à l'aide d'une aiguille creuse de verre, sans anesthésie préalable. On en prélève 2,5 à 3 mm³ qu'on dilue dans 0,1 cm³ d'eau distillée. Les pléopodes sont isolés à la pince, dilacérés dans 0,1 cm³ d'eau distillée et placés au réfrigérateur. Le reste des tissus est broyé dans 15 à 20 fois son poids d'eau distillée et conservé également au réfrigérateur. Au moment de l'utilisation des broyats on centrifuge quelques minutes à grande vitesse et on prélève 0,1 cm³ du liquide qui surnage pour le dosage de l'enzyme.

L'anhydrase carbonique est dosée par une méthode manométrique, décrite par ailleurs (Dresco-Derouet, 1961) ; des mesures ont également été faites à l'aide de l'appareil de Warburg, pour comparaison. Les solutions utilisées sont celles du substrat B employé par Maetz (1956). Les quantités d'enzyme sont exprimées en unités Mitchel (Mitchel, Pozzani et Fessenden, 1945).

Résultats

L'anhydrase carbonique a été trouvée dans le milieu intérieur, les divers tissus et les pléopodes du Sphérome. Ce sont les tissus qui présentent la teneur la plus homogène en anhydrase, tandis que les pléopodes qui sont les plus riches, en présentent des quantités très variables. L'hémolymphé a présenté la particularité de nous donner, à plusieurs reprises, des séries de résultats nuls : il semble que l'anhydrase puisse y disparaître pour des raisons encore indéterminées.

Sur le graphique I, représentant un dosage d'enzyme pour les différents tissus, nous avons indiqué, à titre de comparaison, une série de mesures effectuée avec du sang humain.

TABLEAU I

Quantités d'anhydrase carbonique exprimées en unités Mitchel
par g (pour les tissus) ou par cm³ (pour l'hémolymphé)
Valeurs moyennes.

	Hémolymphé	Tissus	Pléopodes
Moyenne.....	1,90	1,37	4,84
Ecart-type	1,11	0,64	2,23
Nombre de mesures	12 *	17	17

(*) La différence du nombre de mesures entre tissus et hémolymphé provient des cinq mesures pour lesquelles les valeurs trouvées étaient nulles.

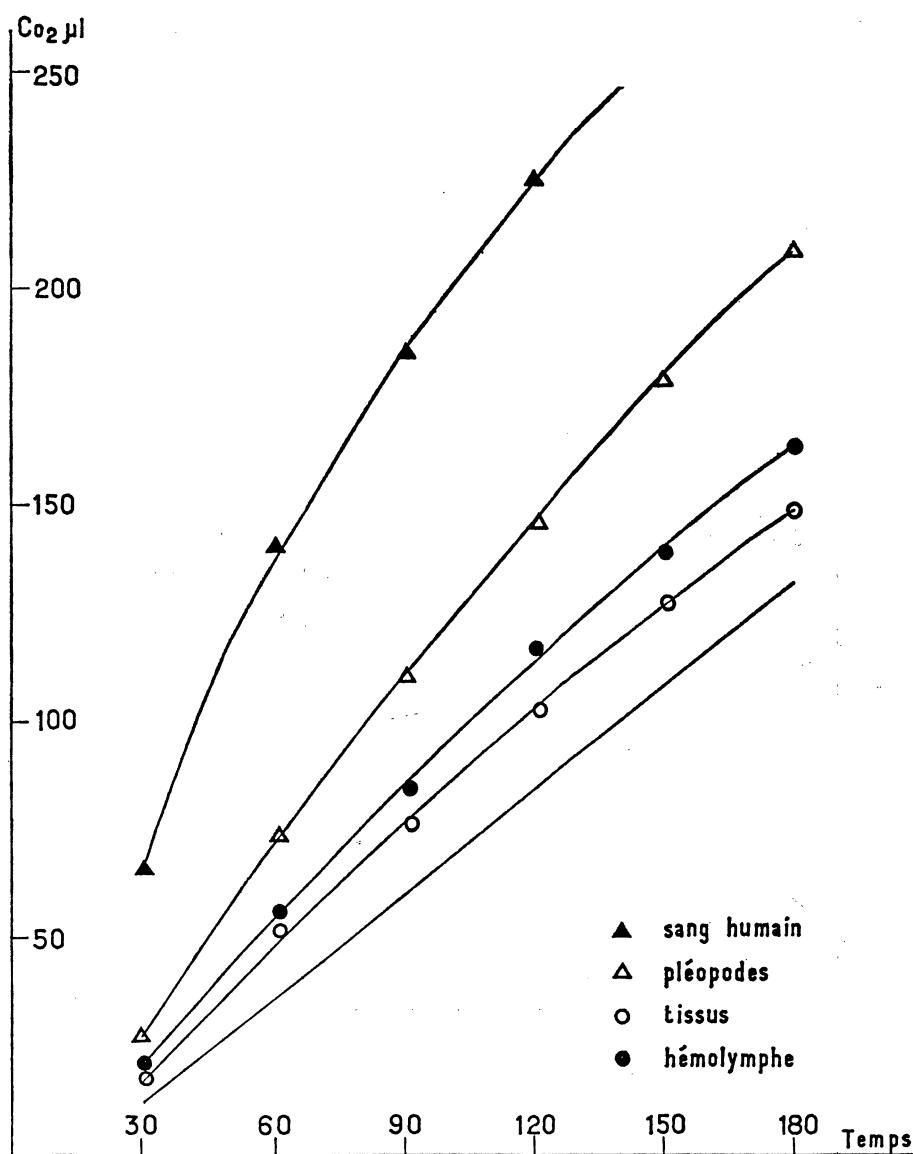


FIG. 1

Mesure de l'activité de l'anhydrase carbonique par dégagement de gaz carbonique en fonction du temps en secondes. La droite représente le contrôle : dégagement du gaz carbonique en l'absence d'enzyme.

L'ANHYDRASE CARBONIQUE ET LA RESPIRATION

L'étude du rôle d'un enzyme dans le métabolisme est facilitée par l'emploi d'inhibiteurs spécifiques. Mann et Keilin (1940) avaient découvert l'action inhibitrice des sulfamides mais ces derniers composés se sont révélés, pour la plupart, trop toxiques aux doses nécessaires pour posséder « *in vivo* » un pouvoir inhibiteur suffisant. Miller,

Dessert et Roblin (1950) découvrent un produit nouveau, l'acétazolamide (2-acétylamino-1-3-4 thiadiazole-5 sulfonamide), doué d'un grand pouvoir inhibiteur à la concentration de $10^{-8}M$ et très peu toxique.

Le produit que nous avons utilisé est le Diamox injectable dont l'action dure au moins six heures après utilisation. On injecte 1 μ l de Diamox dilué (5 γ d'acétazolamide, sous forme de sel sodique) dans la cavité générale du corps de l'animal, au niveau des pléopodes. Chez les témoins, la solution de Diamox est remplacée par la même quantité d'eau distillée.

L'intensité respiratoire est mesurée par la quantité d'oxygène consommé en mm^3 par heure et par g de poids frais. Deux méthodes sont employées.

Méthode chimique :

Les animaux en expérience, répartis en trois lots, l'un normal, le second injecté à l'eau distillée (témoin) et le dernier injecté au Diamox,

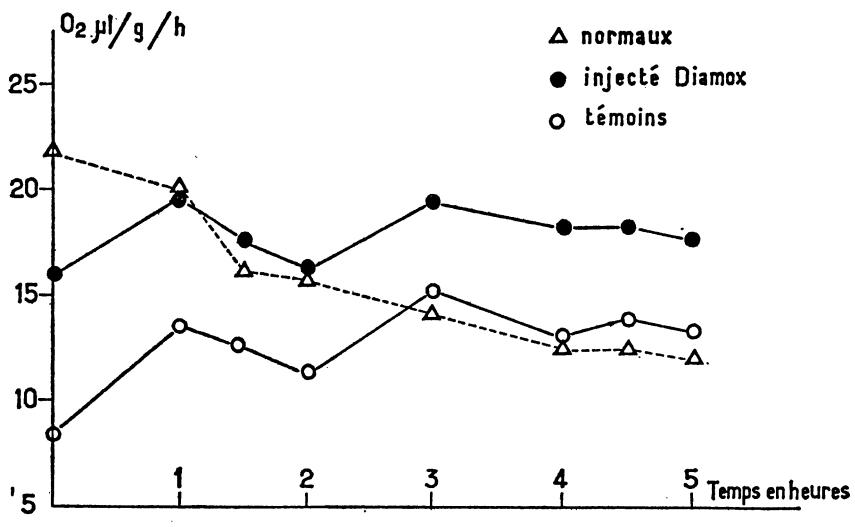


FIG. 2

Respiration suivie à l'appareil de Warburg. Chaque point représente la moyenne de trois mesures.

respirent individuellement dans des flacons pleins d'eau de mer et bouchés hermétiquement. Après des durées d'expérience respectivement, de six heures et de seize heures, un échantillon d'eau est prélevé à la seringue et analysé suivant la méthode de Fox (1938).

Méthode manométrique :

Quelques séries de mesures ont été effectuées à l'aide de l'appareil de Warburg, afin de déterminer, dans le temps, l'action du Diamox.

Pour l'étude du gaz carbonique, la rapidité de l'action du Diamox, notée à partir d'expériences faites sur des Mammifères, nous a obligée, pour obtenir des dégagements de gaz mesurables, à opérer sur six Sphéromes respirant ensemble dans un volume restreint d'eau de mer. Après 15 minutes, un échantillon est prélevé à la seringue et

introduit pour analyse dans un gazomètre de Natelson (Martinek, 1964). Le même lot d'animaux est injecté au Diamox et remplacé aussitôt dans le même récipient dont l'eau a été renouvelée. Une nouvelle analyse est faite 15 minutes après. Quelques mesures ont été effectuées après deux heures de respiration d'animaux isolés, certains étant injectés au Diamox, d'autres pas.

Résultats

Dès l'injection, l'animal se met en boule par réaction de défense, sans qu'il ait subi aucune anesthésie, puis il reprend son activité ; chez le sujet traité, il semble y avoir une « ventilation » accélérée. L'inhibition de l'anhydrase carbonique n'influe pas de manière significative sur la consommation globale d'oxygène.

TABLEAU II
Consommation d'oxygène, exprimée en $\text{mm}^3/\text{g/h}$.

	Sphérome normal	Témoin	Sphérome injecté au Diamox
Moyenne	24,21	27,35	20,46
Ecart-type	7,99	6,75	6,56
Nombre de mesures	17	15	16

La respiration suivie à l'aide de l'appareil de Warburg, montre que, pendant l'heure qui suit l'injection — eau distillée ou Diamox — il se produit un léger accroissement d'oxygène. Cette augmentation serait due à la dilution du milieu intérieur résultant de l'injection. Vers la troisième heure se produit un nouvel accroissement de l'intensité respiratoire puis un retour progressif à l'évolution normale.

Le dégagement de gaz carbonique après plusieurs heures de respiration n'est pas influencé par l'injection de Diamox.

Quinze minutes après l'injection de Diamox, on observe une légère diminution de la quantité de gaz carbonique dégagé, mais, étant donné le nombre insuffisant de mesures, cette différence ne permet pas d'affirmer l'influence du blocage de l'anhydrase carbonique. Elle peut être due au fait que les animaux avaient déjà été soumis antérieurement à l'expérience.

TABLEAU III
Dégagement de gaz carbonique mesuré en mm^3 .

	Avant injection	15 minutes après injection
Moyenne...	19,65	16,88
Ecart-type	5,35	5,75
Nombre de mesures	4	4
Comparaison entre les deux valeurs : $t = 1,22$		

L'ANHYDRASE CARBONIQUE ET LA RÉGULATION DU MILIEU INTÉRIEUR

Chez les Mammifères, on a montré que, en raison de son action indirecte sur la formation des ions H^+ et CO_3H^- , l'anhydrase carbonique joue un rôle dans le déplacement des ions Na des tampons phosphate et bicarbonate. Quand l'enzyme est inhibé, il y a perte de bicarbonate, apparition d'acidose sanguine et d'urines alcalines, avec une perturbation de l'équilibre acido-basique du sang. Il paraît donc probable que l'anhydrase carbonique peut exercer une influence sur la régulation osmotique. Les Sphéromes, dont le milieu intérieur a une composition voisine de celle de l'eau de mer, peuvent vivre plusieurs jours dans des milieux dilués jusqu'à 50 p. 100. La dilution de l'hémolymphé augmente mais se maintient à un niveau nettement supérieur à celui du milieu environnant.

Après l'injection d'eau distillée (témoin) ou de Diamox, on prélève, pour analyse, 3 mm³ d'hémolymphé que l'on dilue dans 10 cm³ d'eau bidistillée. Le dosage du sodium et du potassium est effectué au photomètre de flamme (E.E.L.). Des mesures de pH ont été faites au papier indicateur Merck.

Résultats

L'hémolymphé de *Sphaeroma serratum* est voisine de la neutralité, mais très légèrement alcaline. Son pH varie de 7 à 7,2. Dans la demi-heure qui suit l'injection de Diamox, il se produit une légère acidification du milieu intérieur ; le pH se situe alors entre 6,8 et 7, et cela pendant un temps très court.

L'injection a pour effet immédiat de provoquer une légère diminution de la teneur en sodium, due à la dilution ainsi produite ; dans les heures qui suivent on revient aux valeurs normales et même, à une faible augmentation chez les sujets traités au Diamox.

Chez les Sphéromes placés dans de l'eau de mer diluée à 50 p. 100, le taux de sodium diminue dans les premières heures qui suivent le transfert, mais la valeur définitive n'est atteinte qu'après 24 heures. Il en est de même pour les animaux témoins. Pour ces deux catégories de sujets, les différences entre les valeurs du sodium atteintes après huit heures de séjour dans l'eau de mer à 50 p. 100 et dans l'eau de mer pure, ne sont pas nettement significatives, tandis qu'elles le sont pour les sujets traités au Diamox. Après 24 heures, les quantités de sodium, atteintes dans le nouveau milieu, ne diffèrent pas pour les animaux normaux et pour les témoins, alors que ces mêmes différences sont significatives pour les animaux traités.

TABLEAU IV
Moyenne des teneurs en sodium exprimées en m équiv./l.

	Durée	animal normal	animal témoin	animal traité au Diamox
eau de mer 465,4	24 h	460,70 \pm 9,59 n = 25	464,76 \pm 10,20 n = 11	471,90 \pm 13,51 n = 13
eau de mer 50 p. 100 240,92	8 h	436,17 \pm 20,42 n = 12	384,5 \pm 21,29 n = 8	359,50 \pm 13,66 n = 16
eau de mer 50 p. 100 240,92	24 h	381,88 \pm 13,41 n = 21	375,5 \pm 18,08 n = 10	334,50 \pm 12,35 n = 24
eau de mer 50 p. 100 » » »	24 h » 8 h »	injectés et témoins : t = 1,828 significatif témoins et normaux : t = 0,27 non significatif témoins et normaux : t = 1,69 significatif 80 p. 100 injectés et témoins : t = 1,024 faiblement significatif.		
normaux eau de mer et normaux eau de mer 50 p. 100 8 h : t = 1,22 non significatif.				
normaux eau de mer et traités eau de mer 50 p. 100 8 h : t = 6,24 hautement significatif.				

Quelques mesures du taux de potassium de l'hémolymphé chez des Sphéromes normaux et des Sphéromes traités au Diamox ont montré (Tableau V) que l'inhibition de l'anhydrase carbonique entraîne une diminution importante du taux de cet ion.

TABLEAU V
Taux de potassium chez les Sphéromes normaux ou traités au Diamox.
mesuré en m équiv./l.

	Eau de mer	Sphérome normal	Sphérome traité
Taux de potassium.....	12,5	11,6	6,6

CONCLUSION

L'anhydrase carbonique, qui est répartie dans l'ensemble des tissus de *Sphaeroma serratum*, ne joue qu'un rôle faible dans la respiration, malgré le taux relativement élevé dans les pléopodes. Il semble qu'à l'échelle cellulaire le rôle de cet enzyme soit plus important, comme le décèle son influence dans la régulation osmotique. Elle s'oppose à une excrétion trop élevée des ions sodium et potassium qui entraînerait un déséquilibre de la pression osmotique du milieu.

intérieur. Il sera nécessaire de préciser la répartition de l'enzyme dans les divers tissus du Sphérome afin de mieux suivre son action au cours des phénomènes métaboliques.

Summary

Carbonic anhydrase is present in low concentration in hemolymph and tissues in *Sphaeroma serratum*. A richer supply is found in pleopods. The respiratory function of C.A. is doubtful. The function of this enzyme appears to be in the maintenance of suitable ionic balance. When a specific inhibitor of carbonic anhydrase is added to *Sphaeroma* hemolymph, the concentration of Na and K is reduced.

Zusammenfassung

Man findet in den verschiedenen Geweben von *Sphaeroma serratum* Kohlensäureanhydrase. Obwohl die Pleopoden einen hohen Gehalt dieses Enzyms aufweisen, ist es nicht in signifikanter Weise an der Atmung beteiligt. Das Enzym spielt dagegen eine wichtige Rolle in der osmotischen Regulation; seine Inhibition ruft eine Verminderung der Na- und der K-Ionen hervor, die das Gleichgewicht zwischen dem inneren Milieu des Tiers und dem Milieu, in dem es lebt, stört.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- DRESCO-DEROUET, L., 1961. — L'anhydrase carbonique chez les Arachnides. I. Méthode de mesure et résultats chez quelques Araignées lucifuges et lucicoles. *J. Ins. Physiol.*, 6, pp. 209-214.
- FERGUSON, J.K.W., LEWIS, L. and SMITH, J., 1937. — The distribution of carbonic anhydrase in certain marine invertebrates. *J. cell. comp. Physiol.*, 10, pp. 395-400.
- FOX, H. MUNRO, WINGFIELD, C.A., 1938. — A portable apparatus for the determination of oxygen dissolved in a small volume of water. *J. exp. Biol.*, XV, 3, pp. 437-445.
- van GOOR, H., 1948. — Carbonic anhydrase. Its properties, distribution and significance for carbon dioxide transport. *Enzymologia*, 13, pp. 73-164.
- LISSAC, J., 1961. — Effets de l'acétalozamide sur l'anhydrase carbonique globulaire. Etude expérimentale. *Bull. et Mém. Soc. méd. Hôp. Paris*, 77, 16-17, p. 623.
- MAETZ, J., 1956. — Le rôle biologique de l'anhydrase carbonique chez quelques Téléostéens. *Bull. biol. France-Belgique*, supp. XL.
- MANN, T. et KEILIN, D., 1940. — Sulphanilamide as a specific inhibitor of carbonic anhydrase. *Nature*, London, 146, pp. 164-165.
- MARTINEK, ROBERT, G., 1964. — Simplified ultra micro determination of carbon dioxide content using the Natelson micro-gasometer. *Clinical Chemistry*, 10, 2, pp. 153-158.
- MELDRUM, N.V. et ROUGHTON, F.J.W., 1934. — Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *J. Physiol.*, 80, pp. 113-142.
- MILLER, W.H., DESSERT, A.M. and ROBLIN, R.D.JR., 1950. — Heterocyclic sulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors. *J. Am. chem. Soc.*, 72, p. 4893.
- MITCHELL, C.A., POZZANI, V.C. and FESSENDEN, R.W., 1945. — A method for determining carbonic anhydrase activity by the use of unimolecular velocity constants. *J. biol. Chem.*, 160, pp. 283-285.
- SOBOTKA, H. et KANN, S., 1941. — Carbonic anhydrase in fishes and invertebrates. *J. cell. comp. Physiol.*, 17, pp. 341-348.
- VIVIEN, P., 1955. — L'anhydrase carbonique et ses inhibiteurs. Applications thérapeutiques. *Ann. Méd.*, 56, 1.