

DOSAGE AUTOMATIQUE ET SIMULTANÉ DE L'AMYLASE ET DES PROTÉINES DU ZOOPLANCTON (*)

PAR

J. F. SAMAIN* et J. BOUCHER*

MOTS-CLÉS : Amylase.
Protéines.
Nutrition.
Zooplancton.

KEY WORDS : Amylase.
Proteins.
Nutrition.
Zooplankton.

Résumé

~ L'étude de la nutrition, de la production et de l'écologie du zooplancton, basée sur la détermination de l'activité spécifique de l'amylase des individus, a nécessité la mise au point d'un système d'analyse simultanée et automatique de l'activité amylasique et des protéines solubles du plancton.

L'automatisation a été effectuée sur auto-analyseur, en fonction des propriétés physico-chimiques de l'amylase étudiée; elle permet de traiter 15 échantillons à l'heure avec une précision de 5 %; la sensibilité du dosage permet de mesurer directement l'activité d'une *Artemia*, de quelques Copépodes ou, après dilution, d'un Euphausiacé ou du zooplancton total.

La préparation des échantillons et des réactifs qui peuvent être conservés plusieurs mois au congélateur est décrite. La méthode permet de faire des mesures *in situ* avec des résultats obtenus en 10 minutes.

Abstract

Automatic and simultaneous measurement of zooplanktonic amylase and proteins.

A method for nutrition, production and ecological studies by calculation of amylase specific activity of zooplankton is described. The method's adjustment is based on the biochemical properties of the enzyme. The activity measurement of a single *Artemia salina*, a few Copepods, or of the whole contents of a net is possible with 5 % accuracy. Up to 15 samples can be analysed within one hour with good reproducible results. The method is well suited to *in situ* studies aboard oceanographic vessels.

I. — INTRODUCTION

Une méthode d'approche de l'étude de la production animale consiste à mesurer les taux physiologiques de nutrition, de respiration et d'excrétion à différents niveaux trophiques pour en déduire un

bilan énergétique. Dans un premier temps nous avons étudié la nutrition du zooplancton sous un double aspect, qualitatif et quantitatif. Ceci nécessite la caractérisation des régimes alimentaires des zoo-

* Contribution n° 201 du Département Scientifique du Centre Océanologique de Bretagne, B.P. 337, F 29273 Brest.
Ann. Inst. océanogr., 1974, t. 50, fasc. 2.

planctones, de leur mode d'alimentation, et la mesure de la quantité de nourriture ingérée dans les conditions du milieu.

Les méthodes directes de la physiologie et de l'écologie sont insuffisantes pour mener à bien un tel projet. En effet, les résultats obtenus par une étude de « grazing » sont difficiles à extrapoler au domaine océanique, car les animaux en élevage s'adaptent à des conditions de vie différentes de celles du milieu marin. De même, les mesures de biomasse ou de nombre d'individus sont statiques et correspondent à une intégration des processus de développement des organismes.

Les mécanismes de régulation, en particulier au niveau des synthèses enzymatiques, permettent d'évaluer les taux de nutrition dans une échelle de temps comparable à celle des variations du milieu. Nous avons étudié l'activité spécifique d'une enzyme digestive : l' α -amylase. Une analyse statistique des relations quantitatives de l'activité spécifique de cette enzyme et des paramètres mesurables de la nutrition : jeûne, régime alimentaire, quantité de nourriture disponible, a permis de vérifier sa valeur d'indice de la nutrition (BOUCHER et SAMAIN, 1973).

En ce qui concerne les organismes marins, BOND (1934) a été l'un des premiers à mettre en évidence l'équipement enzymatique digestif de Copépodes. Une mise à jour des problèmes de la digestion des Crustacés a été présentée par VAN WEEL (1970); VAN WORMHOUDT *et al.* (1972) publient une étude sur

les enzymes digestives des crevettes *Penaeus kerathurus* et *Palæmon serratus*.

Les méthodes de dosage décrites sont très souvent qualitatives et manuelles. Elles rendent difficiles les études concernant les phénomènes de régulation des sécrétions digestives et des propriétés physico-chimiques des enzymes concernées. Celles-ci nécessitent la mise au point d'un système d'analyse présentant les caractères suivants :

— rapidité et nombre élevé des mesures permettant de suivre les fluctuations des sécrétions digestives;

— sensibilité élevée du fait de la petite taille des organismes (mésozooplancton);

— possibilité d'effectuer les mesures en mer de façon fiable.

Le principe des systèmes d'analyse en continu de type auto-analyseur répond à ces critères.

Quelques méthodes automatiques de dosages d'enzymes digestives ont été développées dans le domaine clinique : SCHEIDT (1964); CHARLOT *et al.* (1966); HARMES et CAMFIELD (1966); MORITA *et al.* (1966); RAMET et SIROTTEAU (1966); BUCHTA (1967); SUDAKA (1969); TRACHMAN et CAYCLE (1970). Ces méthodes ne sont pas adaptées à notre matériel biologique. Nous avons été conduits à mettre au point le dosage simultané d'une activité digestive et de sa référence pondérale : l'activité amyliasique et les protéines solubles du zooplancton.

II. — MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Les mesures sont effectuées sur des extraits de zooplancton à partir de quelques individus triés d'une même espèce ou d'un prélèvement entier.

1. Extraction.

L'échantillon est filtré sur des membranes en fibre de verre et broyé à 4° dans un Potter, en présence de 2 à 4 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 6,8. Cette opération doit être rapide. La mesure du volume du broyat permet par la suite de mesurer l'activité totale

de l'échantillon. L'extraction peut être effectuée dans de l'eau distillée avec les mêmes résultats; elle permet la mesure de l'activité estérasiqne du même extrait par titrimétrie.

2. Conservation.

Les échantillons ainsi obtenus peuvent éventuellement être conservés congelés; pendant plus d'un mois, la congélation n'affecte pas l'activité amyliasique.

III. — DOSAGE DE L'AMYLASE

1. Principe.

Les amylases catalysent l'hydrolyse des liaisons α -(1-4)-glucosidiques de l'amidon en résidus de poids moléculaires inférieurs et en sucres réducteurs. Le dosage peut être effectué par la mesure de la disparition du pouvoir de coloration de l'amidon par l'iode ou des sucres réducteurs libérés. La première méthode est mieux adaptée aux propriétés physico-chimiques de l'amylase (SAMAIN, 1974) et à l'automatisation du dosage.

2. Conditions physico-chimiques.

2.1. Le pH, la température d'incubation, les effecteurs de la réaction enzymatique correspondent aux conditions optimales de l'activité amylasique. Les ions Cl^- sont nécessaires à l'obtention de cinétiques normales.

2.2. De fortes concentrations en substrat provoquent des dépôts d'amidon dans le système d'analyse. Un compromis est adopté entre la saturation de l'enzyme et le seuil de concentration utilisable. Les meilleurs résultats ont été obtenus à une concentration de 1 mg/ml correspondant à une vitesse d'hydrolyse de l'ordre de $1/2 V_{\text{max}}$. La perte de sensibilité est compensée par une amplification du signal au niveau du colorimètre.

2.3. Le temps d'incubation de 5 minutes permet d'obtenir une sensibilité suffisante pour les études actuelles. L'enzyme n'étant pas saturée complètement, la linéarité des cinétiques n'est maintenue pour ce temps d'incubation que pour les faibles concentrations en enzyme (fig. 1).

2.4. Le dosage de l'amidon par l'iode demande une forte dilution du substrat restant pour conserver une gamme de coloration compatible avec le colorimètre. Cette dilution, effectuée à la sortie du bain-marie, sert en même temps d'arrêt de la cinétique enzymatique; il est complété au niveau de l'addition d'iode.

2.5. Unités enzymatiques : de nombreuses unités existent pour le dosage de l'amylase. Elles sont liées au principe du dosage de l'amidon par l'iode (WOHL-

GEMUTH, 1908), ou des sucres réducteurs (SOMOGYI, 1938). Ces conventions arbitraires sont conservées dans le milieu médical uniquement à des fins comparatives. Il est impossible de définir une unité internationale stricte pour cette enzyme, puisque son activité varie suivant les produits de réaction considérés (dextrines ou sucres réducteurs). Pour un dosage à l'iode, l'unité enzymatique est la quantité d'enzyme

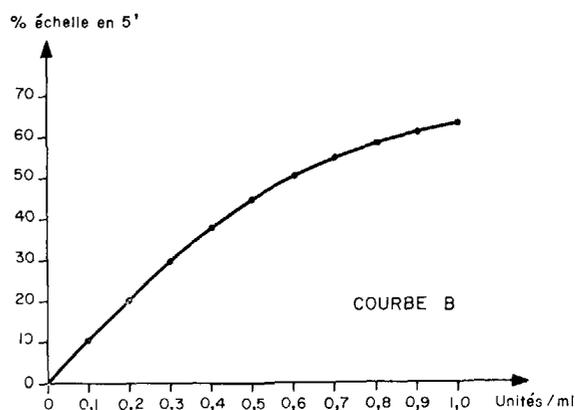


FIG. 1. — Courbe étalon du dosage de l'activité amylasique : quantité d'amidon hydrolysée en fonction de la quantité d'amylase.

FIG. 1. — Calibration curve for amylase activity assay : hydrolysed quantity of starch in terms of amylase concentration.

nécessaire pour « dextriniser » 1 mg d'amidon par minute dans les conditions du dosage. C'est l'unité admise pour le dosage de l'amylase bactérienne (BAU Unit) (FUWA, 1954).

2.6. La standardisation enzymatique est nécessaire pour l'obtention de mesures comparatives et le contrôle de l'évolution des réactifs. Elle est faite à partir d'une solution étalon de diastase Merck.

3. Particularités du diagramme d'analyse.

Les mesures sont effectuées à 660 nm. L'amplification du signal est de 1,4 (réglage 0,4 sur le colorimètre Technicon). Le schéma complet de montage des deux dosages est présenté découpé pour plus de clarté (fig. 2).

IV. — DOSAGE DES PROTÉINES

1. Principe.

Le dosage des protéines solubles est effectué selon la méthode de LOWRY (1951) adaptée aux conditions de mesure. Les groupements des résidus tyrosines des protéines sont dévoilés en milieu alcalin. En présence d'ions cuivriques, ils sont colorés en bleu par la réaction de Folin et Ciocalteus.

2. Conditions physico-chimiques.

2.1. La réaction de Folin sur le complexe protéo-cuivrique est très sensible au pH. Nous avons concentré le tampon bicarbonate du réactif de Lowry

afin de rendre insignifiantes les variations de pH possibles si les échantillons sont dilués dans l'eau.

2.2. Le dosage est effectué dans une gamme de concentrations de 0,1 à 1 mg/ml de protéines, compatible avec le dosage enzymatique. A cette fin, une gamme étalon de sérum-albumine bovine est diluée dans le tampon phosphate 0,1 M et pH 6,8, ou dans l'eau suivant la technique d'extraction utilisée.

3. Particularités du diagramme d'analyse.

Les mesures sont effectuées à 660 nm dans le second colorimètre (cellule de 15 mm de chemin optique) sans amplification (fig. 3).

V. — TECHNOLOGIE

1. AMYLASE

1.1. Solutions stock.

Stock amidon. — Amidon : 4 mg/ml dans un tampon phosphate KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , 0,4 M pH 6,6 et NaCl 0,4 M.

Préparation : verser l'amidon (amidon soluble Merck) dans le tampon porté à ébullition, laisser bouillir jusqu'à clarification de la solution, laisser refroidir, réajuster le volume.

Stockage : répartir la solution en quantités connues dans des flacons de plastique et congeler.

Stock iode 0,1 N. — IK 0,18 M + I_2 0,05 M.

Stockage : à 4° ou congelé et à l'abri de la lumière.

1.2. Solutions de travail.

Amidon. — Solution stock diluée 4 fois avec de l'eau distillée, le pH final est de 6,8.

Remarque : l'amidon en solution est remis en suspension par la congélation. Après décongélation, il

est nécessaire de reporter la solution à ébullition et d'en réajuster le volume avec de l'eau, de façon à la diluer 4 fois. Conservation 24 heures à 4°.

Iode. — Solution stock diluée au 1/20 ($0,5 \cdot 10^{-2}$ N).

Conservation : en bouteille inactinique plusieurs semaines.

2. PROTÉINES

2.1. Solutions stock.

Tampon bicarbonate pH 13,1; Na_2CO_3 0,9 M + NaOH 0,45 N.

CuSO_4 $4 \cdot 10^{-2}$ M.

Tartrate Na-K 7,1 10^{-2} M.

Réactif de Folin et Ciocalteus du phénol (Merck).

2.2. Solutions de travail.

Réactif de Lowry : à 100 ml de tampon bicarbonate, ajouter 5 ml de la solution CuSO_4 et 5 ml de solution de tartrate Na-K.

Réactif de Folin : diluer au 1/3 avec de l'eau distillée.

DOSAGE DE L'AMYLASE ET DES PROTÉINES DU ZOOPLANCTON

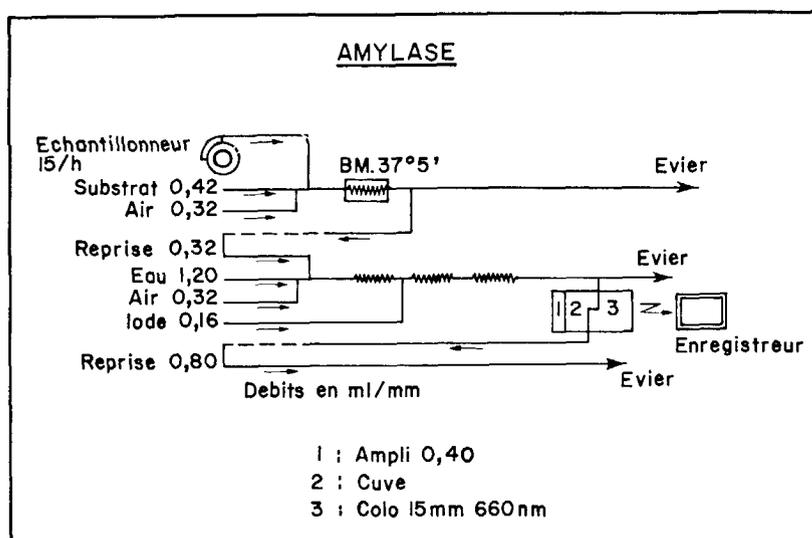


FIG. 2. — Diagramme du montage de l'auto-analyseur pour le dosage de l'amylase.

FIG. 2. — Autoanalyzer manifold flow diagram for amylase assay.

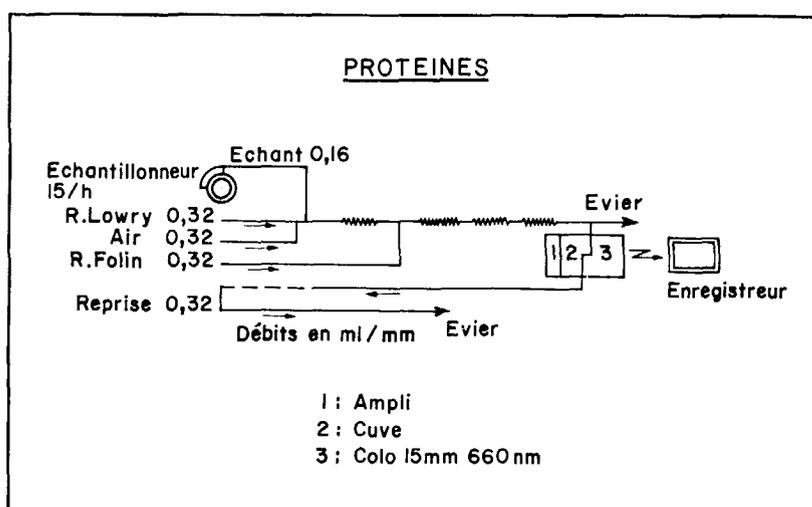


FIG. 3. — Diagramme de montage de l'auto-analyseur pour le dosage des protéines.

FIG. 3. — Autoanalyzer manifold flow diagram for proteins assay.

3. GAMMES ÉTALONS

3.1. Amylase.

3.1.1. *Étalonnage du colorimètre.* — Passer une gamme de 0,1 à 1 mg/ml de substrat en tampon phosphate 0,1 M NaCl, 0,1 M pH 6,8, tracer la courbe $DO = f$ (concentration en substrat) (fig. 4, courbe A).

3.1.2. *Étalonnages enzymatiques.* — Passer une gamme de dix concentrations linéairement croissantes d'extrait planctonique concentré, de façon à couvrir toute l'échelle de l'enregistreur. Le début de la courbe $DO = f$ (enzyme) est une droite (fig. 1, courbe B); on calcule à partir de cette portion de droite l'activité de l'enzyme en unités.

EXEMPLE. — Si les points de dilution 0,1, 0,2, 0,3 sont alignés, on peut faire correspondre à la dilution

0,1 une différence de densité optique ΔDO_1 . Ce ΔDO_1 correspond, d'après la courbe A ($DO = f$ [substrat]), à une variation de concentration du substrat ΔC_1 . Le calcul de la concentration enzymatique de la dilution 0,1 tient compte du rapport des débits entre l'échantillon et le substrat et du temps d'hydrolyse.

$$\begin{aligned} [\text{dilution } 0,1] &= \Delta C_1 \times \frac{0,42}{0,16} \times \frac{1}{5} \\ &= N \text{ unités/ml d'extrait.} \end{aligned}$$

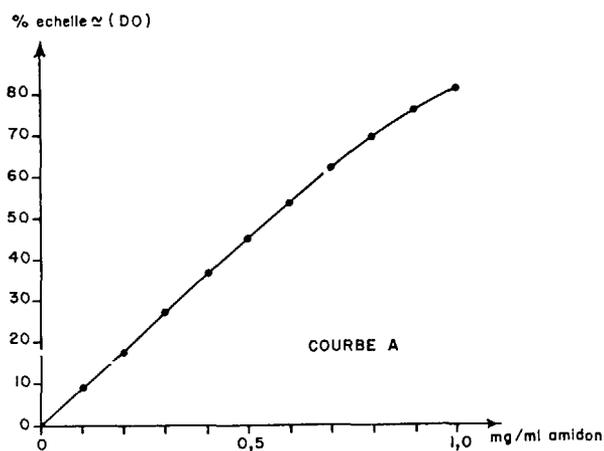


FIG. 4. — Courbe étalon du dosage de l'amidon par l'iode.

FIG. 4. — Calibration curve for starch titration by iodine.

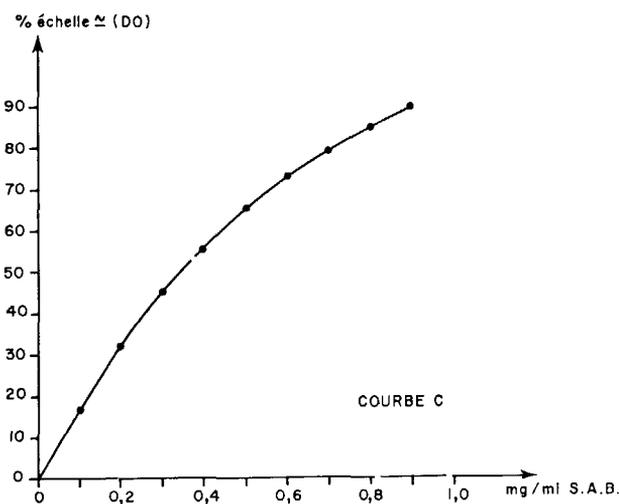


FIG. 5. — Courbe étalon du dosage des protéines : coloration de la sérum-albumine bovine selon la méthode de Folin-Ciocalteus.

FIG. 5. — Calibration curve of proteins assay : bovine serum-albumine coloration according to the Folin-Ciocalteus method.

Les points de dilution suivants sont des multiples entiers de ces N unités par millilitre.

Les lectures des mesures reportées sur cette courbe donneront directement la concentration enzymatique en unités/ml.

3.2. Protéines.

Passer une gamme étalon de sérum-albumine bovine (fraction 5 de Cohn) de 0,1 à 1 mg/ml dans le tampon phosphate 0,1 M pH 6,8 ou dans l'eau distillée, suivant le protocole adopté. La courbe obtenue (fig. 5, courbe C) donnera par lecture la concentration en protéines par ml de l'échantillon.

3.3. Standardisation.

Pour vérifier et étalonner les réactifs, passer un standard amylase-protéine connu : diastase Merck (0,6 mg/ml) + sérum-albumine bovine (0,4 mg/ml).

On obtient un standard dont on peut calculer la teneur en unités amylase par rapport à la courbe B, et la teneur en protéines par rapport à la courbe C. La solution est répartie dans des godets fermés qui sont conservés congelés. La durée de conservation est supérieure à 1 mois.

4. MESURES

4.1. Séquence. — Pour obtenir le maximum de sensibilité et de précision, nous utilisons une séquence lente qui permet d'atteindre le plateau de coloration correspondant à chaque dosage. Le système permet de doser 15 échantillons à l'heure. Il est possible d'accélérer la cadence à 30 ou 60/heure aux dépens de la précision; la sensibilité est rattrapée par les amplificateurs des colorimètres. Un changement de cadence nécessite un étalonnage du système.

4.2. Analyse. Les échantillons sont pompés par une aiguille double dans le même godet à la séquence programmée par la came. La ligne de base de l'amidon dérive d'environ 2 % par heure, nécessitant l'introduction régulière d'un lavage de contrôle. Au départ de l'analyse, la valeur de la ligne de base amidon permet d'en tester la validité. Les lectures effectuées sur l'enregistrement sont traduites en concentration à partir des courbes étalon B et C.

4.3. Calculs. — La détermination simultanée de la concentration enzymatique et protéique de chaque échantillon permet d'en obtenir avec précision l'activité spécifique, rapport des deux mesures.

VI. — CONCLUSION

1. La meilleure précision est obtenue si les échantillons sont dilués de façon à donner une activité correspondant à la partie moyenne de la courbe. Le dosage est effectué sur le surnageant obtenu, après centrifugation, de la dilution de la solution initiale. La précision des mesures est de 5 %, le temps de réponse de l'appareil est de 10 minutes.

2. Ordre de grandeur des concentrations enzymatiques rencontrées :

— un broyat de plancton total est dilué environ 40 fois;

— le dosage permet de mesurer l'activité amyli-
sique de quelques Copépodes 4 à 10, d'une *Artemia*

salina; pour un Euphausiacé, il est nécessaire de diluer 2 à 5 fois l'extrait.

3. Performances : Le principe de l'auto-analyseur permet de modifier les circuits de façon à obtenir des cinétiques directes ou de faire varier des paramètres pour l'étude des propriétés de l'enzyme. Des modifications du temps d'incubation et de l'amplification des colorimètres permettent d'augmenter la sensibilité de la méthode.

Cet ensemble a été utilisé avec entière satisfaction au cours d'une campagne de quatre semaines au large du Maroc et par mer très agitée (*Cineca-Charcot IV*, 1973). Toutes les solutions stock préparées à terre et congelées se sont conservées parfaitement.

BIBLIOGRAPHIE

- BOND, R. M., 1934. — Digestive enzymes of the pelagic copepod *Calanus finmarchicus*. *Biol. Bull.*, **67** : 461-465.
- BOUCHER, J., SAMAIN, J. F., 1973. — L'activité amyli-
sique, indice de la nutrition du zooplancton; mise en évidence d'un rythme quotidien en zone d'upwelling. *Tethys* (sous presse).
- BUCHTA, K., 1967. — Bestimmung der aktivität von enzy-
men mit dem autoanalyser. *Z. Anal. Chem.*, **229** : 34-43.
- CHARIOT, J., ROZE, C., SOUCHARD, M., 1966. — Dosage
simultané des protides totaux et de l'amyli-
sique sur des microéchantillons de suc pancréatique de rat. *Symposium Technicon*, 1966.
- FUWA, H., 1954. — A new method for microdetermination
of amyli-
sique activity by the use of amylose as the
substrate. *J. Biochem. Tokyo*, **41** : 583-603.
- HARMES, D. R., CAMFIELD, R. N., 1966. — Iodometric
method for the determination of amyli-
sique. *Amer. J. Med. Techn.*, **32**, n° 6.
- LOWRY, O. H., ROSENBOUGH, N. J., FARR, L., RANDALL, R.
J., 1951. — Protein measurement with the Folin phenol
reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** : 265-275.
- MORITA, Y., SHIMIZU, K., OHGA, M., KORENAGA, T., 1966. —
Studies on amyli-
siques of *Aspergillus oryzae* cultured on
rice. *Agr. Biol. Chem.*, **30**, n° 2 : 114-121.
- RAMET, M., SIROTEAU, J. C., 1966. — Détermination semi-
automatique de l'amyli-
sique. *Ann. Biol. Chim.*, **24**, 7-9 :
907-921.
- SAMAIN, J. F., 1974. — Propriétés physicochimiques de
l'activité amyli-
sique des zooplanctontes. *Biochimie (à
paraître)*.
- SCHMIDT, R., 1964. — An automated amyloclastic proce-
dure for the determination of serum amyli-
sique. *Symposium Technicon*, 1964.
- SOMOGYI, M., 1938. — Micromethods for the estimation
of diastase. *J. Biol. Chem.*, **125** : 299-414.
- SUDAKA, P., 1969. — Le dépistage des pancréatites par
une technique de dosage automatique de l'amyli-
sique sérique et urinaire. *Feuillets de biologie*, **10** (50) : 49-52.
- TRACHMAN, H., CAYCLE, T., 1970. — An automatic proce-
dure for the determination of α -amyli-
sique. *Wallerstein Company Staten Island*. N.Y. 10303 (Rec. from Techni-
con).
- VAN WEEL, P. B., 1970. — In chemical zoology (Florkin,
M., et Scheer, B. T., eds), vol. 5, pp. 97-115, *Academic
Press*, New-York.
- VAN WORMHOUDT, A., CECCALDI, H. J., LE GAL, Y., 1972. —
Activité des protéases et amyli-
siques chez *Penaeus kerathu-
rus* : existence d'un rythme circadien. *C. R. Acad. Sci.,
Paris*, **274** : 1208-1211.
- VAN WORMHOUDT, A., LE GAL, Y., CECCALDI, H. J., 1972. —
Sur l'activité des enzymes digestives au cours du cycle
d'intermue chez *Palaeomon serratus*. *C. R. Acad. Sci.
Paris*, **274** : 1337-1340.
- WOHLGEMUTH, J., 1908. — Ueber eine neue methode zur
quantitativen bestimmung des diastatischen ferments.
J. Biochem. Z., **9** : 1-9.