

Approche histoenzymologique des effets de la température et de la pression sur un poisson (*Anguilla anguilla* L.)

Histoenzymologie
Métabolisme
Poisson
Température
Pression
Histoenzymology
Metabolism
Fish
Temperature
Pressure

E. Girin, L. Barthelemy
Laboratoire de Physiologie, Faculté de Médecine, rue Camille-Desmoulins, 29279 Brest,

Reçu le 29/9/77, révisé le 9/12/77, accepté le 23/12/77.

RÉSUMÉ

Une première partie est consacrée aux possibilités d'application à un poisson de techniques histoenzymologiques mises au point chez le mammifère. La plupart des activités enzymatiques explorées sont retrouvées dans les tissus d'anguille, avec une intensité généralement plus faible que celle qui est observée dans les tissus homologues de rat.

Une seconde partie étudie les effets, sur les métabolismes hépatocytaires et myocardiques de l'anguille, de modifications de la température. Les poissons sont brutalement soumis, 48 heures avant leur sacrifice, à une baisse de 8°C ou une hausse de 12°C de la température de l'eau (par rapport à une valeur de référence de 18°C). La majorité des activités enzymatiques subissent des variations d'intensité qui paraissent indépendantes du sens de la variation thermique. Ceci peut être interprété comme un remaniement métabolique, non spécifique et transitoire.

Une troisième partie analyse les incidences, sur les métabolismes hépatocytaires et myocardiques de l'anguille, d'une variation de la pression hydrostatique. En raison des problèmes techniques liés à ce type d'expérimentation, le séjour hyperbare est limité à une pression de 51 atm absolues (51 ATA) pour une durée de 5 minutes. Dans ces conditions et compte tenu des variations thermiques liées à la compression, un certain nombre d'activités enzymatiques sont révélées ou fortement augmentées par rapport aux mêmes activités du lot témoin.

Oceanol. Acta, 1978, 1, 2. 169-180.

ABSTRACT

Histoenzymological approach to the effects of temperature and pressure on fish (*Anguilla anguilla* L.)

The first part of the article deals with the possible application to fish of histoenzymological techniques developed with mammals. Various enzymatic activities in different intracellular metabolic processes were investigated, both in the hepatic parenchyma and in the myocardic fibres of rats and eels. Despite differences in natural temperature, it appeared preferable to conduct the incubation of both fish and mammal tissues at temperatures normally used for the latter. Most of the enzymatic activities observed in rat tissues were detected in similar tissues of the eel but usually with a lower degree of intensity. It could not be determined whether this difference was due to the specific metabolism of the fish or to the limitations of the technique itself.

The second part of the article studies the effects of sudden temperature variations on the hepatocytary and myocardic metabolisms of the eel. 48 hours before death, the fish were subjected to an 8°C decrease and 12°C increase in relation to the basic temperature (18°C). As a result, most of the enzymatic activities showed intensity changes which were apparently independent of the direction of the thermic variation. This suggests a non-specific, transitory, metabolic adjustment. Several activities, however, appeared to be related to the temperature, which would indicate the sensitivity to temperature of a specific isoenzyme, or the beginning of a process of metabolic orientation.

The third part of the article analyses the effects of hydrostatic pressure variation on the hepatocytary and myocardic metabolisms of the eel. For technical reasons, hyperbaric treatment was limited to 51 absolute atmospheres (51 ATA) for a period of 5 minutes. Under these conditions, several new enzymatic activities occurred, while others increased in intensity. It is concluded that these changes may be attributed to hydrostatic pressure itself, and possibly to pressure variation in relation to time, rather than to the 51 ATA pressure value.

Oceanol. Acta, 1978, 1, 2, 169-180.

Au cours de leurs travaux sur les effets physiologiques de la pression *per se*, Belaud *et al.* (1976 a, 1976 b) ont mis en évidence, chez l'anguille, des modifications du comportement et de certains paramètres physiologiques : ventilation, rythme cardiaque, électro-encéphalogramme, en fonction de la température et de la pression.

Entre autres techniques, l'histoenzymologie a paru un bon moyen de déterminer si les variations observées étaient d'origine extrinsèque ou intrinsèque. Une première approche a été tentée par l'étude de quelques aspects du métabolisme intracellulaire myocardique du poisson soumis à une augmentation de la pression hydrostatique. Cela impliquait d'abord de vérifier si les techniques choisies, couramment utilisées sur des tissus de mammifères, donnaient des résultats similaires et appréciables sur des tissus de poisson. Cela impliquait aussi de mettre en évidence l'éventuelle influence d'une variation de température sur les activités enzymatiques étudiées, connaissant l'importance de ce facteur sur les effets physiologiques et biochimiques de la pression (Belaud *et al.*, 1976 a, 1976 b, 1977) et sachant que l'appareillage employé ne permettait pas d'effectuer de variation de pression sans variation de température.

MOYENS ET MÉTHODES

La mise en évidence des activités enzymatiques est obtenue par contact de la coupe tissulaire, censée contenir l'enzyme fonctionnelle, avec un milieu d'incubation. Ce dernier contient le substrat spécifique de l'enzyme considérée et doit répondre à ses exigences de fonction-

nement en ce qui concerne la température, le pH, les cofacteurs, les ions métalliques.

La réaction enzymatique est couplée avec l'apparition d'un produit coloré qui précipite sur le lieu même de l'activité enzymatique. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à l'intensité de cette activité. Elle est appréciée au microscope optique et notée par un nombre de croix allant de 0 à + + + +. Il s'agit donc d'une étude semi-quantitative.

Une quarantaine de réactions histoenzymologiques ainsi que quelques réactions histochimiques ont été sélectionnées parmi les techniques enzymologiques rassemblées et modifiées par Wegmann (1972) (tableaux 1 a et 1 b). Elles permettent la mise en évidence de certains constituants cellulaires et d'activités enzymatiques appartenant à différentes voies métaboliques (métabolismes des glucides, des lipides, des acides aminés et des protéines, des mucopolysaccharides et métabolisme énergétique).

Les animaux utilisés ont été, d'une part, l'anguille (*Anguilla anguilla* L., de livrée jaune, de poids compris entre 50 et 100 g) et le rat (souche Wistar, mâle, pesant 200 g environ), puisqu'il était indispensable de vérifier la validité, chez le poisson (poïkilotherme), de méthodes mises au point et habituellement utilisées chez le mammifère (homéotherme). Dans le but de réaliser cette étude comparative, il a été nécessaire, dans un temps expérimental préalable, de choisir une température d'incubation des réactions histoenzymologiques du poisson.

Chez le mammifère, cette température est de 37°C pour la plupart des tests. L'étude préliminaire a montré qu'une intensité réactionnelle appréciable pouvait s'obtenir sur

les tissus de poissons incubés soit à 37°C, soit à la température du laboratoire, voisine de 18°C. Il a été cependant indispensable, dans le second cas, d'augmenter considé-

Tableau 1 a

Réactions histochimiques et histoenzymologiques effectuées, abréviations utilisées, nomenclature internationale des enzymes et références bibliographiques des techniques.

Histochemical and histoenzymological reactions performed, abbreviations used, international enzyme nomenclature, and bibliographical references of techniques.

Métabolisme exploré	Abréviation du nom de l'enzyme	Réaction histochimique ou histoenzymologique	Nomenclature internationale de l'enzyme	Référence bibliographique de la technique (d'après Wegmann, 1972)
Métabolisme des glucides				
Mise en évidence du glycogène	PAS	Acide périodique schiff		McManus, 1946
	αA/PAS	α-amylase + PAS	3.2.1.1.	Wegmann, Verne, 1960
	βA/PAS	β-amylase + PAS	3.2.1.2.	Wegmann, Verne, 1960
	DIM/PAS	Dimédon (Diméthyl-5, 5-cyclohexanedione-1, 3-) + PAS		Bulmer, 1959
Glycogénogénèse	UDPG-GT	Uridine diphosphoglucose-glycogène transférase	2.4.1.11.	Sie <i>et al.</i> , 1966
Glycogénolyse	PHYLA I	Phosphorylase active	2.4.1.1.	Guha, Wegmann, 1959
	PHYLA II	Phosphorylase totale	2.4.1.2.(?)	Guha, Wegmann, 1959
Glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (E.M.P.)	ALDA	Fructose-1,6-phosphate aldolase	4.1.2.13.	Abe, Shimizu, 1964
	3 PGAD	3-phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase	1.2.1.12.	Himmelock, Karnovsky, 1961
Néoglucogénèse	G6PA	Glucose-6-phosphatase	3.1.3.9.	Chiquoine, 1953
	FDPA	Fructose-1,6-phosphatase	3.1.3.11.	Verne, Wegmann, 1958
	LD	Lactate déshydrogénase	1.1.1.27.	Nachlas <i>et al.</i> , 1958
	AD	Alcool déshydrogénase	1.1.1.1.	Wegmann, Sotelo, 1962 Hardonk, 1965
Voie des Pentoses ou voie des Hexosemonophosphates (H.M.P.)	G6PD	Glucose-6-phosphate déshydrogénase	1.1.1.49.	Wegmann, Gerzeli, 1961
	6PGD	6-phosphogluconate déshydrogénase	1.1.1.44.	Wegmann, Gerzeli, 1961
	NADPH ₂ -TR	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit - Tétrazolium réductase	1.6.99.1.	Scarpelli <i>et al.</i> , 1958
	R5PA	Ribose-5-phosphatase	3.6.1.9.(?)	Wegmann, 1966
Métabolisme des lipides				
Liaison entre métabolismes glucidique et lipidique	αGPD	α-Glycérophosphate déshydrogénase	1.1.1.8.	Wegmann <i>et al.</i> , 1964
Phospholipides	αGPA I	α-Glycérophosphatase I ou phosphatase alcaline (pH 8,6)	3.1.3.1.	Gomori, 1941
	αGPA II	α-Glycérophosphatase II ou phosphatase acide (pH 5)	3.1.3.2.	Gomori, 1942
Corps cétoniques	βOHBD	β-Hydroxybutyrate déshydrogénase	1.1.1.30.	Wegmann <i>et al.</i> , 1964
Esters d'acides gras	ESTA	Lipase (Aliestérase)	3.1.1.3.	Gomori, 1952
	NESTA	Naphtol acétylestérase	3.1.1.2.	Nachlas, Seligman, 1949
	IESTA	Indoxylacétate estérase	3.1.1.2.(?)	Holt, 1956
Mise en évidence des lipides	OR	Oil red (lipides neutres)		Lison, 1960
	NS	Soudan noir B (lipoprotéines)		Wegmann, Fouquet, 1961

rablement la durée de l'incubation, ce qui exposait à des risques de diffusion de la coloration et de détérioration tissulaire. La température et le temps d'incubation, utilisés pour les tissus de mammifère ont, de ce fait, été conservés pour tous les échantillons traités (mammifère et poisson).

Les tissus retenus pour l'étude histoenzymologique ont été, d'une part, le myocarde, afin de préciser les résultats de Belaud *et al.* (1976 a) et, d'autre part, le parenchyme hépatique; compte tenu de sa grande richesse en enzymes, ce tissu sert en effet généralement de référence en histo-enzymologie.

Tous les animaux (rats et anguilles) ont été sacrifiés par décapitation et les tissus immédiatement prélevés

à la température de séjour, puis fixés par congélation à l'azote liquide. Ils ont été ensuite débités, au cryotome, en coupes de 8 µm d'épaisseur. Celles-ci ont été stockées à -30°C avant d'être utilisées pour la mise en évidence des différentes réactions, rapportées dans le tableau 1.

• L'expérimentation préliminaire a été réalisée à partir des prélèvements tissulaires, effectués sur 8 rats et 11 anguilles n'ayant subi aucun traitement particulier. Les rats sont gardés à la température du laboratoire (18-20°C) et nourris *ad libitum*, les anguilles maintenues à jeun, en eau douce, à 18°C.

Ces anguilles ont été considérées, pour la suite de ce travail, comme animaux témoins (At).

Tableau 1 b

Réactions histochimiques et histoenzymologiques effectuées, abréviations utilisées, nomenclature internationale des enzymes et références bibliographiques des techniques.

Histochemical and histoenzymological reactions performed, abbreviations used, international enzyme nomenclature, and bibliographical references of the techniques.

Métabolisme exploré	Abréviation du nom de l'enzyme	Réaction histochimique ou histoenzymologique	Nomenclature internationale de l'enzyme	Référence bibliographique de la technique (d'après Wegmann, 1972)
Métabolisme énergétique				
Cycle de Krebs	CA	Cis-aconitase	4.2.1.3.	Yamada <i>et al.</i> , 1962
	ICD	Isocitrate déshydrogénase	1.1.1.42.	Wegmann, Khosrovchahi, 1964
	SD	Succinate déshydrogénase	1.3.99.1.	Wegmann, Tordet-Caridroit, 1960
	MD	Malate déshydrogénase	1.1.1.37.	Wegmann, Sotelo, 1962 Nachlas <i>et al.</i> , 1958
« Chaîne respiratoire »	CO	Cytochrome oxydase	1.9.3.1.	Burstone, 1959
	NADH ₂ -TR	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit - Tétrazolium réductase	1.6.99.3.	Scarpelli <i>et al.</i> , 1958
Phosphorylation	ATPA I	Adénosine-5'-triphosphatase pH 6,3 pH 7,4 pH 8,5 pH 9,4	3.6.1.3.	Wegmann, Bankowski, 1960
	ATPA II			
	ATPA III			
	ATPA IV			
Métabolisme des acides aminés et des protéines				
Entrée dans le cycle de Krebs	GLD	Glutamate déshydrogénase	1.4.1.3.	Diculesco, Wegmann, 1965
	GOT	Glutamate oxaloacétate transminase	2.6.1.1.	Wegmann <i>et al.</i> , 1965
Transaminations	ALPA	Alanine aminopeptidase	3.4.1.3.	Nachlas <i>et al.</i> , 1957
	LEPA	Leucine aminopeptidase	3.4.1.1.	Nachlas <i>et al.</i> , 1957
	PAMA	Phosphoamidase	3.9.1.1.	Gomori, 1948
	MAO	Monoamine oxydase	1.4.3.4.	Glennier <i>et al.</i> , 1957
	CHOO	Choline oxydase	(?)	Guha, Wegmann, 1963
Mise en évidence des groupes SH-protéiques	DDD	(Dihydroxy-2,2'dinaphtyl-6,6'disulfure) : Réaction de Barnett et Seligman		Barnett, Seligman, 1952 Barnett, Seligman, 1954
	SH	Réaction de Chevremont et Frederic		Chevremont, Frederic, 1943
Métabolisme des nucléoprotéines et des nucléotides				
Mise en évidence des acides nucléiques	VMP	Vert de méthyle-pyronine : Réaction de Brachet		Brachet, 1940
	ADNA	Désoxyribonucléase + VMP	3.1.4.5.	
Métabolisme des nucléotides	ARNA	Ribonucléase + VMP	2.7.7.16.	
	AMPA	5'-nucléotidase (adénosine-5'-monophosphatase)	3.1.3.5.	Wachstein, Meisel, 1957
Métabolisme des mucopolysaccharides (M.P.S.)				
Liaison entre métabolismes glucidique et glucuronique	UDPGD	Uridine diphosphoglucose déshydrogénase	1.1.1.22.	Balogh, Cohen, 1961
	GLUCA	β-naphtol glucuronidase	3.2.1.31.	Seligman <i>et al.</i> , 1954
	SULFA	β-naphtol sulfatase	3.1.6.1.	Rutenburg <i>et al.</i> , 1952
Mise en évidence des mucopolysaccharides	BA	Bleu alcian		

• Les effets de la température ont été recherchés sur deux lots de 6 et 7 anguilles, placées respectivement dans une eau à 10°C (A 10) et une eau à 30°C (A 30), 48 heures avant le sacrifice. Les poissons du premier lot ont donc été soumis à une baisse de température de 8°C et ceux du second lot à une augmentation de température de 12°C. Le choix de ces deux températures a été déterminé par les expériences de Belaud *et al.* (1976 a) sur le rythme cardiaque.

• Les effets de la pression hydrostatique ont été étudiés sur un lot de 11 anguilles, soumises, dans un caisson hyperbare de 130 l, à un séjour de 5 minutes sous une pression de 51 atm absolues (51 ATA). La compression a été réalisée à la vitesse constante de 10 atm.mn⁻¹, permettant d'atteindre la pression de 51 ATA en 5 minutes. Il était impératif de sacrifier les poissons à la pression de séjour, c'est-à-dire avant la décompression. Sachant que le mode de fixation des tissus le mieux adapté à l'étude histoenzymologique ultérieure était la congélation par l'azote liquide, un dispositif permettant de transvaser directement le poisson de son bac à eau dans un bac à azote liquide a été mis au point au laboratoire (Belaud, 1975). Il consiste à placer l'anguille dans une boîte métallique percée de trous et immergée dans l'eau d'un aquarium. Cette boîte est reliée à l'extrémité d'un levier dont l'autre bras porte un récipient léger situé sous l'arrivée d'eau du circuit de boisson. Le dispositif reste ainsi pendant la compression et le séjour hyperbare (fig. 1 A). Au moment choisi pour sacrifier l'anguille, le récipient est rempli d'eau, ce qui a pour effet de faire basculer le levier et de soulever hors de l'aquarium la boîte métallique contenant l'anguille (fig. 1 B). Celle-ci glisse le long d'un axe parallèle au levier sur lequel elle est engagée par un anneau, jusqu'à un récipient métallique rempli d'azote liquide, où elle demeure le temps nécessaire à la bonne fixation du poisson. Elle est ensuite remontée au-dessus du récipient de congélation par l'intermédiaire d'une poulie (fig. 1 C). Une rapide décompression est alors effectuée. Il s'écoule environ 5 minutes entre le début de la décompression, l'ouverture du caisson et la récupération de l'animal congelé.

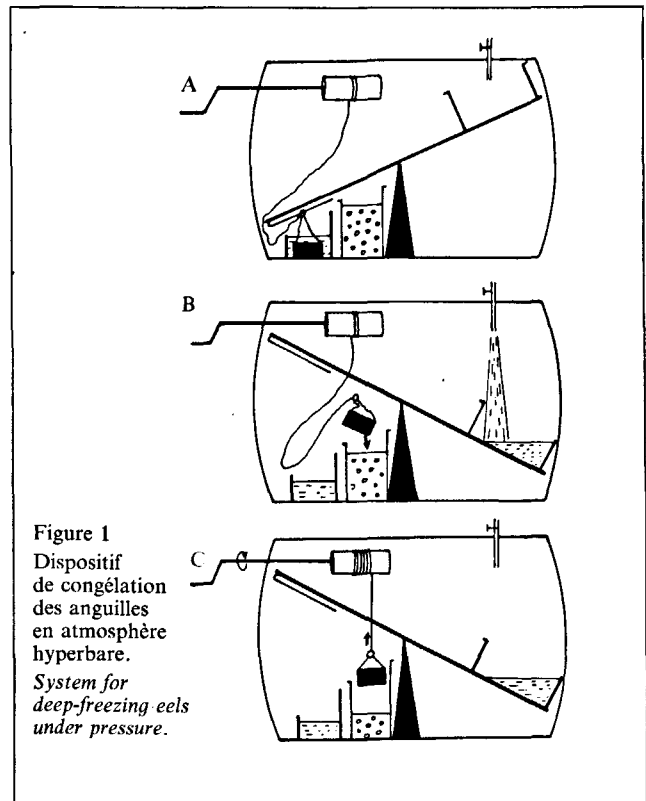
Ce dispositif présente deux inconvénients principaux :

— l'aquarium n'est pas entièrement fermé et l'eau qu'il contient peut s'enrichir en gaz dissous. En raison de la durée très courte du séjour hyperbare et de la faible diffusion des gaz à travers une couche d'eau relativement peu importante et non brassée, les effets observés ont été considérés comme imputables à la pression hydrostatique *per se*;

— la bonne fixation du poisson par congélation est difficilement contrôlable en raison du petit volume du récipient à azote liquide.

RÉSULTATS

Les résultats des observations histoenzymologiques sont présentés sous forme d'histogrammes. Pour chaque réaction histoenzymologique effectuée sur 3 animaux au minimum, la moyenne des activités enzymatiques observées est schématisée par un rectangle noir, dont la



hauteur lui est proportionnelle. Cette représentation permet une lecture et une comparaison plus faciles des résultats que celles des tableaux d'origine, où chaque activité enzymatique est notée par un nombre de croix variable de 0 à + + + +. Lorsque la réaction n'a été faite que sur 1 ou 2 animaux, un point d'interrogation est ajouté à l'intérieur du rectangle laissé en blanc. Les réactions non effectuées sont signalées par des astérisques.

Comparaison des activités enzymatiques hépatocytaires et myocardiques chez le rat et l'anguille témoin (fig. 2)

• Certaines activités enzymatiques ne sont révélées ni chez le rat ni chez l'anguille. Ce sont, dans les hépatocytes, l'adénosine-5'-triphosphatase pH 6,3 (ATPA I) et dans les fibres myocardiques, l'adénosine-5'-triphosphatase pH 6,3, la ribose-5-phosphatase (R5PA) et, peut-être, l'alanine aminopeptidase (ALPA), la leucine aminopeptidase (LEPA) et la β -naphthol sulfatase (SULFA).

L'activité adénosine-5'-triphosphatase pH 6,3 reste techniquement difficile à révéler (Wegmann, Bankowski, 1960), ce qui explique qu'elle n'ait pas été du tout retrouvée. Par contre, l'absence des activités ribose-5-phosphatase, alanine et leucine aminopeptidases, β -naphthol sulfatase semble normale dans les fibres myocardiques.

• Quelques activités enzymatiques, mises en évidence chez l'anguille, ne le sont pas chez le rat, ce qui est confirmé par des travaux antérieurs (Guha, Wegmann, 1960; Verne, Wegmann, 1958, 1959; Wegmann *et al.*, 1960). Ce sont, dans les hépatocytes, la phosphorylase active (PHYLA I) et la phosphatase alcaline (α GPA I) et dans les fibres myocardiques, l'uridine diphosphoglucose-glycogène transférase (UDPG-GT) et l'alcool déshydrogénase (AD).

• Inversement, un certain nombre d'activités enzymatiques, trouvées chez le rat, ne sont pas décelées dans les tissus homologues de l'anguille. Ce sont, dans les hépatocytes, la fructose-1.6-phosphatase (FDPA), la ribose-5-phosphatase (R5PA), l'adénosine-5'-triphosphatase pH 7,4 (ATPA II), l'indoxylacétate estérase (IESTA) et peut-être la leucine aminopeptidase (LEPA), la β -naphtol sulfatase (SULFA) et l'uridine diphosphoglucose déshydrogénase (UDPGD) et, dans les fibres myocardiques, la glucose-6-phosphatase (G6PA), l'indoxylacétate estérase (IESTA), la *cis*-aconitase (CA), l'adénosine-5'-triphosphatase pH 7,4 (ATPA II), la monoamine oxydase (MAO) et peut-être l'uridine diphosphoglucose déshydrogénase (UDPGD).

• Enfin, toutes les autres activités enzymatiques étudiées, soit la grande majorité, sont bien mises en évidence chez le rat comme chez l'anguille. Cependant, leur intensité est généralement beaucoup plus faible chez le poisson, quelle que soit la voie métabolique explorée.

Si l'on considère le métabolisme des glucides, les activités enzymatiques de la voie des pentoses sont, dans les

hépatocytes de rat et d'anguille, plus importantes que celles de la glycolyse; la néoglucogénèse y est intense. Inversement, dans les fibres myocardiques, c'est la voie glycolytique qui semble plus active que celle des pentoses; l'activité lactase déshydrogénase (LD) y demeure cependant plus élevée.

Les activités enzymatiques intervenant dans le métabolisme des lipides sont plus faibles dans le myocarde que dans le parenchyme hépatique de rat et d'anguille.

Quant au métabolisme des acides aminés, des protéines et nucléoprotéines, il se caractérise, chez le rat comme chez l'anguille et dans les deux tissus étudiés, par une importante activité glutamate oxaloacétate transaminase (GOT).

Enfin, chez le rat, toutes les activités enzymatiques du métabolisme énergétique sont intenses dans les hépatocytes et les fibres myocardiques; chez l'anguille au contraire, on peut remarquer dans les deux cas, une opposition d'intensité entre les activités enzymatiques participant à la même séquence métabolique. Dans le

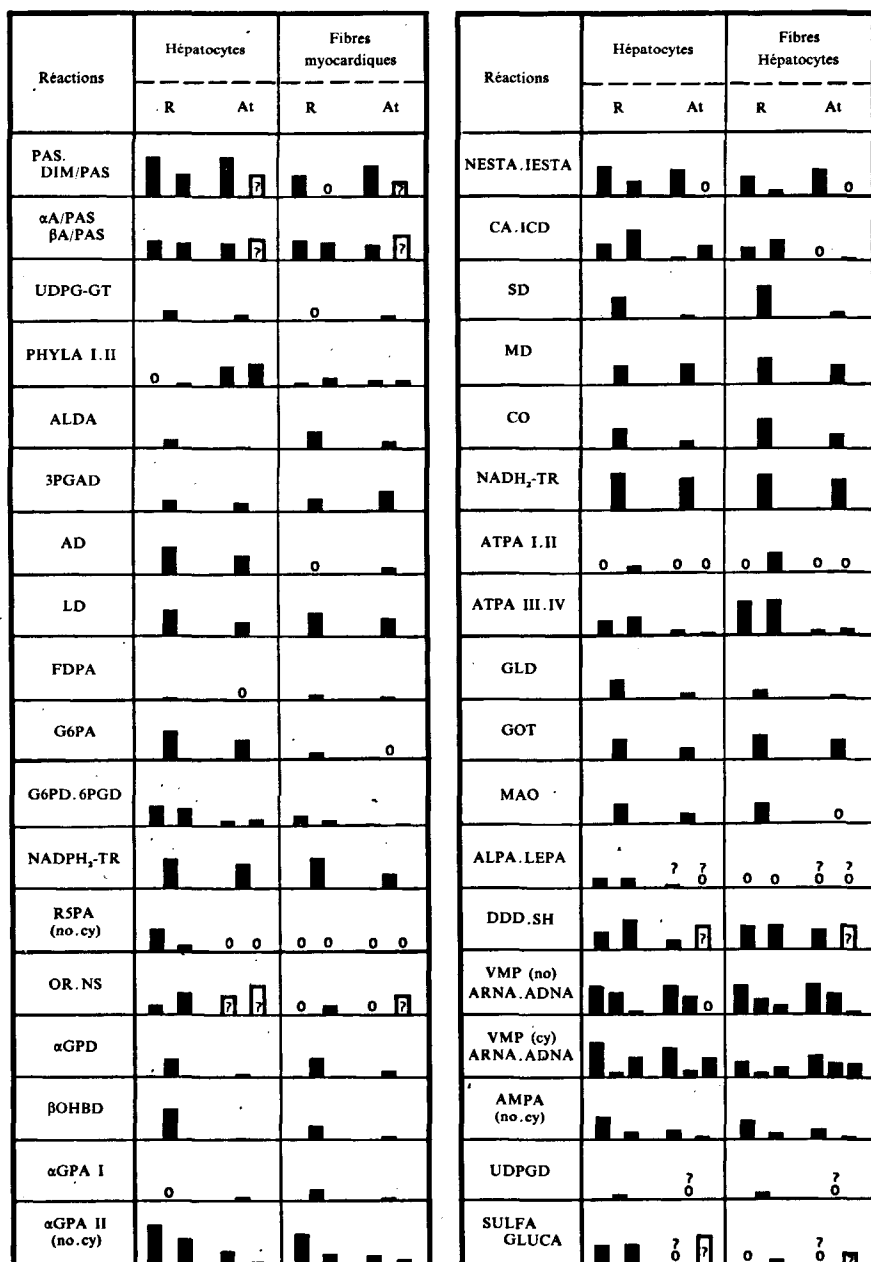


Figure 2
 Histogrammes des activités enzymatiques hépatocytaires et myocardiques chez le rat (R) et l'anguille témoin (At).
 Histograms of the hepatocitary and myocardic enzymatic activities for rat (R) and control eel (At).

cycle de Krebs, par exemple, les activités *cis*-aconitase (CA) et succinate déshydrogénase (SD) sont faibles, alors que les activités malate déshydrogénase (MD) et isocitrate déshydrogénase (ICD) sont élevées.

Effets d'une variation de la température sur les métabolismes hépatocytaires et myocardiques de l'anguille (fig. 3)

La comparaison des résultats obtenus avec ceux du lot d'anguilles témoins permet plusieurs observations.

- La plupart des activités enzymatiques hépatocytaires et myocardiques des deux lots expérimentaux (A 10 et A 30) subissent des modifications par rapport aux activités enzymatiques analogues du lot témoin (At).
- Ces variations sont souvent du même type, quel que soit le sens de la variation thermique et quelle que soit la voie métabolique considérée. De plus, la majorité d'entre elles sont des augmentations d'activité. Dans les hépatocytes par exemple, les activités lactate déshydrogénase

(LD), phosphatase alcaline (α GPA I), malate déshydrogénase (MD), glutamate déshydrogénase (GLD) augmentent, alors que les activités alcool déshydrogénase (AD), NADPH₂-tétrazolium réductase (NADPH₂-TR), β -hydroxybutyrate déshydrogénase (β OHBD), diminuent à 10°C et 30°C. Dans les fibres myocardiques, l'uridine diphosphoglucose-glycogène transférase (UDPG-GT), la phosphorylase active (PHYL I), l'aldolase (ALDA), la NADH₂-tétrazolium réductase (NADH₂-TR) augmentent, alors que la 3-phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase (3PGAD), la naphthol acétylestérase (NESTA) et la glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) diminuent.

- Inversement, certaines activités présentent des variations divergentes aux deux températures expérimentales, comme la phosphorylase active (PHYL I), l'aldolase (ALDA), la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGD) hépatocytaires et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGD), la phosphatase alcaline (α GPA I), la succinate déshydrogénase (SD), la cytochrome oxydase (CO) myocardiques.

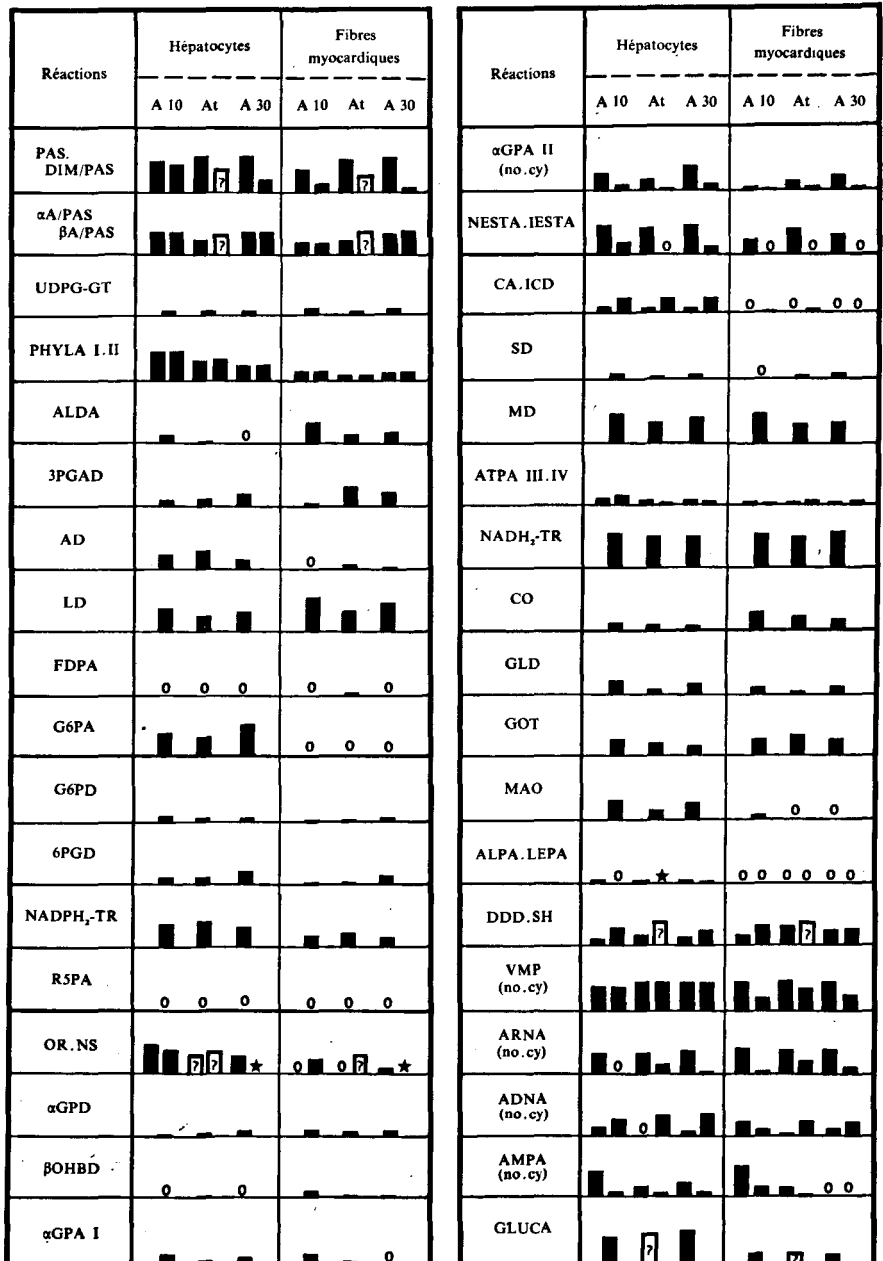


Figure 3
 Histogrammes des activités enzymatiques hépatocytaires et myocardiques chez l'anguille à 10°C (A 10), l'anguille témoin à 18°C (At) et l'anguille à 30°C (A 30).
 Histograms of the hepatocytary and myocardic enzymatic activities for eel at 10°C (A 10), control eel at 18°C (At) and eel at 30°C (A 30).

Effets d'une variation de la pression hydrostatique sur les métabolismes hépatocytaires et myocardiques de l'anguille (fig. 4)

Les modifications observées sont différentes dans l'un et l'autre tissu. Si l'on considère le parenchyme hépatique, on peut remarquer une intensification du fonctionnement de la voie des pentoses (G6PD, 6PGD, NADPH₂-TR, R5PA) et peut-être de la néoglucogénèse (LD, FDPA), ainsi qu'une augmentation des activités participant au métabolisme énergétique (cycle de Krebs, chaîne respiratoire) et à celui des acides aminés et des protéines. Dans les fibres myocardiques, on note un accroissement du fonctionnement de la voie glycolytique (ALDA, 3PGAD) et de la chaîne respiratoire, associé à une importante augmentation de certaines activités isolées comme la lactate déshydrogénase (LD), l' α -glycérophosphate déshydrogénase (α GPD) et la β -hydroxybutyrate déshydrogénase (β OHBD).

Quelques activités enzymatiques, non décelées chez les

anguilles témoins, sont mises en évidence chez les anguilles ayant subi un séjour hyperbare. Ce sont par exemple, dans les hépatocytes, la fructose-1,6-phosphatase (FDPA), la ribose-5-phosphatase (R5PA), l'adénosine-5'-triphosphatase pH 6,3 et 7,4 (ATPA I et II) et, dans les fibres myocardiques, la ribose-5-phosphatase (R5PA), l'adénosine-5'-triphosphatase pH 6,3 et 7,4 (ATPA I et II).

D'autres activités enzymatiques enfin, anormalement faibles chez les témoins, sont fortement augmentées, comme la *cis*-aconitase (CA) et la succinate déshydrogénase (SD) hépatocytaires et l' α -glycérophosphate déshydrogénase (α GPD) myocardique.

DISCUSSION

Ces résultats ne permettent pas de déterminer si les activités enzymatiques, absentes ou très faibles chez l'anguille, sont une particularité métabolique normale

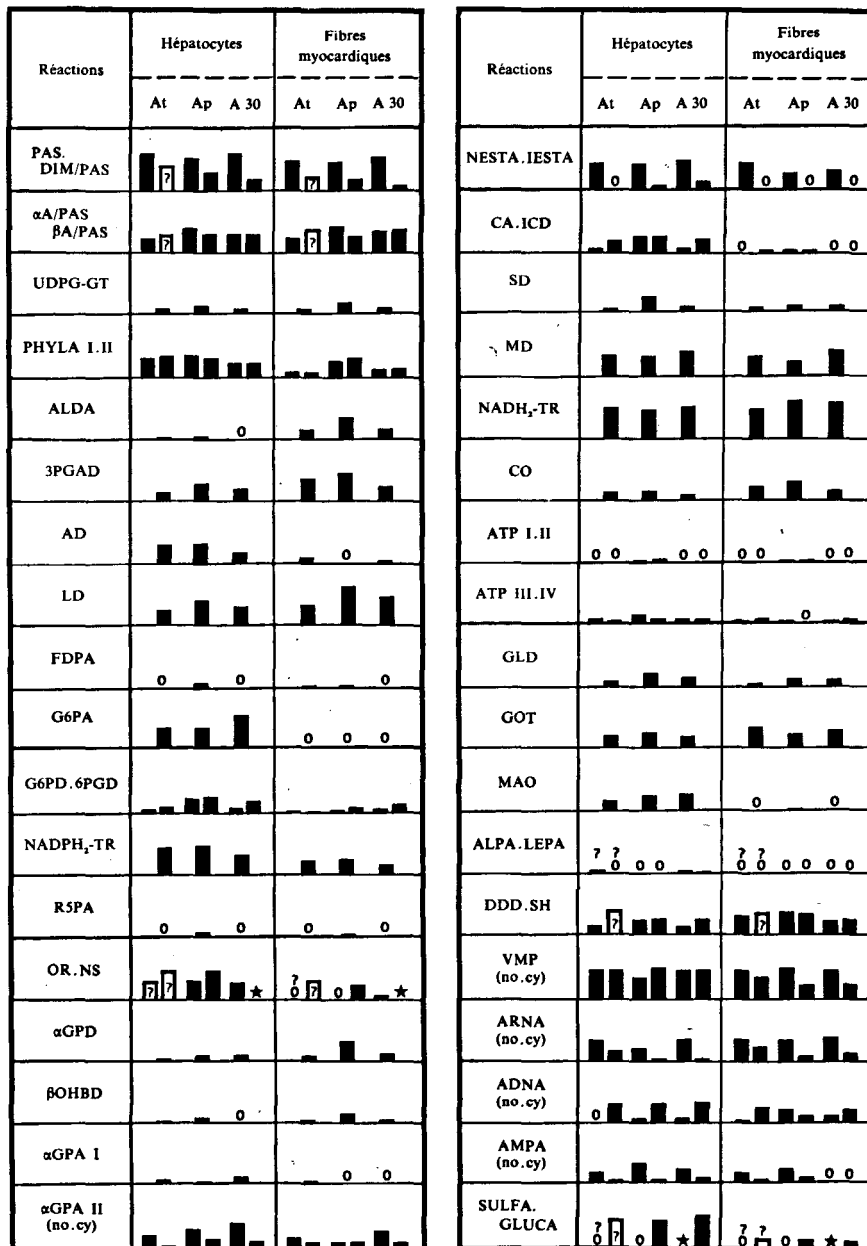


Figure 4
 Histogrammes des activités enzymatiques hépatocytaires et myocardiques chez l'anguille témoin à la pression atmosphérique (At), l'anguille à la pression à 51 ATA (Ap) et l'anguille à 30°C et à la pression atmosphérique (A 30).
 Histograms of the hepatocytary and myocardic enzymatic activities, for control eel at 18°C and atmospheric pressure (At), eel at 51 ATA (Ap) and eel at 30°C and atmospheric pressure (A 30).

de cette espèce ou si la technique employée arrive à ses limites d'utilisation. Il existe, en effet, chez le poisson, dans un même tissu, un grand nombre de formes iso-enzymiques de la même protéine enzymatique (Hochachka, 1970). Ces iso-enzymes, de caractéristiques physicochimiques différentes, sont également variables d'un tissu à l'autre et d'un poisson à l'autre. Il serait donc intéressant de coupler la technique histoenzymologique avec une technique enzymatique totalement différente, biochimique par exemple.

Avec les seules données d'une étude histoenzymologique et en l'absence d'informations abondantes et précises sur les systèmes métaboliques du poisson (de l'anguille en particulier), la comparaison des métabolismes hépatocytaires et myocardiques s'avère difficile entre le rat et l'anguille. Cependant, on peut supposer que, chez le poisson, des variations relatives d'intensité des activités enzymatiques peuvent apparaître sous l'influence de certains facteurs, comme la température et la pression hydrostatique.

Une critique générale de nos techniques peut être présentée : de nombreuses réactions enzymatiques sont, vraisemblablement, rapidement réversibles et peuvent retrouver leur état initial lorsque l'on passe de la pression d'expérience (51 ATA) à la pression de référence, qui est aussi celle de la réaction histoenzymologique (1 ATA). Cette réversibilité ne peut se produire tant que les tissus restent congelés, mais risque donc de survenir au cours de la mise en évidence des activités enzymatiques, qui implique une décongélation des tissus à la pression atmosphérique. Cette réversibilité peut donc masquer une certaine quantité d'informations histoenzymologiques, en ce qui concerne à la fois les effets de la pression hydrostatique et les effets de la température d'expérience, sur le métabolisme tissulaire.

Dans le même ordre d'idée, il semble difficile de connaître exactement les effets histoenzymologiques de la pression (et/ou de la température) car les réversibilités de réaction des systèmes enzymatiques choisis peuvent être différentes les uns des autres. Dans l'étude globale d'une voie métabolique, ceci peut gêner l'interprétation des modifications observées sous l'effet du facteur étudié (pression, température).

La seule méthode non sujette à critique serait d'effectuer les réactions histoenzymologiques dans les conditions de température et de pression choisies pour l'expérience, ce qui, d'une part, poserait des problèmes méthodologiques non résolus à l'heure actuelle, et, d'autre part,

interdirait toute comparaison des résultats avec ceux des conditions de référence.

Selon la théorie d'Hochachka et Somero (1970), la majorité des résultats rapportés ci-dessus concernant les effets de variations thermiques, pourraient s'interpréter comme un état métabolique transitoire, contemporain d'une restructuration biophysique et biochimique des constituants cellulaires. 48 heures après le début de la variation thermique, on peut considérer, en effet, que les perturbations métaboliques strictement dues au stress ont disparu et que les mécanismes adaptatifs se mettent en place (Demaël, Pérès, 1972). La restructuration biophysique et biochimique implique en particulier la biosynthèse de variantes d'iso-enzymes, spécifiques de la nouvelle condition thermique. Si celle-ci se prolongeait plusieurs semaines, il est vraisemblable qu'un nouvel état métabolique stable caractériserait l'adaptation à chacune des deux températures considérées. Il serait alors peut-être possible d'observer des modifications métaboliques nettes, telles que l'augmentation du fonctionnement de la voie des pentoses et de la lipogénèse, rapportées par plusieurs auteurs durant l'adaptation au froid (Hochachka, Somero, 1970; Benziger, Umminger, 1974; Yamauchi *et al.*, 1975).

Lorsque certaines activités ont des variations différentes à 10 et 30°C, on peut envisager l'hypothèse d'un début d'orientation métabolique en fonction d'une spécificité thermique des enzymes étudiées.

Si l'on considère isolément chacune des deux conditions expérimentales, les résultats obtenus présentent une grande hétérogénéité. Dans une même voie métabolique, certaines activités enzymatiques augmentent, alors que d'autres diminuent (comme l'aldolase et la 3-phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase hépatocytaires à 30°C ou la succinate et la malate déshydrogénases myocardiques à 10°C). S'agit-il dans ce cas d'un effet de réversibilité de certains systèmes enzymatiques à la température de 37°C ?

On peut en déduire que le nombre des activités enzymatiques étudiées et des animaux traités est encore trop insuffisant pour permettre de donner des interprétations précises en termes de métabolisme. De plus, il serait intéressant de comparer ces données à celles qui résulteraient soit de variations de température de même amplitude mais s'exerçant pendant un temps inférieur ou supérieur à 48 heures, soit de variations de température de plus faible amplitude (et donc plus proches de la variation thermique accompagnant l'expérimentation hyperbare) s'exerçant 48 heures avant le sacrifice.

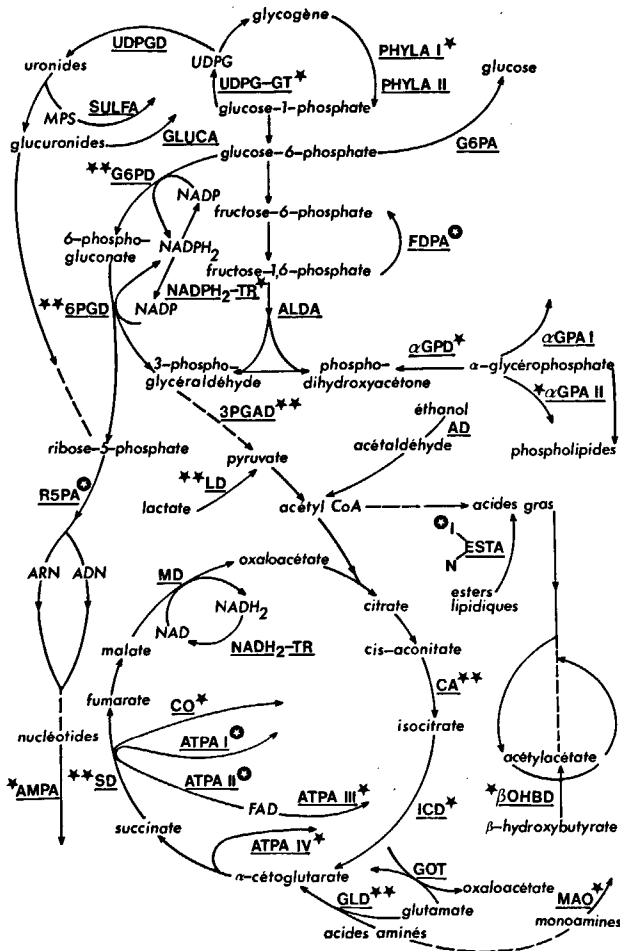


Figure 5
 Effets d'une pression de 51 ATA (durée 5 minutes) sur les activités enzymatiques des hépatocytes d'anguille. *, faible augmentation; **, forte augmentation; •, faible diminution; ••, forte diminution; ⊙, activité non décelée chez le témoin (1 ATA).
*Effects of a 51 ATA pressure (lasting 5 minutes) on the eel's hepatocytary enzymatic activities. *, slight increase; **, large increase; •, slight decrease; ••, large decrease; ⊙, Activity not detected in the control (1 ATA).*

En ce qui concerne les effets d'une variation de pression de 1 à 51 ATA (fig. 5 et 6), il apparaît que les voies métaboliques préférentiellement utilisées à la pression atmosphérique semblent électivement augmentées, comme la voie des pentoses et le cycle de Krebs dans les hépatocytes et la voie glycolytique dans les fibres myocardiques. Ceci peut s'interpréter comme une réponse immédiate au stress, c'est-à-dire une réponse à l'accroissement des dépenses énergétiques par l'utilisation de moyens immédiatement et habituellement fonctionnels (consommation de lactate par le myocarde).

Quelques activités enzymatiques, faibles ou absentes chez les témoins, sont augmentées ou apparaissent chez les anguilles soumises à une pression hyperbare. Ces constatations pourraient signifier, selon l'hypothèse de Penniston rapportée par Hochachka (1975), que l'augmentation de pression hydrostatique favoriserait la dépolymérisation de certaines enzymes multi-sous-unitaires ou au moins, un état de polymérisation différent, caractérisé par une plus grande activité. Pour Low et

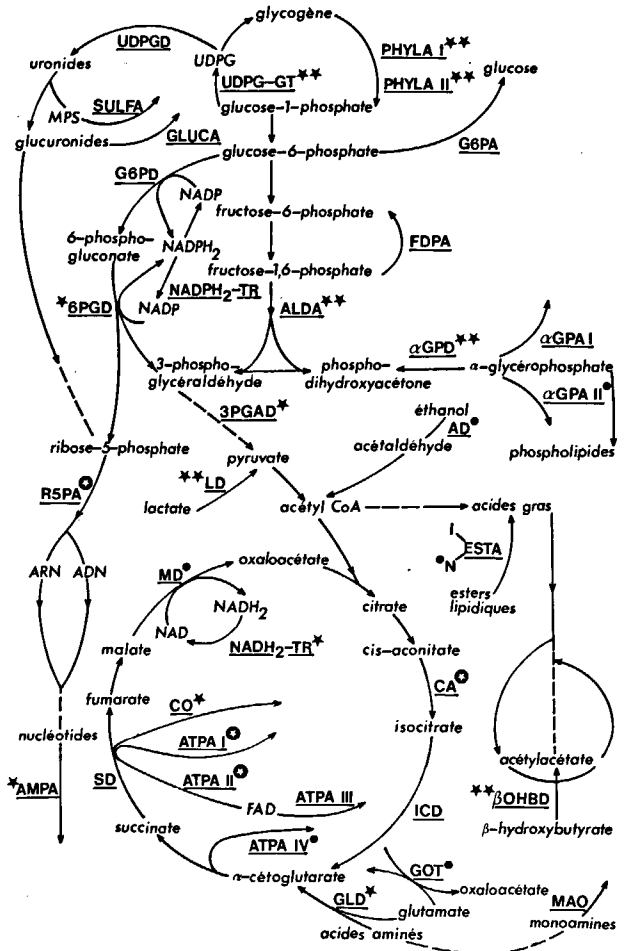


Figure 6
 Effets d'une pression de 51 ATA (durée 5 minutes) sur les activités enzymatiques des fibres myocardiques d'anguille. *, faible augmentation; **, forte augmentation; •, faible diminution; ••, forte diminution; ⊙, activité non décelée chez le témoin (1 ATA).
*Effects of a 51 ATA pressure (lasting 5 minutes) on the eel's myocardic enzymatic activities. *, slight increase; **, large increase; •, slight decrease; ••, large decrease; ⊙, activity not detected in the control (1 ATA).*

Somero (1975), les réactions enzymatiques se produiraient avec des changements de volume entre le système contenant le complexe enzyme-substrat à l'état de repos et le système contenant ce complexe à l'état activé. La pression pourrait accélérer ou freiner la vitesse d'une réaction suivant qu'elle s'effectue avec, respectivement, une diminution ou une augmentation de volume entre l'état initial et l'état final. Ainsi, les différentes réactions enzymatiques pourraient répondre spécifiquement aux variations de pression. Enfin, selon Johnson et Eyring (1970), tous les processus biologiques auraient un optimum de pression comme un optimum de température, variable selon certains facteurs, tels que la concentration du substrat ou de certains métabolites, la température.

Dans nos conditions expérimentales, la montée en pression s'accompagne d'une augmentation de la température de l'eau de l'aquarium de 5°C. Il n'est pas possible de déterminer si les effets dus à cette variation de température s'additionnent ou se retranchent des effets dus

à la pression de 51 ATA et/ou à la variation de pression de 50 atm. On peut cependant constater que les résultats de l'expérimentation hyperbare ne sont pas comparables à ceux qui sont obtenus après une augmentation de température de l'eau de 18 à 30°C. En particulier la seule augmentation de température de l'eau de 12°C ne permet pas de révéler des activités enzymatiques qui ne sont pas décelées chez les témoins. Il est donc vraisemblable que la pression et/ou la variation de pression exercent un effet spécifique sur certaines activités enzymatiques, qui est fonction de la température.

Des expériences de Belaud *et al.* (1976 a), sur l'anguille traitée à l'atropine et au propanolol, montrent qu'il existe un effet des variations de pression hydrostatique sur la fréquence cardiaque, par impact direct sur le fonctionnement des centres d'automatisme cardiaque. Ces mêmes auteurs (Belaud *et al.*, 1977) ont mis en évidence chez la truite arc-en-ciel, un effet de réveil de l'anesthésie par la pression hydrostatique, qui peut être rapproché de l'effet excitant précédent.

Ainsi, dans les conditions de notre expérimentation et compte tenu des réserves concernant la méthodologie, il semble qu'une augmentation de pression de 50 atm. (1 et 51 ATA), puisse stimuler chez l'anguille certaines enzymes inactives ou faiblement actives à la pression atmosphérique.

La réponse des différentes voies métaboliques peut se discuter soit comme une réponse au stress, et donc non spécifique, mais différente d'un tissu à l'autre, soit comme une réponse spécifique à l'accroissement de la pression. Dans cette seconde hypothèse, l'effet constaté peut être dû soit à la variation de pression en fonction du temps $\Delta P/\Delta t$, soit à la pression de séjour P. Compte tenu de la courte durée du séjour hyperbare, il est difficile de rapporter les effets observés à la seule action de la pression P de 51 ATA.

Différentes expériences menées dans le laboratoire ont pu montrer que certaines modifications physiologiques de l'animal, soumis à une pression de 51 à 101 ATA (anomalies électro-encéphalographiques, hyperventilation, agitation), apparaissent d'une manière d'autant plus faible que la vitesse de compression est plus grande. Par contre, ces mêmes perturbations disparaissent ou s'atténuent fortement au cours d'un séjour à pression constante (Meusy *et al.*, 1976; Belaud *et al.*, 1976 a, 1976 b, 1977).

Dans le cadre d'une expérimentation histoenzymologique ultérieure, il conviendrait, afin de différencier

les facteurs $\Delta P/\Delta t$ et P, de prolonger la durée du séjour hyperbare à pression constante P, en maintenant, d'une part, la même vitesse de compression $\Delta P/\Delta t$ et, d'autre part, une température du milieu constante pendant la compression et le séjour hyperbare.

Cela n'a pu être réalisé dans la présente expérience, car le volume du vase à azote liquide était restreint à 1,5 l par l'espace disponible à l'intérieur du caisson. La quantité restante d'azote liquide en fin de séjour hyperbare est donc le facteur limitant de la durée de l'expérience et de la pression maximale de séjour.

Si le seul facteur $\Delta P/\Delta t$ est déterminant dans les modifications d'activité enzymatique, les perturbations seront variables en fonction de la pression maximale et de la vitesse de compression. Elles tendront à disparaître lors d'un palier à pression constante d'une durée suffisamment longue. Par contre, si le facteur P est déterminant, les modifications seront d'autant plus marquées que la valeur de la pression P et/ou la durée du séjour à pression constante seront plus importantes.

CONCLUSION

Les techniques histoenzymologiques choisies semblent utilisables chez le poisson, puisqu'elles mettent en évidence des variations d'activités enzymatiques appréciables dans les conditions expérimentales étudiées. Une augmentation de pression hydrostatique de 1 à 51 ATA provoque ainsi l'apparition d'activités enzymatiques non décelées à 1 ATA ou l'augmentation d'activités faiblement intenses.

Cependant, ces méthodes manquent de finesse, faute d'une automatisation rigoureuse des techniques et d'un système objectif et quantitatif d'observation des coupes.

Les résultats obtenus ne permettent qu'une approche enzymologique globale des effets de la température et de la pression, qu'il serait souhaitable de préciser après avoir résolu quelques problèmes techniques. Ce sont, en particulier, les variations de température liées aux variations de pression, la restriction de la durée et de la pression maximale du séjour hyperbare liées au mode de sacrifice du poisson, et l'éventuelle réversibilité des réactions enzymatiques liée aux conditions mêmes de la technique histoenzymologique.

RÉFÉRENCES

- Belaud A., 1975. Contribution à l'étude de quelques réactions physiologiques de l'anguille (*Anguilla anguilla* L.) soumise à diverses conditions hyperbares, *Thèse Doct. ès Sciences*, Univ. Bretagne Occidentale, 271 p.
- Belaud A., Barthélémy L., Le Saint J., Peyraud C., 1976 a. Trying to explain an effect of *per se* hydrostatic pressure on heart rate in fish, *Aviat. Sp. Environ. Med.*, **47**, 3, 252-257.
- Belaud A., Mabin D., Barthélémy L., Peyraud C., 1976 b. Activité électro-encéphalographique d'un poisson (*Anguilla anguilla* L.) soumis à diverses conditions hyperbares, *J. Physiol.*, Paris, **72**, 639-652.
- Belaud A., Barthélémy L., Peyraud C., 1977. Temperature and *per se* hydrostatic pressure reversal of pentobarbital anesthesia in fish, *J. Appl. Physiol.*, **44**, 329-334.
- Benziger D., Umminger B. L., 1974. The effect of pH and cold acclimation upon glucose-6-phosphatase activity in the goldfish, *Carassius auratus*, *Comp. Biochem. Physiol.*, **47 B**, 243-254.
- Demaël A., Pérès G., 1972. Influence de la température sur le métabolisme des poissons, *Ann. Inst. Michel Pacha*, **5**, 20-27.
- Guha S., Wegmann R., 1960. La mise en évidence histochimique de l'activité phosphorylasique dans le foie et dans d'autres organes. I. Technique, *Bull. Soc. Biol.*, **42**, 1, 115-121.
- Hochachka P. W., 1970. Intermediary metabolism in fishes. In *Fish physiology*, edited by W. S. Hoar and D. J. Randall, Academic Press, New York, I, 351-390.
- Hochachka P. W., 1975. How abyssal organisms maintain enzyme of the "right" size, *Comp. Biochem. Physiol.*, **52 B**, 151-158.
- Hochachka P. W., Somero G. N., 1970. Biochemical adaptation to the environment. In *Fish physiology*, edited by W. S. Hoar and D. J. Randall, Academic Press, New York, VI, 100-156.
- Johnson F. H., Eyring H., 1970. The kinetic basis pressure effects in biology and chemistry. In *High pressure effects on cellular processes*, edited by A. M. Zimmermann, Academic Press, New York, 1-44.
- Low P. S., Somero G. N., 1975. Pressure effects on enzyme structure and function *in vitro* under simulated *in vivo* conditions, *Comp. Biochem. Physiol.*, **52 B**, 67-74.
- Meusy J. J., Barthélémy L., De Nay D., Belaud A., Girin E., 1976. Expérimentation hyperbare (110 atmosphères) chez un crustacé amphipode Talitridae [*Orchestia gammarella* (Pallas)], *Hydrobiol.*, **51**, 139-147.
- Verne J., Wegmann R., 1958. Activité fructose-1.6-phosphatase. Variations expérimentales, *Ann. Histochem.*, **3**, 187-198.
- Verne J., Wegmann R., 1959. Les phosphatases alcalines. Problèmes histochimiques de leurs localisations et de leur signification, *Path. Biol.*, **7**, 15-16, 1711-1718.
- Wegmann R., 1972. *Méthodes de détection et techniques histo-enzymologiques*, Institut d'Histochemie Médicale, UER Biomédicale Saints-Pères, Paris, 120 p.
- Wegmann R., Bankowski Z., 1960. Différenciation histochimique de quatre groupes d'adénosine triphosphatases selon Slater, *Ann. Histochem.*, **5**, 2, 121-141.
- Wegmann R., Verne J., Guha S., 1960. Activité de l'uridine diphosphoglucose-glycogène transférase dans le muscle, *Ann. Histochem.*, **5**, 253-258.
- Yamauchi T., Stegeman J. J., Goldberg E., 1975. The effects of starvation and temperature acclimation on pentose phosphate pathway dehydrogenases in brook trout liver, *Arch. Biochem. Biophys.*, **167**, 1, 13-20.