



**HAL**  
open science

**ACTION DU PH ET DE LA TEMPERATURE SUR  
L’AFFINITÉ POUR L’OXYGÈNE DE  
L’HÉMOGLOBINE D’ ARENICOLA MARINA (L.),  
ANNÉLIDE POLYCHÈTE**

André Toulmond

► **To cite this version:**

André Toulmond. ACTION DU PH ET DE LA TEMPERATURE SUR L’AFFINITÉ POUR L’OXYGÈNE DE L’HÉMOGLOBINE D’ ARENICOLA MARINA (L.), ANNÉLIDE POLYCHÈTE. Vie et Milieu , 1978, pp.443-459. hal-02999109

**HAL Id: hal-02999109**

**<https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-02999109v1>**

Submitted on 10 Nov 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L’archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ACTION DU pH ET DE LA TEMPÉRATURE  
SUR L’AFFINITÉ POUR L’OXYGÈNE  
DE L’HÉMOGLOBINE D’*ARENICOLA MARINA* (L.),  
ANNÉLIDE POLYCHÈTE (1)**

par André TOULMOND \*

*Laboratoire de Zoologie, Université Pierre et Marie Curie, Paris;  
Station Biologique de Roscoff;  
Laboratoire de Physiologie Respiratoire, C.N.R.S., Strasbourg, France*

**ABSTRACT**

The oxygen affinity of a respiratory pigment changes with temperature and blood pH. Moreover, in poikilotherms, *in vivo*, blood pH is also temperature dependent. The effects of pH and temperature changes on the oxygen affinity of an extracellular hemoglobin were studied in the lugworm, *Arenicola marina* (L.). The possible consequences of these effects on blood oxygen transport are discussed.

Le sang de l’Arénicole, *Arenicola marina* (L.), contient un pigment respiratoire dont le poids moléculaire élevé (ca 3. 10<sup>6</sup> daltons, SVEDBERG et ERIKSSON-QUENSEL, 1933) est caractéristique des hémoglobines extracellulaires si fréquentes chez les Annélides (FOX et VEVERS, 1960; FLORKIN, 1969; MANGUM, 1976 a). Longtemps

(\*) Laboratoire de Zoologie, Université Pierre et Marie Curie, Bâtiment A, 4, place Jussieu, 75230 Paris Cedex 05, France.

(1) Cet article est dédié à Monsieur le Professeur Pierre DRACH, à l’occasion de son jubilé scientifique, le 23 mars 1978.

contesté (WELLS, 1966), le rôle joué par l'hémoglobine d'Arénicole dans le transport de l'oxygène est maintenant parfaitement établi (KRÜGER, 1960; TOULMOND, 1973, 1975; MANGUM, 1976 b). Cette hémoglobine manifeste une très grande affinité pour l'oxygène : mesurée dans le sang entier, à 15 °C et à pH = 7,5, la pression partielle d'oxygène correspondant à la demi-saturation des molécules de pigment,  $P_{50}$ , ne dépasse pas 2 torr.

Cette affinité est susceptible de varier en fonction de plusieurs facteurs. L'action de deux de ces facteurs, pH et concentration du sang en sels, a déjà été étudiée chez l'Arénicole. Aux valeurs physiologiques de pH, l'affinité est d'autant plus faible que la concentration du sang en protons est plus forte, c'est-à-dire que le pH du sang est plus acide (TOULMOND, 1970; WEBER, 1972). Inversement, cette affinité est d'autant plus grande que la concentration du sang en sels, et plus spécialement en cations divalents  $Ca^{++}$  et  $Mg^{++}$ , est plus élevée (EVERAARTS et WEBER, 1974).

Un troisième facteur est susceptible de modifier de façon importante l'affinité d'un pigment respiratoire pour l'oxygène. La fixation d'une molécule de ce gaz est une réaction exothermique correspondant, chez la plupart des hémoglobines de Vertébrés, à la libération de 9 à 14 kcal (ROSSI-FANELLI, ANTONINI et CAPUTO, 1964). L'affinité d'un pigment pour l'oxygène est donc d'autant plus faible que la température est plus élevée. Chez l'Arénicole, d'après une analyse succincte de WEBER (1972), la température n'aurait que peu d'effet sur l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène, la chaleur apparente d'oxygénation de la molécule de pigment,  $\Delta H$ , étant de l'ordre de  $-5,3 \text{ kcal.mole}^{-1}$  entre 10 et 15 °C. Il nous a semblé intéressant de reprendre cette analyse. En effet, les résultats de WEBER ont été obtenus *in vitro* et à pH constant. Or, on sait que chez les Poïkilothermes, *in vivo*, les variations de la température ambiante se traduisent par des réajustements importants de l'équilibre acide-base du sang (RAHN, REEVES et HOWELL, 1974, 1975). En plus de son effet propre sur l'affinité du pigment pour l'oxygène, la température est donc susceptible de moduler l'action de l'un des deux autres facteurs agissant sur cette affinité, le pH. La présente étude a été réalisée en tenant compte de cette possibilité.

## I. — MATÉRIEL ET MESURES

Les Arénicoles utilisées ont été récoltées à la sortie du Vieux-Port de Roscoff (Nord-Finistère, France) et conservées au laboratoire, à 15-16 °C, en eau de mer courante constamment aérée. Le prélèvement

du sang prébranchial a été effectué sur les animaux non anesthésiés, par ponction dans le vaisseau ventral (ASHWORTH, 1904) à l'aide de micropipettes en verre. Le sang obtenu a été centrifugé à faible vitesse et à 4 °C pendant 10 minutes, de manière à éliminer les leucocytes.

Les valeurs de pH ont été mesurées à l'aide d'une microélectrode thermostatée (Radiometer type G299A) et d'un pH-mètre Radiometer type PHM 72. L'étalonnage de l'électrode a été effectué, pour chacune des températures, à l'aide de tampons phosphates (Radiometer S1500 et S1510).

Les valeurs de  $S_{O_2}$ , pourcentage de saturation de l'hémoglobine, ont été déterminées selon une technique décrite par ailleurs (TOULMOND, 1973). Les mesures de  $P_{O_2}$  requises par cette technique ont été réalisées à l'aide d'une électrode à oxygène thermostatée (Radiometer type E5046/0).

Les valeurs de  $P_{vCO_2}$ , pression partielle de  $CO_2$  dans le sang prébranchial, ont été mesurées en utilisant la méthode d'ASTRUP (1956).

Les phases gazeuses d'équilibration, de compositions connues, ont été réalisées à partir de gaz purs, à l'aide de pompes Wösthoff.

## II. — PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX

L'action du pH et de la température sur l'affinité de l'hémoglobine d'Arénicole pour l'oxygène a été analysée dans deux situations expérimentales différentes.

1) Situation « *in vitro* » : un échantillon unique de sang prébranchial a été constitué par prélèvement chez des animaux naturellement acclimatés à 15-16 °C. Les valeurs de  $P_{50}$ , mesure de cette affinité, ont été mesurées à 5-10-15 et 25 °C sur des fractions aliquotes de cet échantillon. Ces fractions ont été équilibrées, pendant 30 minutes, dans un microtonomètre Radiometer BMS2, contre des phases gazeuses de  $P_{CO_2}$  connu (0,3-2-4-7-10 ou 20 torr). La valeur de  $P_{O_2}$  dans ces phases gazeuses a été calculée de manière à obtenir, pour chaque température et pour chaque  $P_{CO_2}$ , deux ou trois valeurs de  $S_{O_2}$  aussi peu différentes que possible de 50 %. Les valeurs correspondantes de pH ont été mesurées. Les valeurs de  $P_{50}$  et  $pH_{50}$  (correspondant à  $S_{O_2} = 50\%$ ) ont été obtenues par interpolation graphique linéaire.

2) Situation « *in vivo* » : huit échantillons de sang prébranchial ont été prélevés chez des animaux expérimentalement acclimatés pendant 96 heures (voir TOULMOND, 1977 b) à huit températures différentes (5,3-6,5-7,5-10,5-14,1-18,2-22 et 25,7 °C). Les me-

sures de  $P_{50}$  et  $pH_{50}$  ont été effectuées à ces températures,  $P_{CO_2}$  dans la phase gazeuse d'équilibration étant égal à  $P_{vCO_2}$ , pression partielle de  $CO_2$  mesurée *in vivo* dans le sang prébranchial des animaux acclimatés.

### III. — RÉSULTATS

Les résultats correspondant à la situation *in vitro* apparaissent dans le tableau I et dans la figure 1, qui montrent l'effet du pH et de la température sur l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène : pour une même température, les valeurs de  $P_{50}$  sont d'autant plus élevées que le pH est plus acide. L'affinité du pigment diminue donc en même temps que le pH et dans des proportions sur lesquelles la température semble n'avoir que peu d'influence ( $\Delta \log P_{50} / \Delta pH$  compris entre  $-0,73$  et  $-1,08$  pour  $t$  compris entre 5 et 25 °C). Dans l'intervalle de pH considéré, qui correspond à l'intervalle de pH physiologique (TOULMOND, 1973), et quelle que soit la température, l'hémoglobine d'Arénicole présente donc un effet Bohr « normal » tout à fait classique.

L'effet de la température se manifeste par une translation verticale des droites de régression le long de l'axe des ordonnées quand la température augmente (Fig. 1). La figure 2, obtenue à

TABLEAU I

Variations de  $\log P_{50}$  et de  $pH_{50}$  en fonction de la température et de la pression partielle de  $CO_2$ ,  $P_{CO_2}$ , dans la phase gazeuse d'équilibration. Régressions calculées par la méthode des moindres carrés.  
 $r$  = coefficient de corrélation.

$P_{CO_2}$ torr	Température, °C							
	5		10		15		25	
	$\log P_{50}$	$pH_{50}$						
0,3	- 0,10	7,61	0,19	7,53	0,34	7,46	0,64	7,29
2	- 0,05	7,55	0,24	7,50	0,41	7,42	0,66	7,28
4	0,03	7,50	0,30	7,43	0,45	7,37	0,69	7,26
7	0,26	7,38	0,36	7,36	0,52	7,30	0,76	7,19
10	0,28	7,31	0,44	7,29	0,59	7,25	0,79	7,14
20	0,38	7,11	0,57	7,14	0,66	7,12	0,83	7,03
Régression	$\log P_{50} = -1,08 \text{ pH}_{50} + 8,13$ ( $r = -0,976$ )		$\log P_{50} = -0,96 \text{ pH}_{50} + 7,41$ ( $r = -0,998$ )		$\log P_{50} = -0,96 \text{ pH}_{50} + 7,52$ ( $r = -0,997$ )		$\log P_{50} = -0,73 \text{ pH}_{50} + 5,99$ ( $r = -0,964$ )	

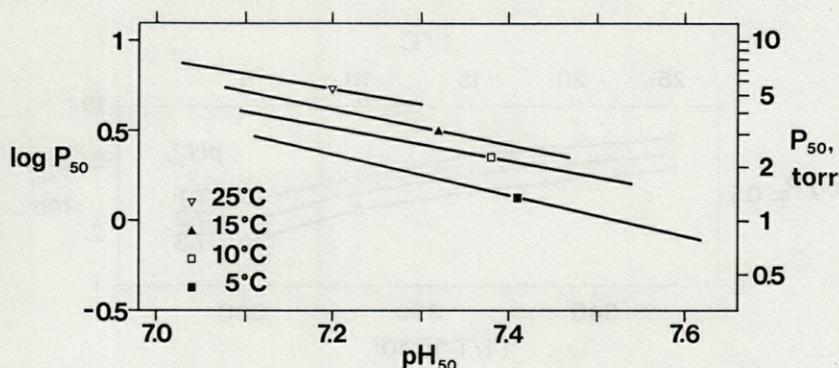


FIG. 1. — Influence de pH sur l'affinité pour l'oxygène ( $P_{50}$ ) de l'hémoglobine d'*Arenicola marina* ( $P_{50}$  = pression partielle d'oxygène pour laquelle le pigment respiratoire est à demi saturé). Mesures effectuées à 5, 10, 15 et 25 °C sur du sang entier prélevé chez des animaux naturellement acclimatés à 15-16 °C ("acclimatization temperature", SCHMIDT-NIELSEN, 1975, p. 283). Pour chaque température, les variations de pH sont dues à des variations de la pression partielle de  $CO_2$  dans la phase gazeuse d'équilibration ( $P_{CO_2}$  = 0,3-2-4-7-10 et 20 torr). Paramètres des droites de régression calculés par la méthode des moindres carrés : la pente de ces droites,  $\Delta \log P_{50} / \Delta pH$ , est la mesure du coefficient de Bohr moyen dans l'intervalle de pH considéré (voir texte et Tableau I).

partir des données du tableau I et de la figure 1, montre que, à pH constant, l'affinité du pigment respiratoire pour l'oxygène diminue fortement lorsque la température augmente. La même observation peut être faite lorsque les variations de l'affinité sont mesurées à valeur constante de  $P_{CO_2}$ , pression partielle de  $CO_2$  dans la phase d'équilibration (Fig. 3). On notera cependant que dans ces conditions, pour une variation identique de  $P_{CO_2}$ , la variation d'affinité est d'autant plus forte que la température est plus basse.

Dans les deux cas, la chaleur apparente d'oxygénation de l'hémoglobine d'Arénicole,  $\Delta H$ , a été calculée en utilisant l'équation de VAN'T HOFF modifiée (WYMAN, 1964) :

$$\Delta H = 2,303 R \Delta \log P_{50} / \Delta(T^{-1})$$

dans laquelle

$R$  = constante des gaz parfaits

et  $T$  = température absolue, en °K.

On voit que  $\Delta H$  varie avec l'intervalle de température considéré, étant plus élevé pour  $t$  compris entre 5 et 10 °C que pour  $t$  compris entre 15 et 25 °C. D'une manière générale,  $\Delta H$  est également plus élevé lorsqu'il est mesuré à valeur constante de  $P_{CO_2}$  dans la phase

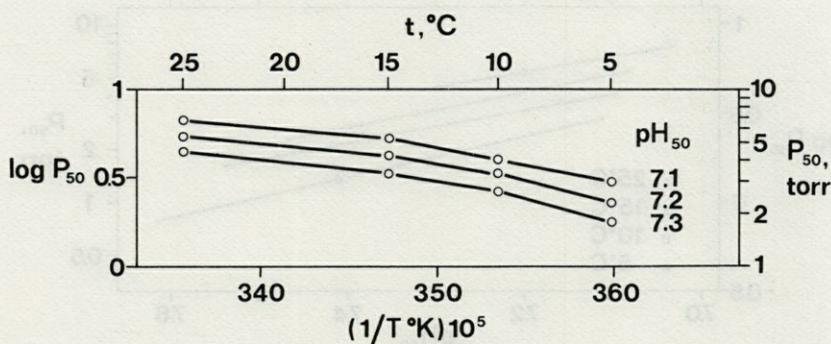


FIG. 2. — Influence de la température sur l'affinité pour l'oxygène ( $P_{50}$ ) de l'hémoglobine d'*Arenicola marina*. Valeurs de  $P_{50}$  obtenues graphiquement à partir des courbes de la figure 1 et comparées à pH constant. La pente des courbes ( $\log P_{50}$ ) vs ( $T^{-1}$ ) mesurée, à une constante près, la valeur de  $\Delta H$ , chaleur apparente d'oxygénation de la molécule de pigment (voir texte et Tableaux I et II).

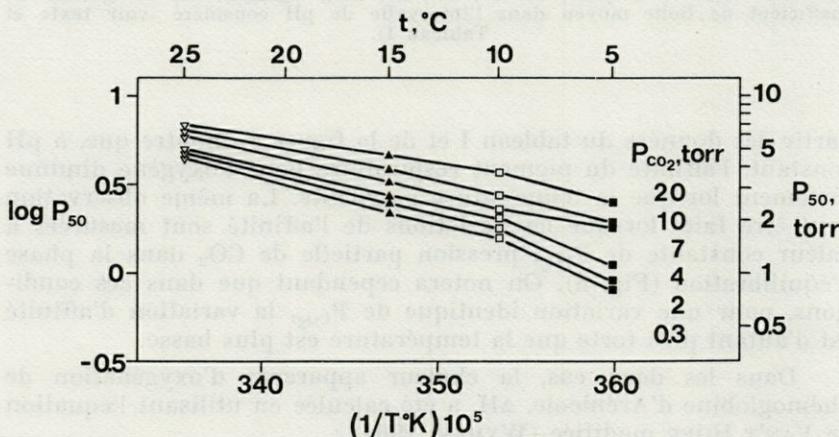


FIG. 3. — Influence de la température sur l'affinité pour l'oxygène ( $P_{50}$ ) de l'hémoglobine d'*Arenicola marina*. Valeurs de  $P_{50}$  tirées de la figure 1 et comparées à valeur constante de  $P_{CO_2}$  dans la phase gazeuse d'équilibre. La pente des courbes ( $\log P_{50}$ ) vs ( $T^{-1}$ ) mesurée, à une constante près, la valeur de  $\Delta H$ , chaleur apparente d'oxygénation de la molécule de pigment (voir texte et Tableau II).

gazeuse d'équilibration que lorsqu'il est mesuré à valeur constante de pH du sang (Tab. II).

Les résultats correspondants à la situation « *in vivo* » apparaissent dans le tableau III et dans les figures 4 et 5. Les valeurs de  $P_{50}$ , mesurées sur le sang d'animaux expérimentalement acclimatés à diverses températures, correspondent à une situation mixte dans laquelle varient à la fois pH et  $P_{CO_2}$  (Tabl. III). Dans ces conditions, la valeur moyenne de  $\Delta\bar{H}$  calculée pour des valeurs de  $t$  comprises

TABLEAU II

Valeurs de  $\Delta H$ , chaleur apparente d'oxygénation de l'hémoglobine d'*Arenicola marina*, calculées, pour les intervalles de température considérés, à pH constant (donnée de la figure 2), à  $P_{CO_2}$  constant (données de la figure 3), à pH et  $P_{CO_2}$  variables (données de la figure 5 et du tableau III).

	Intervalle de température considéré °C	5 - 10	10 - 15	15 - 25	5,3 - 25,7
$\Delta H$ , $\frac{\text{Kcal}}{\text{mole}}$ pH = cte (Fig. 2)	7,1	- 8,9	- 9,0	- 3,9	
	7,2	- 11,5	- 7,5	- 4,3	
	7,3	- 12,2	- 7,5	- 4,7	
	$\overline{\Delta H}$	- 10,8	- 8,0	- 4,3	
$\Delta H$ , $\frac{\text{Kcal}}{\text{mole}}$ $P_{CO_2}$ = cte (Fig. 3)	0,3	- 15,7	- 11,2	- 11,8	
	2	- 20,9	- 12,7	- 9,8	
	4	- 19,4	- 11,2	- 9,4	
	7	- 7,2	- 11,9	- 9,4	
	10	- 11,5	- 11,2	- 7,9	
	20	- 13,7	- 6,7	- 6,7	
$\overline{\Delta H}$		- 12,6	- 9,3	- 7,9	
$\Delta H$ , $\frac{\text{Kcal}}{\text{mole}}$ <i>in vivo</i> (pH et $P_{CO_2}$ variables) (Fig. 5)					- 11,4

TABLEAU III

Variations de  $\log P_{50}$  et de  $pH_{50}$  mesurées sur le sang d'animaux expérimentalement acclimatés aux températures indiquées pendant 96 heures. Mesures effectuées à ces températures.  $Pv_{CO_2}$  = pression partielle de  $CO_2$  dans la phase gazeuse d'équilibration = pression partielle de  $CO_2$  dans le sang prébranchial des animaux acclimatés (TOULMOND, 1977 b).

Température d'acclimatation et de mesure °C	$\log P_{50}$	$pH_{50}$	$Pv_{CO_2}$ <i>in vivo</i> torr
5,3	- 0,02	7,59	0,64
6,5	0,04	7,57	1,64
7,5	0,10	7,56	1,26
10,5	0,22	7,51	1,22
14,1	0,29	7,46	0,54
18,2	0,43	7,38	0,86
22,0	0,52	7,33	1,70
25,7	0,61	7,28	1,46

entre 5,3 et 25,7 °C est élevée (ca — 11,4 kcal . mole<sup>-1</sup>, tabl. II). Cette valeur de  $\Delta H$  apparaît plus proche de celles calculées, « *in vitro* », à pH variable et  $P_{CO_2}$  compris entre 0,3 et 2 torr (Fig. 5, zone hachurée), que de celles calculées, également « *in vitro* », mais à valeur constante de pH (Fig. 5, courbe A).

#### IV. — DISCUSSION

##### 1. ACTION DU pH SUR L'AFFINITÉ.

L'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* manifeste une très forte affinité pour l'oxygène (BARCROFT et BARCROFT, 1924; WOLVEKAMP et VREEDE, 1941; ELIASSEN, 1955; JONES, 1955), ce qui se traduit par des valeurs de  $P_{50}$  qui comptent parmi les plus faibles jamais mesurées chez les Annélides (MANGUM, 1976 a).

Cette affinité varie de manière appréciable avec le pH du sang. C'est « l'effet Bohr », dû à la compétition, de type allostérique hétérotropique, existant entre les molécules d'oxygène et les protons vis-à-vis de la molécule de pigment (SIGGAARD-ANDERSEN et GARBY, 1973). Les résultats exposés ci-dessus confirment l'existence, chez *Arenicola marina*, d'un effet Bohr déjà mis en évidence antérieurement *in vitro* (WEBER, 1970, 1972; TOULMOND, 1970) et dont la signification physiologique *in vivo* a été démontrée par ailleurs (TOULMOND, 1973). La valeur absolue du coefficient de Bohr,  $\Delta \log P_{50}/\Delta pH$ , permet une évaluation quantitative de cet effet Bohr. Chez *Arenicola marina*, cette valeur est élevée, comprise entre  $-0,73$  ( $5^{\circ}C$ ) et  $-1,08$  ( $25^{\circ}C$ ). La comparaison statistique de ces deux coefficients montre que leur différence n'est que faiblement significative ( $P = 10\%$ ). On peut en conclure que l'effet de la température sur le coefficient de Bohr est faible chez *Arenicola marina*. Du point de vue adaptatif, un effet Bohr important quelle que soit la température, favorisant la libération de l'oxygène au niveau des tissus, peut être considéré comme avantageux pour une espèce intertidale eurytherme comme l'Arénicole, soumise pendant la marée basse à des périodes anoxiques conduisant à une acidose respiratoire et métabolique (TOULMOND, 1973). On notera que chez des espèces voisines, infralittorales et supposées sténothermes (*Abarenicola claparedei* Levinsen et *Arenicolides branchialis* Audouin et M. Edwards), les valeurs du coefficient de Bohr sont beaucoup plus faibles, de l'ordre de  $-0,30$  (WEBER, 1972).

## 2. ACTION DE LA TEMPÉRATURE SUR L'AFFINITÉ.

L'action directe de la température sur l'affinité est évidente et importante. Lorsque la température augmente, l'affinité du pigment pour l'oxygène diminue, ce qui se manifeste par une translation verticale des droites ( $\log P_{50}$ ) vs ( $pH_{50}$ ) le long de l'axe des ordonnées. On peut quantifier cette action en calculant la chaleur apparente d'oxygénation de la molécule d'hémoglobine,  $\Delta H$ , mesurée à un facteur constant près par la pente de la courbe ( $\log P_{50}$ ) vs ( $T^{-1}$ ) (Fig. 2, 3 et 5). Cette chaleur d'oxygénation est négative, ce qui traduit bien le caractère exothermique de la réaction. Calculées à partir des données obtenues *in vitro*, soit à valeur constante de pH, soit à valeur constante de  $P_{CO_2}$ , et pour les trois intervalles de température considérés (Tabl. II), les valeurs de  $\Delta H$  sont très différentes et comprises entre  $-20,9$  et  $-3,9$  kcal . mole<sup>-1</sup>, valeurs extrêmes. D'après ces données on peut conclure que l'effet de la température sur l'affinité du pigment pour l'oxygène, mesuré *in vitro* sur un échantillon de sang de composition constante, est

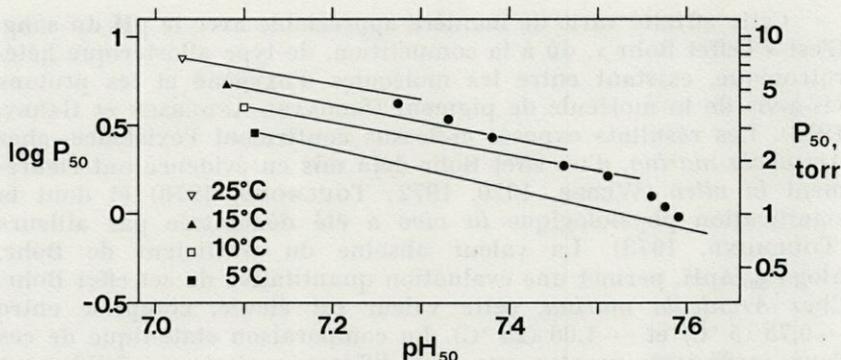


FIG. 4. — Influence de pH sur l'affinité pour l'oxygène ( $P_{50}$ ) de l'hémoglobine d'*Arenicola marina*. Sur la famille de droites de la figure 1 on a reporté les valeurs de  $P_{50}$  mesurées sur le sang d'animaux expérimentalement acclimatés pendant 96 heures (« acclimation température », SCHMIDT-NIELSEN, 1975, p. 283) à diverses températures comprises entre 5,3 (extrême droite) et 25,7 °C (extrême gauche). Mesures effectuées à la température d'acclimation. Pour chaque température, la valeur de  $P_{CO_2}$  dans la phase gazeuse d'équilibration (comprise entre 0,54 et 1,70 torr), est égale à celle qui a été mesurée dans le sang *in vivo* (Tabl. III).

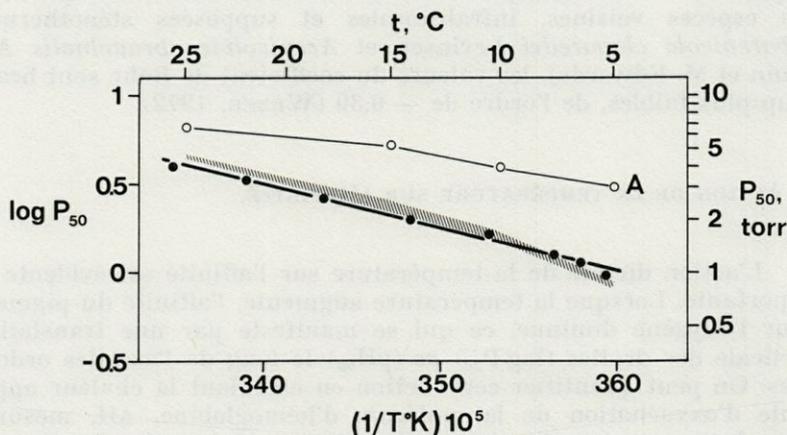


FIG. 5. — Influence de la température sur l'affinité pour l'oxygène ( $P_{50}$ ) de l'hémoglobine d'*Arenicola marina*. Valeurs de  $P_{50}$  mesurées sur le sang d'animaux expérimentalement acclimatés pendant 96 heures (« acclimation température », SCHMIDT-NIELSEN, 1975, p. 283) à diverses températures comprises entre 5,3 et 25,7 °C. Mesures effectuées à la température d'acclimation. Pour chaque point, la valeur de  $P_{CO_2}$  dans la phase gazeuse d'équilibration est égale à celle qui a été mesurée *in vivo* (Tabl. III). La pente de la droite de régression mesure, à une constante près, la valeur moyenne « physiologique » de  $\Delta H$ , chaleur apparente d'oxygénation de la molécule de pigment travaillant, *in vivo*, à valeurs de pH et  $P_{CO_2}$  variables (v. Tabl. III). A titre de comparaison : courbe A : variations de  $P_{50}$  pour pH = 7,1 = constante (Fig. 2); surface hachurée : variations de  $P_{50}$  pour  $P_{CO_2}$  compris entre 0,3 et 2 torr (Fig. 3).

d'autant plus faible *i*) que le pH est plus acide, *ii*) que  $P_{CO_2}$  est plus élevé, *iii*) que la température est plus élevée, cette dernière conclusion étant en contradiction avec les résultats de WEBER (1972) d'après lesquels  $\Delta H$  ne varie pas avec la température ( $\Delta H = -5,3 \text{ kcal} \cdot \text{mole}^{-1}$  entre 5 et 20 °C). Cette discordance n'est cependant pas très surprenante compte tenu de ce que représente  $\Delta H$  et compte tenu de la manière dont ce paramètre est mesuré. Du point de vue thermodynamique,  $\Delta H$  constitue la somme algébrique d'un nombre indéterminé de variables pour la plupart dépendantes et comprenant, non seulement la chaleur réelle d'oxygénation  $\Delta H_0$ , mais aussi la chaleur de dissolution de l'oxygène, les chaleurs d'ionisation des radicaux « oxygen linked » responsables de la libération des protons de Bohr (WYMAN, 1948), les chaleurs d'ionisation des différents systèmes tampons présents dans le milieu et qui vont réagir avec ces protons (ROUGHTON, 1935). Dans le cas de l'hémoglobine d'*Arenicola marina*, ce dernier facteur est peut-être parmi les plus importants, compte tenu du pouvoir tampon particulier de ce pigment (TOULMOND, 1971, 1977 a).  $\Delta H$  apparaît donc comme une somme de variables dont l'importance relative est susceptible de varier en raison de facteurs intrinsèques (origine du pigment) et extrinsèques. En particulier, comme  $\Delta H$  varie avec le pH, il est d'usage de mesurer la chaleur d'oxygénation d'un pigment à pH constant et en l'absence de  $CO_2$ . Malgré ces précautions, la comparaison des chaleurs apparentes d'oxygénation de pigments respiratoires d'origine différente reste très délicate. De plus, la signification physiologique des valeurs ainsi mesurées apparaît assez douteuse. On sait en effet que, chez la plupart des animaux à respiration aquatique, les variations de la température ambiante induisent des changements appréciables du pH sanguin, la pression partielle de  $CO_2$  restant faible et pratiquement constante (RANDALL et CAMERON, 1973; TOULMOND, 1977 b). Dans ces conditions, il nous est apparu utile d'évaluer un  $\Delta H$  fonctionnel, calculé à partir des valeurs mesurées *in vivo* dans le sang d'animaux acclimatés à différentes températures (pH variable et  $P_{CO_2}$  compris entre 0,5 et 1,7 torr, Tabl. III). On trouve alors  $\Delta H = -11,4 \text{ kcal} \cdot \text{mole}^{-1}$ . Cette valeur n'est évidemment comparable à aucune de celles qui sont citées dans la littérature, puisqu'elle est mesurée à pH variable. Par contre, elle s'accorde très logiquement avec les valeurs de  $\Delta H$  trouvées précédemment *in vitro*, lorsque  $P_{CO_2}$  est compris entre 0,3 et 2 torr (Fig. 5). Ces dernières valeurs ont donc en elles-mêmes une signification physiologique qui fait défaut aux valeurs de  $\Delta H$  mesurées à pH constant.

On notera par ailleurs que les valeurs de  $P_{50}$  mesurées *in vivo* sont cohérentes avec celles qui ont été mesurées à diverses températures, *in vitro*, sur le sang d'animaux acclimatés à 15 °C (Fig. 4).

L'acclimatation n'a donc pas d'effet sur l'affinité du pigment respiratoire. Chez l'Arénicole, il semble donc qu'il n'y ait pas de régulation physiologique de cette affinité, contrairement à ce qui a pu être mis en évidence chez le crabe *Carcinus maenas* (TRUCHOT, 1975).

## V. — CONCLUSIONS

Pour remplir efficacement son rôle de transporteur d'oxygène, un pigment respiratoire doit avoir une affinité variable pour ce gaz, telle qu'elle permette à la fois la fixation de l'oxygène au niveau des branchies ou des poumons ( $P_{50}$  minimum) et sa libération au niveau des tissus ( $P_{50}$  maximum). Chez l'Arénicole, les variations de  $P_{50}$  apparaissent uniquement liées à celles du pH, de la température et de la composition en ions du sang. Ce dernier facteur étant considéré comme constant, quelle peut être l'influence du pH et de la température sur le transport de l'oxygène par le sang ?

Lorsque la température augmente, au-dessus d'une température moyenne comprise entre 10 et 15 °C, l'affinité du pigment pour l'oxygène diminue. Aux températures les plus élevées (25 °C), cet effet thermodynamique tend à s'annuler, le phénomène étant renforcé par la chute correspondante du pH sanguin. Cependant, cette même chute du pH a pour effet propre de diminuer l'affinité du pigment. Au total, la fixation de l'oxygène au niveau des branchies est rendue plus difficile. Au contraire, au niveau des tissus, la libération de ce gaz est favorisée, l'effet Bohr étant très important et l'acidose respiratoire et métabolique maximale du fait d'un métabolisme accru.

Inversement, lorsque la température diminue, l'affinité du pigment pour l'oxygène augmente. Le phénomène est accentué par l'augmentation corrélative du pH sanguin. La fixation de l'oxygène au niveau des branchies est donc très favorisée. Aux températures les plus basses (entre 0 et 5 °C), l'affinité devient telle qu'on peut se demander si la libération de l'oxygène au niveau des tissus reste possible. En effet, à ces températures extrêmes, l'acidose doit diminuer considérablement du fait de l'augmentation de la solubilité du  $CO_2$  et du fait de la réduction du métabolisme cellulaire. Dans ces conditions, l'effort Bohr, bien que potentiellement important, peut ne plus être fonctionnel. Le pigment reste alors saturé en oxygène dans toutes les parties du compartiment circulatoire et ne joue plus aucun rôle dans le transport de ce gaz.

Les données qui permettraient de tester ce double schéma sont peu abondantes. L'Arénicole, *Arenicola marina* (L.), est une espèce d'eaux tempérées à froides, très commune sur toutes les côtes de l'Atlantique Nord situées entre le 40° et le 75° parallèle. D'après WELLS (1963), la limite sud de son aire de répartition coïncide avec l'isotherme de 20 °C, température des eaux de surface en été. Cependant, la très forte mortalité qui peut être observée chez des Arénicoles élevées à 25,7 °C n'est pas due à une incapacité du pigment respiratoire à fixer l'oxygène au niveau des branchies : chez les survivants, l'hémoglobine contenue dans le sang prébranchial est saturée à 93 % (TOULMOND, 1977 b). A 15 °C, ce pourcentage varie entre 88 et 91 %, les deux tiers de l'oxygène consommé étant transportés sous forme d'oxyhémoglobine (TOULMOND, 1973, 1975). Par contre, il est possible qu'aux températures plus basses régnant par exemple en hiver dans la partie la plus septentrionale de l'aire de répartition de l'espèce, le pigment ne joue plus aucun rôle dans le transport de l'oxygène. D'après KRÜGER (1964), la demande métabolique en oxygène de l'Arénicole est divisée par quatre lorsque la température passe de 25 à 5 °C. En même temps, la solubilité de l'oxygène dans le sang est multipliée par 1,5. Dans ces conditions, il est possible que l'oxygène transporté du milieu extérieur vers les cellules sous forme dissoute suffise à satisfaire la demande. L'Arénicole illustrerait alors parfaitement l'hypothèse de MANGUM (1976 a) selon laquelle, en l'absence de régulation ventilatoire, circulatoire ou biochimique, les pigments respiratoires des Poïkilothermes aquatiques des régions tempérées ne peuvent fonctionner correctement comme transporteurs d'oxygène que pendant une partie de l'année.

## RÉSUMÉ

L'action du pH et de la température sur l'affinité pour l'oxygène de l'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* a été analysée dans deux situations expérimentales différentes : *i*) situation « *in vitro* », dans laquelle l'affinité a été mesurée dans diverses conditions de température et de pH, sur des fractions aliquotes d'un échantillon unique de sang prébranchial, prélevé chez des animaux naturellement acclimatés à 15-16 °C; *ii*) situation « *in vivo* », dans laquelle l'affinité a été mesurée sur huit échantillons de sang prébranchial prélevés chez des animaux expérimentalement acclimatés à huit températures différentes, les mesures d'affinité étant effectuées aux températures d'acclimatation et aux valeurs de  $P_{CO_2}$  observées *in vivo*.

Les résultats obtenus montrent que l'acclimatation n'a pas d'effet sur l'affinité du pigment. La température n'a que peu d'influence sur l'effet Bohr, qui est important à toutes les températures comprises entre 5 et 25 °C. L'effet propre de la température est par contre modulé par le pH : « *in vitro* », la valeur de  $\Delta H$ , chaleur apparente d'oxygénation de la molécule de pigment, varie considérablement entre 5 et 25 °C, étant d'autant plus élevée que la température considérée est plus basse et que le pH est plus alcalin. Mesurée dans les conditions qui prévalent *in vivo*, c'est-à-dire à  $P_{CO_2}$  faible et constant et à pH variable, la valeur de  $\Delta H$  est de l'ordre de  $-11,4 \text{ kcal. mole}^{-1}$ . L'influence possible des variations de l'affinité du pigment sur le transport de l'oxygène par le sang est analysée en fonction des données obtenues.

#### BIBLIOGRAPHIE

- ASHWORTH, J. H., 1904. *Arenicola* (The lug-worm). *L.M.B.C. Memoirs*, 11 : 1-188.
- ASTRUP, P., 1956. A simple electrometric technique for the determination of carbon dioxide tension in blood and plasma, total content of carbon dioxide in plasma and bicarbonate content in "separated" plasma at a fixed carbon dioxide tension (40 mm Hg). *Scand. J. clin. lab. Invest.*, 8 : 33-43.
- BARCROFT, J. & H. BARCROFT, 1924. The blood pigment of *Arenicola*. *Proc. R. Soc.*, B 96 : 28-42.
- ELIASSEN, E., 1955. The oxygen supply during ebb of *Arenicola marina* in the Danish Waddensea. *Univ. Bergen Arbok. Naturvitensk. Rekke*, 12 : 1-9.
- EVERAARTS, J. M. & R. E. WEBER, 1974. Effects of inorganic anions and cations on oxygen binding of haemoglobin from *Arenicola marina* (Polychaeta). *Comp. Biochem. Physiol.*, 48A : 507-520.
- FLORKIN, M., 1969. Respiratory proteins and oxygen transport. In : *Chemical Zoology*, edited by Florkin, M. & B. T. Scheer. Academic Press, New York and London. Vol. IV : Annelida, Echiura and Sipuncula : 111-134.
- FOX, H. M. & G. VEVERS, 1960. The nature of animal colors. Sidgwick and Jackson, London, 246 p.
- JONES, J. D., 1955. Observations on the respiratory physiology and on the haemoglobin of the polychaete genus *Nephtys* with special reference to *N. hombergii* (Aud. et M. Edw.). *J. exp. Biol.*, 32 : 110-125.
- KRÜGER, F., 1960. Zur Wirkungsweise des Hämoglobins. Versuche an *Arenicola*. *Zool. Anz. (Suppl. Bd)*, 23 : 348-351.

- KRÜGER, F., 1964. Versuche über die Abhängigkeit der Atmung von *Arenicola marina* (Annelides Polychaeta) von Grösse und Temperatur. *Helgoländer wiss. Meeresunters.*, **10** : 38-63.
- MANGUM, C. P., 1976 a. Primitive respiratory adaptations. In : *Adaptation to the Environment : Physiology and Biochemistry of Marine Animals*, edited by Newell, R. C., Butterworths, London, p. 191-278.
- MANGUM, C. P. 1976 b. The oxygenation of hemoglobin in lugworms. *Physiol. Zool.*, **49** : 85-99.
- RAHN, H., REEVES R. B. & B. J. HOWELL, 1974. Intra and extracellular pH as a function of body temperature. *Proc. I.U.P.S. (New Delhi)*, **10** : 56-57.
- RAHN, H., REEVES R. B. & B. J. HOWELL, 1975. Hydrogen ion regulation, temperature and evolution. *Am. Rev. Respir. Disease*, **112** : 165-172.
- RANDALL, D. J. & J. N. CAMERON, 1973. Respiratory control of arterial pH as temperature changes in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Am. J. Physiol.*, **225** : 997-1002.
- ROSSI-FANELLI, A., ANTONINI E. & A. CAPUTO, 1964. Hemoglobin and myoglobin. *Advanc. Protein Chem.*, **19** : 73-222.
- ROUGHTON, F. J. W., 1935. Thermochemistry of the oxygen-hemoglobin reaction. I. Direct measurements of the heat of reaction under various conditions. *Biochem. J.*, **29** : 2604-2621.
- SCHMIDT-NIELSEN, K., 1975. *Animal Physiology. Adaptation and environment*. Cambridge University Press, 699 p.
- SIGGAARD-ANDERSEN, O. & L. GARBY, 1973. The Bohr effect and the Haldane effect. *Scand. J. clin. lab. Invest.*, **31** : 1-8.
- SVEBERG, T. & I. B. ERIKSSON-QUENSEL, 1933. The molecular weight of erythrocrucorin. *J. Am. chem. Soc.*, **55** : 2834-2841.
- TOULMOND, A., 1970. La fixation de l'oxygène par le sang chez l'Arénicole (*Arenicola marina* (L.), Annélide Polychète). *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris*, **270** : 1368-1371.
- TOULMOND, A., 1971. Sur une particularité du pouvoir tampon de l'hémoglobine d'Arénicole (*Arenicola marina* (L.), Annélide Polychète). *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris*, **272** : 3184-3187.
- TOULMOND, A., 1973. Tide-related changes of blood respiratory variables in the lugworm *Arenicola marina* (L.). *Respir. Physiol.*, **19** : 130-144.
- TOULMOND, A., 1975. Blood oxygen transport and metabolism of the confined lugworm *Arenicola marina* (L.). *J. exp. Biol.*, **63** : 647-660.
- TOULMOND, A., 1977 a. Temperature-induced variations of blood acid-base status in the lugworm, *Arenicola marina* (L.) : I. *In vitro* study. *Respir. Physiol.*, **31** : 139-149.
- TOULMOND, A., 1977 b. Temperature-induced variations of blood acid-base status in the lugworm, *Arenicola marina* (L.) : II. *In vivo* study. *Respir. Physiol.*, **31** : 151-160.
- TRUCHOT, J. P., 1975. Factors controlling the *in vitro* and *in vivo* oxygen affinity of the hemocyanin in the crab *Carcinus maenas* (L.). *Respir. Physiol.*, **24** : 173-189.

- WEBER, R. E., 1970. Relations between functional and molecular properties of annelid haemoglobins. Interaction between haems in the haemoglobin of *Arenicola marina* L. *Comp. Biochem, Physiol.*, **35** : 179-189.
- WEBER, R. E., 1972. On the variation in oxygen binding properties of haemoglobins of lugworms (Arenicolidae, Polychaeta). *Proc. II<sup>th</sup> Eur. mar. Biol. Symp. Venice, Italy, October 1970*. Piccin Ed., Padova : 231-243.
- WELLS, G. P., 1963. Barriers and speciation in lugworms (Arenicolidae, Polychaeta). *Publs Syst. Ass.*, **5** : 79-98.
- WELLS, G. P., 1966. The lugworm (*Arenicola*). A study in adaptation. *Neth. J. Sea Res.*, **3** : 294-313.
- WOLVEKAMP, H. P. & M. C. VREEDE, 1941. On the gas binding properties of the blood of the lugworm (*Arenicola marina* L.). *Archs néerl. Physiol.*, **25** : 265-276.
- WYMAN, J., 1948. Heme proteins. *Advanc. Protein Chem.*, **4** : 407-531.
- WYMAN, J., 1964. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin : a second look. *Advanc. Protein Chem.*, **19** : 223-286.

Reçu le 21 novembre 1977.

**Note ajoutée sur épreuves (5 novembre 1980).**

Depuis l'acceptation de notre manuscrit, nous avons eu connaissance de plusieurs résultats nouveaux concernant la valeur de  $\Delta H$ , chaleur apparente d'oxygénation de l'hémoglobine de plusieurs espèces d'Arenicolidés.

MANGUM, C.P., 1978 (Communication personnelle) trouve chez *Arenicola cristata* des valeurs de  $\Delta H$  comprises entre  $-4,9$  et  $-13,3$  kcal. mole<sup>-1</sup> pour des températures comprises entre 6 et 21 °C. D'après ces résultats, la valeur absolue de  $\Delta H$  est d'autant plus élevée que la température est plus basse.

RASMUSSEN, K.K. et R.E. WEBER, 1979, *Ophelia*, **18** : 151-170, confirment les résultats déjà cités de WEBER (1972). D'après ces auteurs, chez *Arenicola marina*,  $\Delta H$  est constant ( $-6$  kcal. mole<sup>-1</sup> entre 5 et 20 °C.

WELLS, R.M.G., 1980 (Communication personnelle) trouve que chez l'espèce néo-zélandaise *Abarenicola affinis*,  $\Delta H$  est constant ( $-8,6$  kcal. mole<sup>-1</sup>) entre 15 et 25 °C.

Tous ces résultats ont été obtenus *in vitro*, à pH constant, et doivent être comparés aux valeurs de  $\Delta H$  que nous avons mesurées dans des conditions similaires (Fig. 2, Tabl. II). Cette comparaison conduit à opposer nos résultats et ceux de MANGUM aux résultats de RASMUSSEN, WEBER et WELLS. Cette opposition est peut-être réelle. Elle peut aussi résulter simplement du fait que RASMUSSEN, WEBER et WELLS donnent une valeur moyenne de  $\Delta H$ , calculée pour un seul intervalle de température. Dans ces conditions,  $\Delta H$  ne peut être que constant, quelle que soit la température, et sa valeur ne peut être que moyenne,

comprise par exemple entre les valeurs extrêmes trouvées par MANGUM ( $-4,9$  et  $-13,3$  kcal. mole $^{-1}$ ) et par nous-même ( $-4,3$  et  $-10,8$  kcal. mole $^{-1}$ ).

En définitive, ces résultats confirment certaines de nos conclusions : 1) il est difficile de comparer des valeurs de  $\Delta H$  mesurées par des auteurs différents; 2) il est hasardeux de déduire de ces valeurs, obtenues *in vitro* et à pH constant, des conclusions d'ordre physiologique et concernant l'influence, *in vivo*, de la température sur le transport de l'oxygène par le pigment respiratoire; 3) de telles conclusions ne peuvent être utilement tirées que de l'analyse de valeurs de  $\Delta H$  mesurées *in vivo*, dans des conditions de pH et  $P_{CO_2}$  physiologiques ou, à la rigueur, de valeurs de  $\Delta H$  mesurées *in vitro* mais à valeur constante et physiologique de  $P_{CO_2}$  (Fig. 5).