

of ^{22}Na entry by methazolamide is 14%. The results agree with the effects of hypercapnia and carbonic anhydrase inhibition on the concentration of cold Na^+ in CSF of *S. acanthias* (Maren, Welliver and Istin, This Bulletin).

1971 #21

pH MEASUREMENT AND BICARBONATE FORMATION IN THE FROG SKIN (*Rana clamitans*)

Michel Istin. Commissariat à l'Energie Atomique, Station Zoologique, Villefranche-sur-mer, France, and Department of Pharmacology and Therapeutics, University of Florida College of Medicine, Gainesville, Florida.

Les amphibiens compensent leurs pertes rénales d'ions à partir du milieu extérieur à travers la peau. Garcia Romeu et col. (J. Gen. Physiol., 53 (1969), 816-835) ont montré que dans la grenouille, la peau "in vivo", absorbe du sodium et du chlore indépendamment, H^+ et HCO_3^- étant échangés respectivement contre du sodium et du chlore. Il devient toutefois difficile d'expliquer dans la peau les échanges ioniques sans la présence d'anhydrase carbonique dont le rôle est suggéré par Motais et Garcia Romeu (dans "Transport mechanisms in the Teleostean gill and amphibian skin," sous presse A.R. Physiology, 1972.). Le manque de succès dans la recherche de cette enzyme pour ce tissu pourrait être dû à des artéfacts expérimentaux, comme cela a été le cas pour la vessie de tortue dans laquelle elle a fini par être décelée (Scott et col., Biochem. Biophys. Acta, 219 (1970), 248-250).

Il a paru intéressant, dans ces conditions, d'approfondir l'étude des mécanismes d'échange des bicarbonates dans la peau de grenouille. Cette étude est restée jusqu'à ce jour imprécise pour deux raisons qui compliquent l'interprétation des résultats. La première est en rapport avec la fonction respiratoire de la peau qui s'ajoute à la fonction d'échanges d'ions. La seconde est liée aux difficultés techniques rencontrées pour déterminer tous les éléments de la réaction d'équilibre du CO_2 et des bicarbonates quand l'on n'a pas accès au pH intracellulaire. Le but de ce travail est la mise au point d'une méthode simple permettant la détermination des pH intracellulaires.

I-Détermination du pH cellulaire moyen, de la concentration des bicarbonates et du CO_2 de la peau de grenouille:

La partie ventrale de la peau d'une grenouille (*Rana Clamitans*) est prélevée, rapidement séchée par tamponnement avec du papier filtre et immédiatement séparée en deux fractions aliquotes. Après pesée, un premier fragment est congelé et placé dans le vide pendant 2 à 3 heures à -20°C . L'autre fraction est plongée dans une solution alcaline ($\text{HONa } .3\text{ N}$, $\text{CNK } 10^{-2}\text{ M}$), puis désagrégée à l'aide d'un broyeur cellulaire. Le CO_2 total qu'elle contient est déterminé sur l'homogenat par la méthode manométrique de Nathelson. Après une cryodessiccation de 2 à 3 heures le premier fragment est traité comme le précédent et la quantité de CO_2 déterminée correspond au CO_2 des bicarbonates du tissu. En effet la basse température maintenue durant la dessiccation est suffisante pour arrêter pratiquement la réaction de décomposition des bicarbonates cellulaires, le CO_2 dissous dans les cellules, diffusant, est entraîné par le vide. Des essais préliminaires ont montré qu'un vide de 2 à 3

heures permettait d'obtenir des résultats reproductibles.

La détermination du CO_2 total par gramme de tissu frais et du CO_2 des bicarbonates permet de calculer par différence la quantité de CO_2 dissoute et ainsi par l'application de l'équation d'Henderson Hasselbach la valeur de pH moyen de la peau. Le résultat obtenu est de $6,65 \pm 0,09$, moyenne pour 8 expériences avec un pK de 6,15 à 20°C .

Les concentrations du tissu en bicarbonates et en CO_2 sont respectivement de 114 ± 9 micro-moles par gramme de poids frais pour le premier et de $44,1 \pm 10$ micromoles par gramme de poids frais pour le second ($n=7$).

Bien qu'aucune valeur du pH cellulaire n'ait été rapportée dans la littérature pour ce tissu, il est permis de penser que le résultat obtenu doit être légèrement inférieur à la valeur vraie. Les concentrations déterminées pour les bicarbonates peuvent être comparées aux 27,8 micro équivalents par centimètre carré de tissu frais rapportés par Smith et col. (Biochim. Biophys. Acta, 225 (1971), 77-88). Dans une deuxième série d'expériences, nous avons trouvé une valeur de $22,3 \pm 1,64$ micro équivalents par centimètre carré de tissu frais ($n=15$). La faible différence observée entre nos résultats et ceux de Smith et col. peuvent s'expliquer par des différences dans l'évaluation de la surface qui reste très imprécise en fonction de la tension exercée sur la peau.

II-Mesure du flux entrant de bicarbonate dans la peau de grenouille:

Seuls des flux unidirectionnels de bicarbonate (marqué au carbone 14) à travers toute la peau ont été mesurés "in vitro" pour la grenouille (Smith et col. *locus cit.*). Reprenant la technique de cryodessiccation qui vient d'être décrite, il a été possible sur différents fragments d'étudier les incorporations de H^{14}CO_3 dans le tissu à partir de la face muqueuse.

Des morceaux de peau de $2,5 \text{ cm}^2$ sont tendus sur des cylindres de plastique. Le tissu est équilibré avec du côté interne une solution saline dont la composition est voisine de celle décrite par Gonzalés et col. (Biochem. Biophys. Acta, 93 (1969), 146-158). La concentration en bicarbonate est de 17 mM et le pH de 8,48. Du côté externe un tampon imidazole (2 mM) à pH 7 est utilisé. Ces solutions sont aérées et renouvelées de 15 minutes en 15 minutes. Après une heure de mise à l'équilibre, la solution baignant le côté interne est remplacée par une solution de même composition dont le bicarbonate a été préalablement marqué par du H^{14}CO_3 . Les fragments de tissu sont alors incubés pendant des temps variables, puis rapidement rincés avec une solution saline, non marquée, à 0°C . Après congélation à -20°C . et traitement par cryodessiccation, les échantillons de tissu sec sont rapidement placés dans une solution alcaline de digestion (NCS Packard) et préparés en vue de la mesure de leur radioactivité par scintillation liquide.

Au pH de 8,48 la solution d'incubation ne contient pratiquement que des bicarbonates, le CO_2 n'intervenant que pour moins de 5%. Ainsi le flux entrant de bicarbonate dans les cellules à partir de la face interne est, pour les 3 premières minutes d'incubation, de $2,8 \text{ micro moles/cm}^2/\text{heure} \pm 0,2$ (moyenne pour 5 déterminations).

L'étude cinétique de ces échanges de bicarbonate a été également effectuée avec des animaux dont les peaux étaient suffisamment grandes pour fournir plusieurs fragments permettant ainsi d'obtenir une courbe complète (fig. 1). Cette figure montre que le bicarbonate a accès à 2 compartiments dont les vitesses de renouvellement moyennes, calculées d'après les deux expériences réalisées selon ce protocole, sont de 4 minutes et de 33 minutes.

III-Action d'un inhibiteur de l'anhydrase carbonique sur l'incorporation des bicarbonates:

Des fragments de peau sont traités suivant la technique déjà décrite, mais en présence d'un

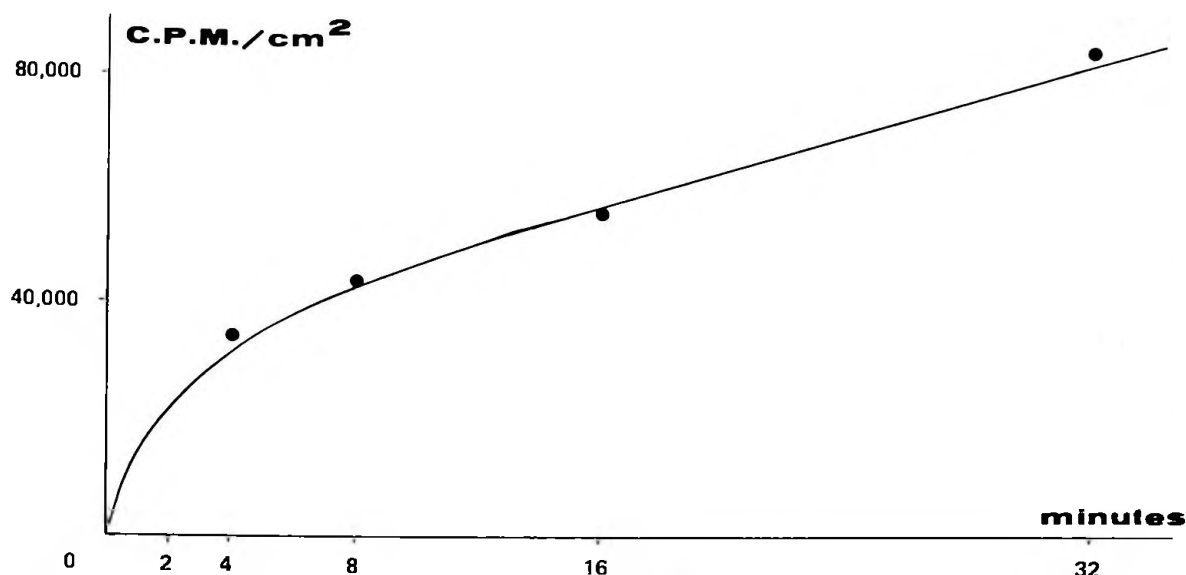


Figure 1: Flux entrant de H^{14}CO_3 dans une peau de grenouille à partir de la face interne. Différents fragments d'une même peau sont incubés pendant des temps variables. La technique spécifique de comptage des bicarbonates est décrite dans le texte. (Temps en minutes, radioactivité en cpm pour une surface de 2 cm^2).

puissant inhibiteur de l'anhydrase carbonique: la methazolamide (concentration 4.10^{-4} M). Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec des fragments non traités (tableau 1).

Tableau 1: Effet de la methazolamide sur l'incorporation de HCO_3^- dans la peau de grenouille. Augmentation relative de la quantité de ^{14}C incorporée par rapport à un fragment de peau témoin (coefficient 1).

Temps d'incubation dans $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$	Coefficient d'augmentation	Nbre d'expériences
3 minutes	1,08	3
8 minutes	1,15	2
15 minutes	1,19	3

L'augmentation de la radioactivité détectée dans les fragments traités par rapport aux témoins peut s'expliquer par la présence d'anhydrase carbonique dans ce tissu épithélial. L'inhibition de l'enzyme en ralentissant l'élimination par le côté externe sous forme de CO_2 , l'excès de bicarbonate se trouvant dans les cellules, entrainerait une augmentation de la radioactivité. Cette hypothèse devra toutefois être confirmée par un plus grand nombre d'expériences.

This work was supported by NIH Grant GM AI 1693.