

Les isoenzymes de l'anhydrase carbonique érythrocytaire des zébus et taurins Baoulé

par R. QUEVAL, L. BAMBARA

Centre de Recherches sur les Trypanosomoses Animales (C.R.T.A.)
B.P. 454, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

Résumé

QUEVAL (R.), BAMBARA (L.). Les isoenzymes de l'anhydrase carbonique érythrocytaire des zébus et taurins Baoulé. Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1984, 37 (N° spécial) : 306-312

Les variants électrophorétiques de l'anhydrase carbonique érythrocytaire ont été analysés chez des taurins de race Baoulé, dans une population locale de zébus, de croisements N'Dama x Baoulé et de métis taurins x zébus au moyen de l'électrophorèse sur acétate de cellulose.

La distribution des phénotypes de l'anhydrase carbonique chez 219 bovins montre 202 types de CA^{SS} et 17 types de CA^{FS}. Le type CA^{FF} n'a pas été rencontré dans la population bovine locale. Les fréquences géniques CA^S sont de 0,9855 pour les taurins Baoulé et de 0,9438 pour les zébus. Du point de vue statistique, ces valeurs sont significativement différentes.

Mots-clés : Isoenzymes - Anhydrase carbonique érythrocytaire - Zébu - Taurin Baoulé.

Summary

QUEVAL (R.), BAMBARA (L.). Erythrocyte carbonic anhydrase isoenzymes of zebu and Baoule taurine cattle. Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1984, 37 (N° spécial) : 306-312

The electrophoretic variants of erythrocyte carbonic anhydrase were studied in Baoule taurine cattle, in a local population of zebu, in N'Dama x Baoule crossings and taurine x zebu crossbred cattle with electrophoresis on cellulosis acetate.

The distribution of the carbonic anhydrase phenotypes in 219 cattle shows 202 types of CA^{SS} and 17 types of CA^{FS}. The CA^{FF} type was not found in the local cattle population. The genic frequencies of CA^S are 0.9855 for Baoule taurine cattle and 0.9438 for the zebu cattle. From the statistical point of view, these values are significantly different.

Key words : Isoenzymes - Erythrocytic carbonic anhydrase - Zebu cattle - Baoule taurine cattle.

1. INTRODUCTION

Une des plus importantes enzymes érythrocytaires, l'anhydrase carbonique (carbonate hydrolase ; E.C.4.2.1.1. ; CA) se comporte non seulement comme une hydrase mais aussi comme une estérase vis-à-vis de certaines substances. Ainsi, cette enzyme exhibe l'activité d'une estérase carboxylique et est spécifiquement inhibée par les sulfonamides telles que l'acétozolamide.

Dans les techniques électrophorétiques, après séparation, l'anhydrase carbonique peut être révélée soit par une simple coloration atypique pour toute protéine (bleu de bromothymol, nigrosine, Ponceau S, Amido - black 10 B), soit par un zymogramme sélectif pour les estérases en faisant appel à de l'alpha et bêta naphthyl acétate comme substrat et au Fast Blue BB ou RR comme colorant.

L'anhydrase carbonique est une protéine de poids moléculaire 30 000 contenant un atome de zinc. Cette enzyme est responsable de l'hydratation réversible du CO_2 : $\text{CO}_2 + \text{H}_2 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ par lequel l'équilibre acido-basique peut se régulariser.

2. TRAVAUX ANTERIEURS

Les différentes formes moléculaires de l'anhydrase carbonique dans les érythrocytes de l'espèce bovine furent l'objet des travaux de SARTORE et al. (11) ; BARBIERI et al. (1) ; KLOSTER et al. (3) ; SOOS (12) ; KRAAY (4) ; MEYER (5) ; SAN KEE et al. (6). De ces investigations, portant sur diverses races bovines et présentant une répartition géographique cosmopolite, résultent de nombreuses données relatives à la fréquence des gènes de l'anhydrase carbonique (tableau n° 1).

Chez les bovins, le contrôle génétique des variants de l'anhydrase carbonique érythrocytaire fut initialement rapporté par SARTORE (7) qui observa 3 phénotypes de l'enzyme en électrophorèse sur gel d'amidon. SARTORE et al. (10) établirent que ces phénotypes sont contrôlés par deux allèles autosomaux codominants CA^F et CA^S ; d'où les 3 phénotypes possibles : FF, FS et SS.

Dans le bétail du Piémont, SARTORE (1970) découvre un nouvel allèle correspondant à une zone unique et migrant juste en dessous du phénotype S. Ce variant fut appelé P ou $\text{S}^{\text{Piémont}}$.

Enfin, dans la race bovine, Aberdeen Angus, SARTORE et al. (1972) trouvent également un autre variant de l'anhydrase carbonique qui migre beaucoup plus rapidement que le phénotype FF et désigné : anhydrase carbonique A ou C (plus usité).

TABL. N°1-Fréquences géniques de l'anhydrase carbonique
dans les races bovines

Races	Pays	Nombre	Fq géniques		Références
			CA ^F	CA ^S	
Aberdeen Angus	USA	114	0,01 - 0,99		SARTORE <i>et al.</i> (1969)
Aosta Red Pied	Italie	116	0,19 - 0,81		SARTORE <i>et al.</i> (1966)
Austrian Spotted	Autriche	41	0,10 - 0,90		SOOS (1972)
Ayrshire	USA	86	0,14 - 0,86		SARTORE <i>et al.</i> (1969)
Brown Swiss	USA	95	0,07 - 0,93		SARTORE <i>et al.</i> (1969)
Brown Swiss	Suisse	92	0,04 - 0,96		SOOS (1972)
Charolais	USA	76	0,38 - 0,63		STORMONT <i>et al.</i> (1972)
Guernsey	USA	352	0,04 - 0,96		SARTORE <i>et al.</i> (1969)
Hereford	USA	408	0,24 - 0,76		SARTORE <i>et al.</i> (1969)
Holstein Friesian	USA	1102	0,20 - 0,80		SARTORE <i>et al.</i> (1969)
Holstein Friesian	Yougoslavie	105	0,14 - 0,86		SOOS (1972)
Hungarian Spotted	Hongrie	890	0,21 - 0,79		SOOS (1972)
Hungarian Grey	Hongrie	158	0,16 - 0,84		SOOS (1972)
Jersey	USA	395	0,41 - 0,59		SARTORE <i>et al.</i> (1969)
Korean cattle	Corée	490	0,094 - 0,906		SANG KEE <i>et al.</i> (1976)
Longhorn	USA	94	0,28 - 0,72		SARTORE <i>et al.</i> (1969)
Polled Hereford	USA	365	0,11 - 0,89		SARTORE <i>et al.</i> (1969)
Simmental	Suisse	92	0,33 - 0,67		SOOS (1972)

CRIMELLA *et al.* (2) rapportent également l'existence d'un nouveau variant se situant entre les bandes S et F. SAN KEE HAN *et al.* (6) identifient une anhydrase carbonique érythrocytaire des bovins coréens dont la localisation se trouve en avant de la bande F et dénommée X. L'allèle S est le plus courant et la fréquence de l'allèle F peut osciller de 0,41 dans la race Jersey à 0,01 chez les bovins de race Aberdeen Angus.

Par la cumulation additive de l'activité dévolue à chaque gène, l'activité de l'enzyme varie d'après les phénotypes. En se référant à une unité fixée arbitrairement, on peut attribuer à chaque allèle les valeurs suivantes d'activité relative S : 3,8 ; F : 2,6 ; S^{Piémont} : 1,3.

3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Equipement

Le matériel comporte :

- un bloc d'alimentation CAMAG DC 67510 à voltage et ampérage constant ;
- une cuve d'électrophorèse universelle CAMAG 81130 ;
- des membranes d'acétate de cellulose "Cellogel" de format 5,7 x 14 cm.

3.2. Réactifs

- Tampon TRIS - EDTA - acide borique de pH 8,8 : TRIS (hydroxyméthyl) aminométhane : 16,1 g ; éthylenediaminetétraacétate disodique : 1,56 g ; acide borique : 0,92 g. Ces réactifs sont dissous dans un volume final de 1,5 litre.

.solution colorante : colorant Ponceau S : 0,5 g dissous dans 100 ml d'acide trichloracétique à 5 p.100 ;

.décolorant : acide acétique à 5 p.100.

3.3. Technique

3.3.1. Préparation des hémolysats

Quatre à cinq millilitres de sang total sont recueillis sur héparine dans des tubes à prélèvement sous vide. Après élimination du plasma et des leucocytes, les érythrocytes sont lavés, 3 fois, dans 3 à 4 volumes d'un soluté de chlorure de sodium à 0,9 p.100 et ensuite lysés par addition de 1 ml d'eau distillée et 0,5 ml de toluène par millilitre de culot globulaire. Le mélange est agité vigoureusement et centrifugé pendant 20 mn à 3 000 t/mn pour éliminer le stroma globulaire.

La préparation de l'enzyme peut être également obtenue par dénaturation de l'hémoglobine contenue dans 5 volumes d'hémolysat non destromatisé par addition ménagée, sous agitation constante, de 4 volumes d'éthanol à 40 p.100 et 2 volumes de chloroforme.

A l'aide d'une spatule, on homogénéise (3 à 5 minutes) jusqu'à l'obtention d'une pâte fluide et l'on laisse reposer 20 à 40 mn. Après une centrifugation de 20 mn à 3 000 t/mn on récolte le surnageant (extrait éthanol - chloroforme : E.C.C.) limpide et coloré plus ou moins en rose. La conservation de cet extrait s'effectue à une température de - 10°C.

3.3.2. Electrophorèse et coloration

Les bandes d'acétate de cellulose imbibées de tampon, essorées et posées dans la cellule, reçoivent à 25 millimètres de leur extrémité, côté cathodique, les échantillons d'hémolysats sous un volume de 2 µl sur 9 millimètres.

La séparation électrophorétique s'effectue dans les conditions expérimentales suivantes : un temps de migration de 75 mn sous un voltage constant de 450 volts.

Après l'électrophorèse, les bandes sont :

- soit colorées par le rouge Ponceau, pendant 5 mn et lavées 3 ou 4 fois, pendant 1

mn, dans un bain d'acide acétique, jusqu'à ce que le fond de la membrane soit décoloré.

- soit révélées par la technique de caractérisation des estérases carboxyliques. Cette méthode utilise comme substrat les esters de bêta naphtyl. Le bêta naphtyl libéré par l'hydrolyse de l'ester se couple avec un sel de diazonium en donnant lieu à la formation d'un colorant azoïque. Pour cela, dissoudre 5 mg d'acétate ou de butyrate d'alpha ou de bêta naphtyl dans 0,5 ml d'acétone et additionner de 25 ml de tampon Tris (pH : 7,2). Il se forme une solution opalescente dans laquelle on dissout directement 10 mg de Fast Blue RR. Après filtration, les membranes de Cellogel sont immédiatement imbibées de la solution révélatrice et incubées à température ambiante jusqu'à l'apparition des bandes. Les zymogrammes sont ensuite lavés et fixés.

4. RESULTATS

La distribution des phénotypes de l'anhydrase carbonique dans les populations de zébus et de taurins (tableau n° II) montre l'absence du phénotype homozygote FF, le faible pourcentage du phénotype hétérozygote FS chez les taurins Baoulé (2,9 p.100) contre 11,2 p.100 dans la population de zébus de type soudanien et enfin une large dominance des phénotypes SS.

TABL. N°II-Distribution des phénotypes de l'anhydrase carbonique dans les races et croisements observés

Races et croisements	Nombre d'animaux	Phénotypes :			χ^2	Probabilité
		SS	SF	FF		
Baoulé	104	101 (100,9)	3 (2,9)	0 (0,0)	0,0035	N.S.
Zébus	89	79 (79,3)	10 (9,4)	0 (0,3)	0,3393	0,5 < P < 0,7
Baoulé x N'Dama	10	10	0	0	-	-
Taurins x Zébus	16	12 (12,25)	4 (3,5)	0 (0,25)	0,3265	0,5 < P < 0,7

Les fréquences géniques calculées des taurins (Baoulé et croisements Baoulé x N'Dama) sont : $CA^F = 0,0132$; $CA^S = 0,9438$ et chez les zébus respectivement de 0,0562 et 0,9438 (tableau n° III).

TABL. N°III-Fréquences alléliques de l'anhydrase carbonique chez les bovins locaux

Races et croisements	Nombre d'animaux	Fréquences alléliques	
		CA^S	CA^F
Baoulé	104	0,9855	0,0145
Zébus	89	0,9438	0,0562
Baoulé x N'Dama	10	1,0000	-
Taurins x Zébus	16	0,8750	0,1250

Les différences entre taurins et zébus sont statistiquement significatives
($\chi^2 = 6,17$; ddl : 1 ; $0,02 < P < 0,05$).

Les fréquences géniques de l'anhydrase carbonique des taurins Baoulé sont comparables à celles observées dans la race Aberdeen Angus (11) avec un test de χ^2 non significatif ($\chi^2 = 0,598$). Par contre, les tests de χ^2 calculés entre les taurins Baoulé et les races bovines Guernesey et Brown Swiss sont significatifs avec une probabilité $P < 0.01$.

Resumen

QUEVAL (R.), BAMBARA (L.). Las isoenzimas de la anhidrasa carbonica eritrocitaria de los cebues y taurinos de raza Baule. Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1984, 37 (N° spécial) : 306-312

Se analizaron los variantes electroforeticos de la anhidrasa carbónica eritrocitaria mediante la electroforesis sobre acetato de celulosa en taurinos de raza Baule, en cebues de raza local, en cruzamientos N'Dama x Baule y en mestizos taurinos x cebues.

La repartición de los fenotipos de la anhidrasa carbónica en 219 bovinos muestra 202 tipos de CA^{SS} y 17 tipos de CA^{FS}. No se encontró el tipo CA^{FF} en los bovinos de raza local. Son de 0,9855 las frecuencias genicas CA^S de los taurinos Baule y de 0,9438 las de los cebues. Desde el punto de vista estadística, estos valores son significativamente diferentes.

Palabras claves : Isoenzimas - Anhidrasa carbónica eritrocitaria - Cebú - Taurino Baule.

Bibliographie

1. BARBIERI (V.), CRIMELLA (C.), ROGNONI (G.), CERUTTI (F.). Preliminary observations on some protein and enzyme polymorphisms in Chiana cattle. Atti Soc. ital. Sci. vet., 1969, 23 : 602-605.
2. CRIMELLA (C.), CARENZI (C.). A new variant of carbonic anhydrase in cattle erythrocytes (Abstract). Anim. Blood Grps biochem. Genet., 1972, 3 (suppl. 1) : 34.
3. KLOSTER (G.), LARSEN (B.), NIELSEN (P.). Carbonic anhydrase polymorphism cattle and swine. Acta Vet. scand., 1970, 11 : 318-321.
4. KRAAY (G.J.). A study of protein and enzyme polymorphism in blood of canadian cattle. Proc. 12th Europ. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorphism, Budapest, 1972. P. 155-158.
5. MEYER (E.H.). Carbonic anhydrase types in beef cattle. Anim. Blood Grps biochem. Genet., 1972, 3 (suppl. 1) : 39.

6. SAN KEE (H.), SUZUKI (S.). Studies on red cell carbonic anhydrases types in Korean cattle. Anim. Blood Grps biochem. Genet., 1976, 7 : 217-223.
7. SARTORE (G.). Studi sulla struttura del locus Es II in bovini. Atti Soc. ital. Sci. vet., 1965, 21 : 228-231.
8. SARTORE (G.). Ricerche su un nuovo polimorfismo genetico riguardante una esterasi degli eritrociti bovini. Atti Ass. Genet. ital., 1966, 11 : 217-222.
9. SARTORE (G.). Carbonic anhydrase types of cattle red cells. Proc. 11th Europ. Anim. Conf. Blood Grps Biochem. Polymorph., Warsaw, 1968. P. 211-216.
10. SARTORE (G.), BERNOCO (D.). Research in biochemical polymorphisms in the indigenous cattle of Piemont. Polymorphismes biochimiques des animaux. Proc. 10th Europ. Animal Blood Grps Conf., Paris, 1966. P. 283-287.
11. SARTORE (G.), STORMONT (C.), MORRIS (B.), GRUNDER (A.). Multiple electrophoretic forms of carbonic anhydrase in red cells of domestic cattle (Bos taurus) and American Buffalo (Bison Bison). Genetics, 1969, 61 : 823-831.
12. SOOS (P.). Carbonic anhydrase polymorphism in some hungarian cattle breeds. XIIth. Europ. Conf. Anim. Blood Grps Biochem. Polymorph., Budapest, 1972. P. 191-195.
13. STORMONT (C.), MORRIS (B.), SUZUKI (Y.). A new phenotype in the carbonic anhydrase system of cattle. Proc. XIIth Europ. Conf. Anim. Blood Grps Biochem. Polymorph, Budapest, 1972. P. 187-189.