

CONTRIBUTION DES ACIDES AMINÉS LIBRES
A LA RÉGULATION OSMOTIQUE INTRACELLULAIRE
CHEZ DEUX CRUSTACÉS EURYHALINS,
LEANDER SERRATUS F. ET LEANDER SQUILLA L.

par

Ch. Jeuniaux, S. Bricteux-Grégoire et Marcel Florkin.

Institut Léon Fredericq, Biochimie, Université de Liège et
Station Biologique de Roscoff.

Résumé.

Chez deux crevettes euryhalines (*Leander serratus* F. et *Leander squilla* L.), sont décrites les variations de concentration des acides aminés libres des tissus au cours de l'adaptation à l'eau saumâtre.

L'abaissement de concentration de certains acides aminés libres intracellulaires (notamment de l'alanine, de la glutamine, du glycocolle et de la proline) contribue au mécanisme de régulation isosmotique intracellulaire, déjà observé chez d'autres Invertébrés euryhalins, possédant ou non une régulation anisosmotique du milieu intérieur.

INTRODUCTION.

On qualifie d'euryhalins les animaux aquatiques capables de tolérer de plus ou moins larges variations de salinité du milieu.

L'un des facteurs de l'euryhalinité est l'existence d'une osmorégulation (régulation anisosmotique) du milieu intérieur par rapport au milieu extérieur. Toutefois cette régulation manque chez des animaux dont l'euryhalinité est cependant évidente, comme c'est le cas, par exemple, pour *Mytilus edulis*, *Arenicola marina* ou *Perinereis cultrifera*.

Lorsque les conditions de salinité du milieu varient tout en restant dans les limites compatibles avec la survie, la teneur en eau des tissus de ces animaux euryhalins ne varie que faiblement, ce qui traduit le maintien de l'équilibre osmotique entre tissus et liquides extracellulaires qu'on a généralement observé chez les Invertébrés (Krogh, 1939 ; Potts, 1952). Le facteur le plus constant dans l'euryhalinité apparaît comme une régulation osmotique cellulaire (régulation osmotique déclanchée par la variation de concentration du milieu intérieur). Cette régulation équilibre la pression osmotique des tissus avec celle du milieu intérieur, et s'oppose plus ou moins efficacement aux mouvements d'eau entre cellules et milieu intérieur à la suite de modifications plus ou moins étendues de ce dernier (Duchâteau et Florkin, 1956 ; Shaw, 1958).

La participation des acides aminés libres à cette régulation intracellulaire a été mise en évidence aussi bien chez des euryhalins sans régulation anisomotique du milieu intérieur comme *Mytilus edulis* (Potts, 1958), *Arenicola marina* (Duchâteau-Bosson, Jeuniaux et Florkin, 1961) ou *Perinereis cultrifera* (Jeuniaux, Duchâteau-Bosson et Florkin, 1961) que chez des animaux euryhalins pourvus de régulation anisomotique du milieu intérieur, tels que *Carcinus maenas* (Duchâteau et Florkin, 1956 ; Shaw, 1958), *Eriocheir sinensis* (Duchâteau et Florkin, 1955) ou *Nereis diversicolor* (Jeuniaux, Duchâteau-Bosson et Florkin, 1961).

La présente étude porte sur la contribution des acides aminés libres intracellulaires à la régulation isomotique intracellulaire, lors du passage de l'eau de mer à l'eau saumâtre, chez deux crevettes pourvues de régulation anisomotique du milieu intérieur : *Leander serratus* F. et *Leander squilla* L.

MÉTHODES

a) Adaptation à l'eau saumâtre.

Les crevettes ont été pêchées dans le port de Roscoff. Tous les individus étudiés étaient sexuellement mûrs, mais de taille moyenne (longueur totale approximative : 60 mm, du rostre au telson). Ils ont été choisis en dehors de la période de mue (stades C₄ et D₀). Dans le cas de *Leander squilla*, tous les individus mis en expérience étaient des femelles grainées ; dans le cas de *L. serratus*, on a utilisé indifféremment des mâles et des femelles non grainées.

L'adaptation à l'eau saumâtre a été réalisée, simultanément pour les deux espèces, dans des conditions propres à assurer une oxygénation et un renouvellement constants de l'eau, ainsi que la réalisation d'une dessalure progressive du milieu. Les mélanges d'eau douce et d'eau de mer ont été préparés dans un grand bac vitré gradué, d'une contenance de 1 500 litres, et renouvelés toutes les 12 heures. Après homogénéisation du mélange, ce bac était raccordé à une série de bacs plus petits (40 litres) où un barbotage d'air comprimé assurait l'oxygénation du liquide. Le mélange oxygéné était alors distribué, au moyen de siphons, aux différents aquariums contenant les animaux (5 crevettes par aquarium contenant environ 1 litre d'eau ; débit : 30 à 40 litres à l'heure).

L'adaptation à l'eau saumâtre a été réalisée en 5 jours, les animaux passant progressivement de l'eau de mer à des mélanges contenant respectivement 70, 60, 50, 40 et enfin 30 parties d'eau de mer pour 100 parties de mélange. Les crevettes ont été conservées dans ce dernier mélange (30 % d'eau de mer) pendant 24 heures avant d'être utilisées (1). Pendant la période d'adaptation à l'eau saumâtre, les crevettes ont été nourries une seule fois, à savoir le 5^e jour.

Un lot de crevettes témoin a été conservé en eau de mer courante pendant le même laps de temps et dans les mêmes conditions d'élevage et d'alimentation.

b) Préparation des extraits.

Chaque crevette a été soigneusement essorée sur papier filtre ; l'abdomen, séparé du céphalothorax, a été débarrassé rapidement de la cuticule,

(1) Une dizaine de crevettes appartenant aux mêmes lots sont demeurées 5 jours supplémentaires dans le mélange à 30 % d'eau de mer, et ont supporté ensuite un retour rapide (endéans 6 heures) à l'eau de mer pure.

de l'épiderme, du tissu musculaire ainsi isolé dans l'eau de mer glacée (témoin) et essoré. Après avoir été essoré sans délai dans un milieu isotonique séjourné pendant 10 minutes, le tissu musculaire totale des manipulations est plongé dans l'eau de mer glacée.

Après refroidissement, le tissu musculaire est centrifugé avec les liquides dans un ballon de verre au moyen d'un mixer à + 1° C contre 10 minutes, l'écume évaporée sur flamme jusqu'à sécher dans un ballon de pyrex.

c) Dosage des acides

Le résidu sec de la portion aliquote est pesé et le total par la méthode de Moore et Stein et traitée par la méthode de Moore et Stein.

Une troisième portion est traitée par la méthode de Moore et Stein. Une troisième portion est traitée par la méthode de Moore et Stein. Une troisième portion est traitée par la méthode de Moore et Stein.

Le dosage des acides aminés ou tels quels, sélectionnés sur deux colonnes d'adsorption aminés neutres et acides, est effectué. Des fractions de 2 ml sont prélevées. Une pression de 150 cm assure un débit à la pression ordinaire. Moore et Stein contiennent une chauffe à 100° pendant 10 minutes. Une troisième portion est traitée par la méthode de Moore et Stein.

Dans la région acide, le réactif habituel. Après l'ajout de la solution jaune, dont l'intensité est mesurée dans les tubes impaires, les résultats ont été multipliés par 2.

A l'exception de la portion obtenue par l'hydrolyse, les valeurs étaient les mêmes que celles obtenues sur les dialysats hydrolysés.

L'augmentation de la teneur en glutamine dans les dialysats est due à la glutamine et de la glutamine portées dans les dialysats entre les valeurs trouvées dans les dialysats hydrolysés.

ette régulation intra-
uryhalins sans régu-
tytilus edulis (Potts,
et Florkin, 1961) ou
Florkin, 1961) que
osmotique du milieu
lorkin, 1956 ; Shaw,
) ou *Nereis diversi-*

acides aminés libres
aire, lors du passage
s pourvues de régu-
rratus r. et *Leander*

de l'épiderme, du tube digestif et du cordon nerveux ventral. La masse musculaire ainsi isolée a été baignée pendant 30 secondes dans de l'eau de mer glacée (témoin) ou dans de l'eau saumâtre (30 % d'eau de mer) glacée. Après avoir été essorés sur papier filtre et pesés, les muscles ont été plongés sans délai dans un petit volume d'eau distillée bouillante, où ils ont séjourné pendant 10 minutes, afin d'inactiver tous les enzymes. La durée totale des manipulations depuis la mise à mort jusqu'au moment où les muscles sont plongés dans l'eau bouillante n'a jamais dépassé 5 minutes.

Après refroidissement, les muscles constituant un même lot (10 masses musculaires abdominales, soit 3 à 4 g de tissus frais) ont été rassemblés avec les liquides dans lesquels ils avaient été ébouillantés, et ont été broyés au moyen d'un mixer. La purée obtenue a été dialysée pendant 24 heures à +1° C contre 10 fois son volume en eau distillée. Le dialysat a été évaporé sur flamme jusqu'à réduction à un volume de 20-30 ml, et transféré dans un ballon de pyrex, où il a été évaporé à sec en étuve à +95° C.

c) Dosage des acides aminés.

Le résidu sec de la dialyse a été repris dans de l'eau distillée et filtré. Une portion aliquote de la solution obtenue a servi au dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl. Une autre portion a été diluée davantage et traitée par la ninhydrine pour doser l'azote aminé total.

scoff. Tous les indi-
e moyenne (longueur
ls ont été choisis en
s le cas de *Leander*
es femelles grainées ;
ent des mâles et des

Une troisième portion aliquote, additionnée d'un volume égal d'acide chlorhydrique concentré, a été chauffée à reflux pendant 24 heures pour hydrolyser l'asparagine et la glutamine. Après hydrolyse, l'acide chlorhydrique a été chassé par évaporation sous pression réduite. Ramené à son volume initial, le dialysat hydrolysé a été congelé et conservé tel quel jusqu'à son utilisation, de même que le dialysat non hydrolysé.

ultanément pour les
une oxygénation et
lisation d'une dessa-
et d'eau de mer ont
une contenance de
homogénéisation du
plus petits (40 litres)
tion du liquide. Le
phons, aux différents
aquarium contenant

Le dosage des acides aminés a été effectué sur les dialysats, hydrolysés ou tels quels, selon la méthode de Moore et Stein par chromatographie sur deux colonnes d'amberlite CG 120, l'une de 150 cm pour les acides aminés neutres et acides, l'autre de 15 cm pour les acides aminés basiques. Des fractions de 2 ml ont été recueillies au moyen d'un collecteur de fractions. Une pression d'azote de 30 cm de mercure exercée sur la colonne de 150 cm assurait un débit convenable. La colonne de 15 cm fonctionnait à la pression ordinaire. Chaque fraction additionnée d'un ml du réactif de Moore et Stein contenant de la ninhydrine et de l'hydrindantine a été chauffée à 100° pendant 15 minutes. La densité optique de la coloration obtenue a été mesurée au spectrophotomètre, à 570 m μ .

5 jours, les animaux
ges contenant respec-
ner pour 100 parties
ce dernier mélange
utilisées (1). Pendant
ont été nourries une

Dans la région acide glutamique-proline, seuls les tubes pairs ont reçu le réactif habituel. Après localisation de la proline qui donne une coloration jaune, dont l'intensité peut être appréciée à 440 m μ , la proline a été dosée dans les tubes impairs au moyen du réactif de Chinard (1952) et les résultats ont été multipliés par deux.

mer courante pendant
d'élevage et d'alimen-

A l'exception de l'asparagine et de la glutamine, les valeurs des concentrations qui ont été portées dans les tableaux I et II sont celles qui ont été obtenues sur les dialysats non hydrolysés. Sauf pour la sérine (détruite en partie par l'hydrolyse), pour l'acide aspartique et l'acide glutamique, ces valeurs étaient les mêmes, aux erreurs de mesure près, que celles obtenues sur les dialysats hydrolysés, ce qui montre l'absence de polypeptides.

papier filtre ; l'abdo-
ement de la cuticule,

L'augmentation des concentrations de l'acide aspartique et de l'acide glutamique dans les dialysats hydrolysés résulte de l'hydrolyse de l'asparagine et de la glutamine. Les concentrations de l'asparagine et de la glutamine portées dans les tableaux I et II ont été calculées par différence entre les valeurs trouvées pour l'acide aspartique et l'acide glutamique dans les dialysats hydrolysés et non hydrolysés.

es lots sont demeurées
e mer, et ont supporté
er pure.

TABLEAU I

Leander serratus F.: variation de concentration des acides aminés intracellulaires au cours de l'adaptation à l'eau saumâtre.

	EAU DE MER		EAU SAUMATRE (30 % d'eau de mer)	
	mg/100 g de tissu frais	mmoles/100 g	mg/100 g de tissu frais	mmoles/100 g
Alanine	150	1.69	23	0.26
Arginine	450	2.58	360	2.07
Acide aspartique	24	0.18	7	0.05
Acide glutamique	47	0.32	16	0.11
Asparagine	18	0.14	tr.	tr.
Glutamine	83	0.56	23	0.16
Glycocolle	840	11.2	710	9.5
Histidine	0	0	0	0
Isoleucine	27	0.21	tr.	tr.
Leucine	44	0.34	tr.	tr.
Lysine	23	0.16	7	0.05
Phénylalanine	tr.	tr.	0	0
Proline	250	2.17	74	0.64
Sérine	58	0.55	13	0.12
Taurine	320	2.56	290	2.32
Thréonine	25	0.21	tr.	tr.
Tyrosine	tr.	tr.	0	0
Valine	43	0.37	tr.	tr.
TOTAL	2402	23.24	1523	15.28

TABLEAU II

Leander squilla L.: variation de concentration des acides aminés intracellulaires au cours de l'adaptation à l'eau saumâtre.

	EAU DE MER		EAU SAUMATRE (30 % d'eau de mer)	
	mg/100 g de tissu frais	mmoles/100 g	mg/100 g de tissu frais	mmoles/100 g
Alanine	70	0.79	56	0.63
Arginine	450	2.58	430	2.47
Acide aspartique	0	0	10	0.08
Acide glutamique	0	0	0	0
Asparagine	30	0.23	10	0.08
Glutamine	190	1.29	97	0.66
Glycocolle	600	8.0	430	5.7
Histidine	0	0	0	0
Isoleucine	tr.	tr.	tr.	tr.
Leucine	tr.	tr.	tr.	tr.
Lysine	13	0.09	10	0.07
Phénylalanine	tr.	tr.	0	0
Proline	340	2.95	260	2.26
Sérine	53	0.50	37	0.35
Taurine	300	2.40	280	2.24
Thréonine	0	0	tr.	tr.
Tyrosine	tr.	tr.	0	0
Valine	tr.	tr.	tr.	tr.
TOTAL	2046	18.83	1620	14.54

Contribution de la c
os

1. - Pression osmotique (1)
2. - Pression osmotique (2)
3. - Teneur en eau du poids frais
4. - Acides aminés libres, en mmol/l frais
5. - Acides aminés libres, en mmol/l
6. - Pression osmotique due aux acides

(1) Exprimée par grades.
(2) Calculée en degrés.
(3) Calculée en degrés.

Contribution de la c
os

1. - Pression osmotique (1)
2. - Pression osmotique (2)
3. - Teneur en eau du poids frais
4. - Acides aminés libres, en mmol/l frais
5. - Acides aminés libres, en mmol/l
6. - Pression osmotique due aux acides

(1) Exprimée par grades.
(2) Calculée en degrés.
(3) Calculée en degrés.

des acides aminés
au saumâtre.

EAU SAUMATRE (30 % d'eau de mer)	
g/100 g tissu frais	mmoles/100 g
23	0.26
360	2.07
7	0.05
16	0.11
tr.	tr.
23	0.16
710	9.5
0	0
tr.	tr.
tr.	tr.
7	0.05
0	0
74	0.64
13	0.12
290	2.32
tr.	tr.
0	0
tr.	tr.
1523	15.28

des acides aminés
au saumâtre.

EAU SAUMATRE (30 % d'eau de mer)	
g/100 g tissu frais	mmoles/100 g
56	0.63
430	2.47
10	0.08
0	0
10	0.08
97	0.66
430	5.7
0	0
tr.	tr.
tr.	tr.
10	0.07
0	0
260	2.26
37	0.35
280	2.24
tr.	tr.
0	0
tr.	tr.
1620	14.54

TABLEAU III

Contribution de la composante amino-acide intracellulaire à la balance osmotique chez *Leander serratus* F.

	EAU DE MER	EAU SAUMATRE (30 % eau de mer)	VARIATION
1. - Pression osmotique du milieu extérieur (1)	- 2°09	- 0°66	1°43
2. - Pression osmotique du milieu intérieur (2)	- 1°7	- 1°1	0°6
3. - Teneur en eau des muscles, en % du poids frais	78.05	79.9	
4. - Acides aminés libres intracellulaires, en mmoles/100 g de tissus frais	23.2	15.3	
5. - Acides aminés libres intracellulaires, en mmoles par litre d'eau	298	191	
6. - Pression osmotique calculée (3), due aux acides aminés libres	- 0°56	- 0°36	0°20

(1) Exprimée par la mesure de l'abaissement cryoscopique, en degrés centigrades.

(2) Calculée en degrés centigrades, d'après Panikkar (1941) et Verwey (1956).

(3) Calculée en degrés centigrades (1 mole = 1°87 C).

TABLEAU IV

Contribution de la composante amino-acide intracellulaire à la balance osmotique, chez *Leander squilla* L.

	EAU DE MER	EAU SAUMATRE (30 % eau de mer)	VARIATION
1. - Pression osmotique du milieu extérieur (1)	- 2°09	- 0°66	1°43
2. - Pression osmotique du milieu intérieur (2)	- 1°50	- 1°17	0°33
3. - Teneur en eau des muscles, en % du poids frais	76.6 %	78.5 %	
4. - Acides aminés libres intracellulaires, en mmoles/100 g de tissus frais	18.8	14.5	
5. - Acides aminés libres intracellulaires, en mmoles par litre d'eau	245	185	
6. - Pression osmotique calculée (3) ..	- 0°46	- 0°35	0°11

(1) Exprimée par la mesure de l'abaissement cryoscopique, en degrés centigrades.

(2) Calculée en degrés centigrades, d'après Panikkar (1941) et Verwey (1956).

(3) Calculée en degrés centigrades (1 mole = 1°87 C).

CONCLUSIONS

Au cours de l'adaptation à l'eau saumâtre, les crevettes euryhalines *Leander serratus* F. et *Leander squilla* L. mettent en jeu non seulement un mécanisme de régulation anisosmotique du milieu intérieur, maintenant ce dernier à une concentration supérieure à celle du milieu extérieur (Panikkar, 1941), mais encore un second mécanisme, l'ajustement de la concentration des tissus à celle du milieu intérieur (régulation isosmotique cellulaire). L'euryhalinité de *L. serratus* et de *L. squilla* relève donc des mêmes mécanismes que ceux qui sont mis en jeu chez d'autres Crustacés euryhalins, tels qu'*Eriocheir sinensis* (Duchâteau et Florkin, 1955); *Carcinus maenas* (Duchâteau et Florkin, 1956; Shaw, 1958) et *Astacus fluviatilis* (Duchâteau-Bosson et Florkin, 1961) et chez l'Annélide *Nereis diversicolor* (Jeuniaux, Duchâteau-Bosson et Florkin, 1961). La régulation isosmotique intracellulaire a été aussi mise en évidence chez des Invertébrés euryhalins sans régulation anisosmotique du milieu intérieur, comme *Mytilus edulis* (Potts, 1958), *Arenicola marina* (Duchâteau-Bosson, Jeuniaux et Florkin, 1961) et *Perinereis cultrifera* (Jeuniaux, Duchâteau-Bosson et Florkin, 1961).

On a donc, chez les Invertébrés euryhalins jusqu'à présent étudiés sous ce rapport, mis en évidence dans tous les cas l'existence de la régulation isosmotique intracellulaire, à laquelle s'ajoute, chez les formes dont l'euryhalinité est le plus étendue, la régulation anisosmotique du milieu intérieur.

Chez les crevettes faisant l'objet du présent travail, la régulation isosmotique intracellulaire est réalisée, au niveau des muscles, à concurrence d'un tiers environ par la diminution de concentration des acides aminés libres. Cet effet osmorégulateur intracellulaire est pour sa plus grande part le résultat des variations de concentration de la glutamine, du glyco-colle et de la proline. Chez *L. serratus*, l'Alanine intervient aussi. La taurine n'exerce d'effet osmorégulateur intracellulaire chez aucune de ces deux espèces. Les acides aminés dont l'intervention est prépondérante dans l'accomplissement de l'effet osmorégulateur intracellulaire appartiennent donc à la liste des acides aminés simples (acide glutamique et glutamine, glyco-colle, proline, alanine) dont l'intervention prépondérante dans l'osmorégulation intracellulaire a déjà été mise en évidence chez d'autres Invertébrés euryhalins (*Carcinus maenas*, Duchâteau, Florkin et Jeuniaux, 1959; *Astacus fluviatilis*, Duchâteau-Bosson et Florkin, 1961; *Nereis diversicolor* et *Perinereis cultrifera*, Jeuniaux, Duchâteau-Bosson et Florkin, 1961; *Arenicola marina*, Duchâteau-Bosson, Jeuniaux et Florkin, 1961).

Summary

The biochemical aspects of adaptation to brackish water (30 p. 100 sea water) have been studied in two species of euryhaline shrimps: *Leander squilla* L. and *Leander serratus* F. A first mechanism, consisting of an anisosmotic regulation of the blood, has been described by Panikkar in these organisms. A variation of osmotic pressure in the external medium, amounting to 1.7°C, brings about a change of only 0.3°C and 0.6°C respectively, in the blood of the two species considered. As shown by the slight change of water content of the muscles, the intracellular osmotic pressure has been approximately adjusted, in these shrimps,

(1) Si cette variation d'hydratation intervenait seule, la teneur en acides aminés libres intracellulaires serait, en mmoles par litre d'eau, de 291 au lieu de 298 pour *Leander serratus* et de 240 au lieu de 246 pour *L. squilla*. La modification de teneur en eau des tissus n'explique donc que 2 à 3 % de la variation de concentration des acides aminés intracellulaires.

to the osmotic pressure of the blood. This isosmotic, intracellular regulation is accomplished for about 1/3 by the variation of concentration of a number of intracellular free amino-acids. The main rôle is played by glutamine, glycine and proline in both species. In *L. serratus* alanine also shows important variations. The mechanism of intracellular osmoregulation by changes of concentration of the amino-acids mentioned, has been observed in all euryhaline Invertebrates studied so far. It appears as a general device of adaptation to changes of concentration of the internal medium, in euryhaline forms.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- CHINARD, F.P., 1952. — *J. biol. Chem.*, 199, pp. 91-95.
- DUCHATEAU, GH. et FLORKIN, M., 1955. — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, 63, pp. 249-251.
- DUCHATEAU, GH. et FLORKIN, M., 1956. — *J. de Physiol.*, 8, p. 520.
- DUCHATEAU-BOSSON, GH. et FLOREIN, M., 1961. — *Comp. Bioch. and Physiol.*, en cours de publication.
- DUCHATEAU, GH., FLORKIN, M. et JEUNIAUX, GH., 1959. — *Arch. internat. Physiol. Bioch.* 67, pp. 489-500.
- DUCHATEAU-BOSSON, GH., JEUNIAUX, GH. et FLORKIN, M., 1961. — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, 69, pp. 30-35.
- JEUNIAUX, GH., DUCHATEAU-BOSSON, GH. et FLORKIN, M., 1961. — *Journ. of Bioch. (Jap.)*, 49, pp. 527-531.
- EROGH, A., 1939. — *Osmotic regulation in aquatic animals*, Camb. Univ. Press.
- PANIKHAR, N.K., 1941. — *J. Mar. Biol. Ass.*, 25, pp. 317-359.
- POTTS, W.T.W., 1952. — *Nature*, 169, p. 834.
- POTTS, W.T.W., 1958. — *J. Exper. Biol.*, 35, pp. 749-764.
- SHAW, J., 1958. — *J. Exper. Biol.*, 35, pp. 920-929.
- VERWEY, J., 1957. — *Année Biol.*, 33, pp. 129-149.