

Reçu le 14 novembre 1963.

1
2
3
4
5
6
7
8

**CONSTITUANTS OSMOTIQUEMENT ACTIFS
DES MUSCLES ADDUCTEURS DE *MYTILUS EDULIS*
ADAPTÉE A L'EAU DE MER OU A L'EAU SAUMÂTRE**

PAR

S BRICTEUX-GRÉGOIRE, Gh. DUCHÂTEAU-BOSSON, Ch. JEUNIAUX
et M. FLORKIN

(Institut Léon Fredericq, Biochimie ; Université de Liège)

9
10
11

Introduction

Chez différents Invertébrés euryhalins, on a pu mettre en évidence l'intervention, soit d'un mécanisme de régulation isosmotique ajustant la pression osmotique intracellulaire à celle du milieu intérieur, soit à la fois d'une régulation anisosmotique maintenant le milieu intérieur à une concentration différente de celle du milieu extérieur et d'une régulation isosmotique ajustant la concentration du milieu intracellulaire.

La régulation isosmotique intracellulaire est plus ou moins étendue et elle évite de manière plus ou moins efficace les modifications de la distribution de l'eau et des électrolytes entre les cellules et le milieu intérieur, modifications qui sont parfois tellement importantes qu'elles peuvent entraîner la mort des espèces sténohalines lors des variations de concentration de leur milieu aquatique.

Le fait que les variations de concentration des acides aminés libres intracellulaires contribuent pour une part plus ou moins importante à la régulation intracellulaire isosmotique, a été mis en évidence chez une série d'Invertébrés euryhalins (Littérature : voir FLORKIN, 1962, 1963).

Bien que poecilosmotique, *Mytilus edulis* est une espèce euryhaline (SCHLIEPER, 1929). Chez *Mytilus edulis*, POTTS (1958) a montré que le passage dans l'eau de mer diluée entraîne une diminution de la valeur globale de la composante amino-acide des fibres des muscles adducteurs et de la concentration de la taurine, la variation d'hydratation des fibres ne rendant

que partiellement com
que l'adaptation des
mâtre (eau de mer à
d'une sortie de Na, d

Le « pattern » de
adducteurs de *Mytil*
SARLET, CAMIEN et F
prédominance du gly
phoarginine dont l'arg
des extraits) de l'al
l'acide aspartique tot

Le présent travail
tions de concentrati
des muscles adducte
à l'eau de mer dilués

a) *Matériel biologique*

Les moules (*Mytil*
(Mer du Nord). Elles
24 heures dans de l'
rience, partagées en
gardé en eau de mer
24 heures, pendant
lot à l'eau saumâtre.
de 24 en 24 heures,
douce contenant res
mer. Les moules de
ou 72 heures dans le
ment aéré et renou

Le sang a été pr
sion osmotique déte
scopique.

Les muscles addu
On ne peut, en effé
musculaires à cont
Les muscles ont ét

**OSMOTIQUEMENT ACTIFS
DE MYTILUS EDULIS
EN L'EAU SAUMÂTRE**

BOSSON, Ch. JEUNIAUX

(Université de Liège)

On a pu mettre en évidence un mécanisme de régulation isosmotique intracellulaire à celle de régulation anisosmotique par une concentration différente de l'eau de mer isosmotique ajustant

Le mécanisme est plus ou moins efficace les modifications des électrolytes entre les conditions qui sont parfois susceptibles d'entraîner la mort des moules à une concentration de leur

La concentration des acides aminés dans le milieu ne part plus ou moins d'un milieu isosmotique, a été étudiée par des osmomètres euryhalins (Litté-

Mytilus edulis est une espèce de moule commune en mer. L'adaptation de *Mytilus edulis* à l'eau de mer diluée entraîne une modification de la composition des électrolytes et de la concentration des acides aminés des fibres ne rendant

que partiellement compte de cette modification. Potts conclut que l'adaptation des fibres musculaires de *Mytilus* à l'eau saumâtre (eau de mer à 50 p. 100) résulte d'une entrée d'eau et d'une sortie de Na, de Cl et d'acides aminés libres.

Le « pattern » de la composante aminoacide des muscles adducteurs de *Mytilus edulis* a été défini par DUCHÂTEAU, SARLET, CAMIEN et FLORKIN (1952). Il est caractérisé par une prédominance du glyco-colle, de l'arginine (y compris la phospho-arginine dont l'arginine est libérée au cours de la préparation des extraits) de l'alanine, de l'acide glutamique total et de l'acide aspartique total.

Le présent travail est consacré à l'étude détaillée des variations de concentration des constituants osmotiquement actifs des muscles adducteurs de *Mytilus edulis* lors de l'adaptation à l'eau de mer diluée deux fois.

Méthodes

a) *Matériel biologique et préparation des extraits.*

Les moules (*Mytilus edulis*) provenaient des parcs d'Ostende (Mer du Nord). Elles ont été conservées, au laboratoire, pendant 24 heures dans de l'eau de mer aérée, puis, pour chaque expérience, partagées en deux lots. Le premier lot (témoin) a été gardé en eau de mer constamment aérée, renouvelée toutes les 24 heures, pendant toute la durée de l'adaptation du second lot à l'eau saumâtre. Les moules du second lot ont été transférées, de 24 en 24 heures, dans des mélanges d'eau de mer et d'eau douce contenant respectivement 75, 60 et 50 parties d'eau de mer. Les moules de ce second lot ont été gardées pendant 48 ou 72 heures dans le dernier mélange (eau de mer 50 %), constamment aéré et renouvelé chaque jour.

Le sang a été prélevé par ponction cardiaque, et sa pression osmotique déterminée par mesure de l'abaissement cryoscopique.

Les muscles adducteurs ont été prélevés dans leur totalité. On ne peut, en effet, y discerner de séparation entre les fibres musculaires à contraction rapide et celles à contraction lente. Les muscles ont été essorés sur papier filtre, baignés pendant

30 secondes dans une solution d'eau de mer isotonique avec le sang, essorés de nouveau et pesés sans délai. Ils ont été ensuite ébouillantés (100° C pendant 10 minutes) et homogénéisés. La purée a été dialysée contre un volume d'eau distillée égal à 10 fois son propre volume. Le dialysat a été hydrolysé à reflux par HCl 6N et utilisé pour le dosage des acides aminés. Un échantillon de muscles a été également prélevé pour la détermination du degré d'hydratation (poids frais et poids sec constant); le muscle sec a été utilisé tel quel pour le dosage des chlorures tandis qu'une portion a servi au dosage des cations, après incinération.

b) *Méthodes analytiques.*

Dosage des acides aminés dialysables et de la taurine : méthode automatique par chromatographie, selon MOORE et STEIN. Les dosages ont porté sur des dialysats hydrolysés, les valeurs relatives à l'acide glutamique et à l'acide aspartique concernent à la fois ces acides et leurs amides (acide glutamique total, acide aspartique total).

Dosage du sodium, du potassium et du calcium : photométrie de flamme.

Dosage des chlorures : méthode de VAN SLYKE (1923).

Mesure de la pression osmotique : mesure de la pression de vapeur (osmomètre *Mechrolab*).

Dosage de l'azote total dialysable : méthode de KJELDAHL appliquée aux dialysats ou aux filtrats trichloracétiques.

Dosage de l'azote aminé dialysable : méthode à la ninhydrine appliquée aux dialysats de purée de muscles ou aux filtrats trichloracétiques.

Dosage de l'oxyde de triméthylamine et de la glyco-colle-bétaïne, voir BRICTEUX-GRÉGOIRE, DUCHÂTEAU-BOSSON, JEUNIAUX et FLORKIN (1962).

Volume relatif de l'espace extracellulaire des muscles adducteurs. POTTS (1958) donne des valeurs de l'« espace d'inuline » en ce qui concerne deux portions différentes d'un adducteur, et, comme les valeurs obtenues par lui diffèrent peu, on peut adopter la moyenne et l'appliquer au muscle total, lequel ne présente pas les portions différentes qu'on observe chez d'autres Lamellibranches.

Les résultats sont r
moules en équilibre a
niques et les constit
deux parts approxi

TABLEAU I. — *Constituants*
maintenue dans l'eau de m
Ca: 32.5 mg p. 100 ml) et d

Δ° C	—2
Cl	258
K	10
Na	119
Ca	3
N total (filtrat trichloracétique)	7
N aminé (<i>idem</i>) (ninhydrine)	3

TABLEAU II. — *C*
de Mytilus edulis dans l'eau

	mg
Eau (p. 100 du poids de tissu frais)	67
Cl	95
K	408
Na	406
Ca	25
Total	

(¹) Ici et dans les tableaux
moyennes des valeurs que d
p. 100; M/2 17.7 p. 100 de l

Résultats

Les résultats sont rassemblés dans les Tableaux I à V. Chez les moules en équilibre avec l'eau de mer, les constituants inorganiques et les constituants azotés dialysables contribuent pour deux parts approximativement équivalentes à la concentration

TABLEAU I. — Constituants inorganiques du plasma sanguin de *Mytilus edulis*, maintenue dans l'eau de mer (M : Δ = -2.27° C, Cl : 2388, K : 57.8, Na : 1132, Ca : 32.5 mg p. 100 ml) et dans l'eau de mer diluée deux fois (M/2 : Δ = -1.15° C)

	mg p. 100 ml				ions-g ou mOsm p. l			
	M		M/2		M		M/2	
Δ° C	-2.05	-2.18	-1.14	-1.34				
Cl	2583	2675	1178	1231	727.6	753.5	331.8	346.8
K	109	100	90.5	86.6	27.9	25.6	23.2	22.2
Na	1194	1375	648	765	519.1	597.8	281.7	332.6
Ca	34.6	34.4	21.0	37.0	8.7	8.6	5.3	9.3
N total (filtrat trichloracétique)	75.9	59.0	112	121.9	54.2	42.1	80.0	87.1
N aminé (<i>idem</i>) (ninhydrine)	38.7	28.3	54.5	57.3	27.6	20.2	38.9	40.9

TABLEAU II. — Constituants inorganiques des fibres musculaires de *Mytilus edulis* dans l'eau de mer (M) et dans l'eau de mer diluée deux fois (M/2)

	mg p. 100 g de tissu frais				mOsm p. kilo d'eau de fibre ⁽¹⁾			
	M		M/2		M		M/2	
Eau (p. 100 du poids de tissu frais)	67.1	72.5	81.8	78.7				
Cl	951.6	933.3	366.6	327.7	307.3	252.8	82.1	67.8
K	408.7	421.9	290.3	293.3	192.1	183.9	105.6	111.3
Na	406.5	512.1	288.7	212.1	191.4	225.4	125.9	70.7
Ca	25.3	19.2	11.9	8.5	9.6	6.0	3.3	1.3
Total					700.4	668.1	316.9	251.1
					Moy.:	684.2	Moy.:	284.0

⁽¹⁾ Ici et dans les tableaux suivants, le calcul a été effectué en utilisant les moyennes des valeurs que donne PORTS (1958) pour l'« espace d'inuline » (M : 21.9 p. 100 ; M/2 17.7 p. 100 de l'eau totale).

osmolaire intracellulaire des muscles adducteurs (la somme des valeurs obtenues pour ces deux catégories de constituants rendant compte de la pression osmotique totale).

L'azote dialysable total correspond à la somme des atomes d'azote, de la bêtaïne, de la taurine et de l'azote aminé. Les acides aminés dosés correspondent seulement à 227 mOsm par kilo d'eau, tandis que l'azote aminé dosé par la ninhydrine correspond à 433 mOsm par kilo d'eau. Le « pattern » des acides aminés libres dosés correspond bien à celui que DUCHÂTEAU, SARLET, CAMIEN et FLORKIN (1952) ont observé. La taurine et la glycocolle-bêtaïne sont des constituants osmotiquement importants, tandis que l'oxyde de triméthylamine n'a pu être mis en évidence.

TABLEAU III. — Constituants azotés dialysables des muscles de *Mytilus edulis* maintenue dans l'eau de mer (M) et dans l'eau de mer diluée deux fois (M/2)

	mg p. 100 g de tissu frais		mOsm p. litre d'eau totale		mOsm p. kilo d'eau de fibre	
	M	M/2	M	M/2	M	M/2
Alanine	164	116	24.6	16.2	31.5	19.7
Arginine	208	146	15.9	10.4	20.4	12.6
Ac. aspartique total	130	23	13.1	2.1	16.8	2.6
Ac. glutamique total	144	156	13.1	13.1	16.8	15.9
Glycocolle	464	138	82.7	22.8	105.9	27.7
Histidine	28	19	2.4	1.5	3.1	1.8
Isoleucine	4.0	5.1	0.41	0.48	0.5	0.6
Leucine	6.1	7.8	0.63	0.74	0.8	0.9
Lysine	41	25	3.8	2.1	4.9	2.6
Phénylalanine	8.4	4.7	0.68	0.35	0.9	0.4
Proline	36	16	4.1	1.7	5.2	2.1
Sérine	63	32	8.0	3.8	10.2	4.6
Thréonine	52	23	5.9	2.4	7.6	2.9
Tyrosine	14	8.7	1.0	0.6	1.3	0.7
Valine	11	5.9	1.2	0.62	1.5	0.7
Total	1373.5	726.2	177.5	78.9	227.4	95.8
Taurine	727	557	77.7	55.2	99.5	67.1
Oxyde de triméthylamine ...	0	0	0	0	0	0
Bêtaïne	737	475.7	84.32	50.37	108	61.2
N dialysable total	541	325	518.0	288.0	663.2	349.9
N aminé dialysable (ninhy- drine)	353	196	337.9	173.7	432.7	211.1
Eau %	74.6	80.6				

TABLEAU IV. — Modification de Na, Cl et des acides aminés edulés de l'eau de mer à l'eau de mer diluée expliquée

1. Acides aminés dialysables	
Alanine	
Arginine	
Ac. aspartique total	
Ac. glutamique total	
Glycocolle	
Histidine	
Isoleucine	
Leucine	
Lysine	
Phénylalanine	
Proline	
Sérine	
Thréonine	
Tyrosine	
Valine	
Total	
2. Taurine	
3. Bêtaïne	
4. N aminé dialysable	
5. N dialysable total	
6. Cl (*)	
7. K (*)	
8. Na (*)	
Somme de 1, 2, 3, 6, 7	

Variation calculée à partir de la valeur du Δ :
 $(2.27 - 1.15) \times 1000 = 1.12$
 1.87

(*) Les valeurs indiquées

TABLEAU V. — Constituants inorganiques des fibres musculaires

Constituants inorganiques
 N dialysable total

Somme

Δ calc.

Δ de l'eau extérieu...

N dialysable total

1. Oxyde de triméthylamine

2. Bêtaïne

3. Taurine

4. Ac. aminés dialysables

5. Glycocolle

6. N aminé (ninhydrine)

Total de 2, 3 et 4

Total de 2, 3 et 6

et al.

ducteurs (la somme des catégories de constituants totale).

à la somme des atomes d'azote aminé. Les résultats sont présentés à 227 mOsm par litre dosé par la ninhydrine. Le « pattern » des acides aminés est celui que DUCHÂTEAU, 1963, a observé. La taurine et les autres constituants osmotiquement actifs de la triméthylamine n'a pu être

des muscles de *Mytilus edulis* de mer diluée deux fois (M/2)

mOsm p. litre d'eau totale		mOsm p. kilo d'eau de fibre	
M	M/2	M	M/2
24.6	16.2	31.5	19.7
15.9	10.4	20.4	12.6
13.1	2.1	16.8	2.6
13.1	13.1	16.8	15.9
82.7	22.8	105.9	27.7
2.4	1.5	3.1	1.8
0.41	0.48	0.5	0.6
0.63	0.74	0.8	0.9
3.8	2.1	4.9	2.6
0.68	0.35	0.9	0.4
4.1	1.7	5.2	2.1
8.0	3.8	10.2	4.6
5.9	2.4	7.6	2.9
1.0	0.6	1.3	0.7
1.2	0.62	1.5	0.7
77.5	78.9	227.4	95.8
77.7	55.2	99.5	67.1
0	0	0	0
84.32	50.37	108	61.2
118.0	288.0	663.2	349.9
337.9	173.7	432.7	211.1

TABLEAU IV. — Modifications de concentrations (mOsm p. kilo d'eau de fibre) de K, Na, Cl et des acides aminés libres des fibres musculaires lors du passage de *Mytilus edulis* de l'eau de mer à l'eau de mer diluée deux fois et portions expliquées et non expliquées par l'augmentation d'hydratation

	Modification observée	Modification due à l'hydratation	Modification non expliquée par l'hydratation
1. Acides aminés dialysables			
Alanine	11.8	3.8	8.0
Arginine	7.7	2.4	5.3
Ac. aspartique total	14.2	2.0	12.2
Ac. glutamique total	0.8	2.0	-1.2
Glycocolle	78.2	12.9	65.3
Histidine	1.2	0.4	0.8
Isoleucine	0	0	0
Leucine	0	0	0
Lysine	2.3	0.6	1.7
Phénylalanine	0.4	0.2	0.2
Proline	3.2	0.6	2.6
Sérine	5.6	1.2	4.4
Thréonine	4.6	0.9	3.7
Tyrosine	0.5	0.1	0.4
Valine	0.8	0.1	0.7
Total	131.3	27.2	104.1
2. Taurine	32.4	12.1	20.3
3. Bétaïne	46.8	13.1	33.7
4. N aminé dialysable	221.6	52.7	168.9
5. N dialysable total	313.3	80.7	232.6
6. Cl (*)	205.1	48.8	156.3
7. K (*)	79.6	32.8	46.8
8. Na (*)	110.1	36.3	73.8
Somme de 1, 2, 3, 6, 7 et 8	605.3		436.0
			(71.9 p. 100 de la modification observée).
Variation calculée à partir des valeurs du Δ :			
	$(2.27 - 1.15) \times 1000$	599	
	1.87		

(*) Les valeurs indiquées ici sont celles qui figurent dans le tableau II.

TABLEAU V. — Constituants osmotiquement actifs (mOsm p. kilo d'eau de fibre) des fibres musculaires de *Mytilus edulis* maintenue dans l'eau de mer (M) et dans l'eau de mer diluée (M/2)

	M	M/2	Différence
Constituants inorganiques	684.2	284.0	395
N dialysable total	663.2	349.9	313
Somme	1347.4	633.9	
Δ calc.	2.52	1.19	
Δ de l'eau extérieure	2.27	1.15	
N dialysable total	663.2	349.9	313
1. Oxyde de triméthylamine	0	0	0
2. Bétaïne	108	61	47
3. Taurine	99	67	32
4. Ac. aminés dialysables dosés	227	96	131
5. Glycocolle	106	28	78
6. N aminé (ninhydrine)	433	211	222
Total de 2, 3 et 4	434	224	210
Total de 2, 3 et 6	640	339	301

Conclusions

Les constituants osmotiquement actifs des fibres des muscles adducteurs ont été déterminés chez *Mytilus edulis* adaptée à l'eau de mer et à l'eau de mer diluée deux fois. La somme des constituants organiques et des constituants inorganiques dosés rend compte, dans les deux cas, de la totalité de la composante osmotiquement active.

Quand les moules sont transférées de l'eau de mer à l'eau saumâtre (eau de mer à 50 p. 100) la composante osmotiquement active du muscle s'abaisse à un niveau qui, en dépit de la forte diminution de la concentration du sang, empêche que le degré d'hydratation cellulaire soit modifié dans la même proportion. Le faible changement d'hydratation ne rend nullement compte des variations de concentration intracellulaire d'une série de constituants osmotiquement actifs (régulation isosmotique intracellulaire). Parmi ces derniers, le sodium, le chlorure, le glyco-colle, la glycocolle-bétaïne et la taurine sont ceux dont la contribution à l'ajustement apparaît comme la plus importante.

Quand la moule est adaptée à l'eau saumâtre, la régulation isosmotique intracellulaire s'accomplit, comme Potts (1958) l'avait déjà noté, par une légère modification d'hydratation et surtout par une diminution de concentration du sodium, du chlorure et des acides aminés. La réduction globale, en ce qui concerne l'azote dialysable, correspond à 313 mOsm par kilo d'eau de fibre. L'azote aminé y contribue pour 222 mOsm, la glycocolle-bétaïne pour 47 mOsm et la taurine pour 32 mOsm (total 301 mOsm). Les acides aminés dosés rendent compte d'une diminution de concentration de 131 mOsm (en faible partie seulement expliquée par l'augmentation d'hydratation). Le glyco-colle, à lui seul, subit une réduction de 78 mOsm par kilo et il apparaît donc comme étant, parmi les acides aminés dosés, l'osmo-régulateur le plus important; sa variation dépasse celles de la taurine et de la bétaïne.

Comme le montre le tableau I, l'adaptation à l'eau saumâtre entraîne dans le plasma sanguin une élévation de la concentration de l'azote non protéique et de l'azote aminé, l'augmentation de la concentration de ce dernier correspondant approximativement à 50 % de celle de l'azote non protéique.

- BRICTEUX-GRÉGOIRE, S., (1962). — *Arch. internat. Physiol. Biophys.*
 DUCHÂTEAU, GH., SARLÉ, J. (1962). — *Arch. internat. Physiol. Biophys.*
 FLORKIN, M. (1962). — *Arch. internat. Physiol. Biophys.*
 FLORKIN, M. (1963). — *Arch. internat. Physiol. Biophys.*
 POTTS, W. T. W. (1958). — *J. Physiol. (Lond.)*
 SCHLIEPER, C. (1929). — *J. Physiol. (Lond.)*
 VAN SLYKE, D. D. (1929). — *J. Physiol. (Lond.)*

BIBLIOGRAPHIE

- BRICTEUX-GRÉGOIRE, S., DUCHÂTEAU-BOSSON, GH., JEUNIAUX, CH. et FLORKIN, M. (1962). — *Arch. internat. Physiol.*, **70**, 273.
- DUCHÂTEAU, GH., SARLET, H., CAMIEN, M. N. et FLORKIN, M. (1952). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **60**, 124.
- FLORKIN, M. (1962). — *Bull. Cl. des Sci. Acad. Roy. de Belgique*, **48**, 687.
- FLORKIN, M. (1963). — *Bull. Soc. Chim. Biol., Paris.*, **45**, 653.
- POTTS, W. T. W. (1958). — *J. exp. Biol.*, **35**, 749.
- SCHLIEPER, C. (1929). — *Z. vergl. Physiol.*, **9**, 478.
- VAN SLYKE, D. D. (1923). — *J. biol. Chem.*, **58**, 529.

des fibres des muscles
Mytilus edulis adaptée à
eux fois. La somme des
ants inorganiques dosés
otalité de la composante

de l'eau de mer à l'eau
posante osmotiquement
qui, en dépit de la forte
g, empêche que le degré
ns la même proportion.
rend nullement compte
ellulaire d'une série de
lation isosmotique intra-
m, le chlorure, le glyco-
sont ceux dont la contri-
la plus importante.

saumâtre, la régulation
, comme Potts (1958)
ication d'hydratation et
hydratation du sodium, du
ction globale, en ce qui
l à 313 mOsm par kilo
ribue pour 222 mOsm,
a taurine pour 32 mOsm
és rendent compte d'une
mOsm (en faible partie
ion d'hydratation). Le
on de 78 mOsm par kilo
i les acides aminés dosés,
variation dépasse celles

ptation à l'eau saumâtre
évation de la concentra-
te aminé, l'augmentation
pondant approximative-
rotéique.