

RÉGULATION OSMOTIQUE INTRACELLULAIRE CHEZ *ASTERIAS RUBENS* L. RÔLE DU GLYCOCOLLE ET DE LA TAURINE

par

Ch. Jeuniaux, S. Bricteux-Grégoire * et M. Florkin

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

Résumé

Chez *Asterias rubens* L. (de la Manche) sont étudiées les variations de concentration des acides aminés et de la taurine libres des caecums gastriques au cours de l'adaptation à l'eau saumâtre (60 p. 100 d'eau de mer). L'abaissement de concentration du glycolle et de la taurine joue un rôle important dans le mécanisme de régulation isosmotique intracellulaire.

INTRODUCTION

Nous avons mis en évidence un mécanisme d'ajustement intracellulaire de la pression osmotique chez divers Invertébrés euryhalins, tels des Crustacés (Duchâteau et Florkin, 1955 ; Duchâteau et Florkin, 1956 ; Duchâteau, Florkin et Jeuniaux, 1959 ; Duchâteau-Bosson et Florkin, 1961 ; Jeuniaux, Bricteux-Grégoire et Florkin, 1961) ou des Annélides (Duchâteau-Bosson, Jeuniaux et Florkin, 1961 ; Jeuniaux, Duchâteau-Bosson et Florkin, 1961). Outre ce mécanisme, on observe chez certains Invertébrés euryhalins une régulation anisosmotique, qui maintient la concentration du milieu intérieur à une valeur différente de celle du milieu extérieur. C'est à la nouvelle valeur établie dans le nouveau milieu intérieur que, dans ces cas, la pression osmotique est ajustée par la régulation intracellulaire.

Les populations d'*Asterias rubens* vivant dans la Baltique s'étendent, vers l'Est, jusqu'à l'île Rugen au voisinage de laquelle la salinité est de 8 p. 1 000 seulement (Brattström, 1941 ; Segerstråle, 1949 ; Schlieper, 1957), tandis que dans la mer du Nord, les populations d'*Asterias rubens* n'ont pas été trouvées dans des eaux de salinité inférieure à 28,7 p. 1 000.

Binyon (1961) a montré que les animaux de la mer du Nord peuvent tolérer, pendant un temps limité, une dessalure allant jusqu'à 23 p. 1 000. La différence d'euryhalinité entre les *Asterias rubens* de la Baltique et celles de la mer du Nord suggère l'existence de « races physiologiques ».

(*) Chercheur agréé. Institut Interuniversitaire des Sciences Nucléaires.

La présente étude porte sur des individus d'*Asterias rubens* vivant dans la Manche.

MÉTHODES

Adaptation à l'eau saumâtre

Les étoiles de mer ont été récoltées sur des moulières des côtes de la Manche, à Locquirec (Finistère), et ramenées sans délai au laboratoire de Roscoff, où elles ont été conservées pendant 24 heures en aquarium d'eau de mer. Pendant cette période, elles ont pu se nourrir de moules, à satiété.

Six individus de taille moyenne (longueur approximative des bras : 6 à 9 cm) ont été adaptés à l'eau saumâtre, dans des conditions propres à assurer une oxygénation et un renouvellement constants de l'eau, ainsi qu'une dessalure progressive. Des mélanges d'eau de mer et d'eau douce ont été préparés dans un réservoir d'une contenance de 1.500 litres, et renouvelés deux fois par jour. Après homogénéisation, le mélange d'eau était acheminé, au moyen de siphons, dans des récipients de moindre dimension où un barbotage ininterrompu d'air comprimé assurait l'oxygénation du milieu. La distribution du milieu oxygéné aux différents aquariums contenant les étoiles de mer était réalisé par un système de siphons. Chaque individu disposait d'un volume d'eau d'un litre environ ; le débit d'eau, pour chaque aquarium, était de 30 à 40 litres à l'heure.

L'adaptation à l'eau saumâtre a été réalisée par paliers successifs, les animaux passant progressivement de l'eau de mer à des mélanges contenant respectivement 70, 65 et 60 parties d'eau de mer pour 100 parties de mélange. Cette adaptation a été réalisée en 3 jours ; les étoiles de mer ont été conservées dans le dernier milieu (60 % d'eau de mer) pendant deux jours, avant le prélèvement des tissus et des liquides périscéraux. Les étoiles de mer n'ont reçu aucune nourriture pendant toute cette période d'adaptation.

Six individus de même taille et provenant du même lot ont été conservés en eau de mer courante, privés de nourriture, pendant le même laps de temps, et dans les mêmes conditions de température, d'éclairage et d'aération que les animaux en expérience.

Préparation des extraits

Chaque lot a été constitué par 3 paires de caecums gastriques de quatre individus, ce qui représente entre 13,3 et 16,2 g de tissus frais. Chaque étoile de mer a été essorée dans une serviette éponge. On a sectionné l'extrémité d'un rayon pour recueillir le liquide périscéral, qui a été congelé aussitôt après le prélèvement. Après avoir découpé et rabattu la portion supérieure du tégument de chaque rayon, on a sectionné les caecums gastriques, et on les a lavés par agitation pen-

nant 30 secondes dans un mélange d'eau distillée et d'eau de mer, isotonique avec le liquide périviscéral maintenu à 0° C (bain de glace pilée). Les caecums gastriques ont ensuite été essorés sur papier filtre et déposés sur un verre de montre taré, pour détermination du poids frais. Aussitôt après la pesée, les tissus isolés ont été ébouillantés dans un volume connu d'eau bouillante, où ils ont séjourné pendant 10 minutes, afin d'obtenir une inactivation complète des enzymes. La durée totale des manipulations, depuis l'ablation des caecums jusqu'à leur plongée dans l'eau bouillante, n'a jamais excédé 5 minutes.

Après refroidissement, les caecums, rassemblés avec les liquides dans lesquels ils avaient été ébouillantés, ont été homogénéisés au moyen d'un « Waring blender ». L'homogénat (volume : 170 ml) a été dialysé pendant 24 heures à + 1° C contre 10 fois son volume en eau distillée. Après évaporation sur flamme jusqu'à réduction du volume à 25 ml, le dialysat a été transféré dans un ballon de pyrex, où il a été évaporé à sec à \pm 95° C.

Dosage des acides aminés et de la taurine

Le résidu sec a été repris dans de l'eau distillée, et filtré. Une portion aliquote a servi au dosage de l'azote total (Kjeldahl). L'azote aminé a été dosé par la ninhydrine sur une autre portion aliquote, préalablement diluée. 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. L'acide chlorhydrique a été ensuite éliminé par évaporation sous pression réduite. Le dialysat hydrolysé a été ramené à son volume initial, congelé et conservé tel quel jusqu'à son utilisation, de même que le dialysat non hydrolysé. Le dosage des acides aminés, sur les dialysats hydrolysés ou tels quels, a été effectué par 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 ou acides, l'autre de 15 cm pour les acides aminés basiques.

Des fractions de 2 ml ont été recueillies au moyen d'un collecteur. Une pression d'azote de 30 cm de mercure exercée sur la colonne de 150 cm, assurait son débit. Chaque fraction, additionnée d'un ml de 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 solution colorée a été mesurée au moyen d'un spectrophotomètre, à 570 m μ . L'absence de proline, qui donne une coloration jaune avec la ninhydrine, a été constatée en mesurant à 440 m μ la densité optique des fractions situées dans la région acide glutamique-proline.

Les valeurs qu'on trouvera dans le Tableau I ont été obtenues sur les dialysats non hydrolysés, sauf en ce qui concerne l'asparagine et la glutamine, dont les concentrations ont été obtenues par différence entre les valeurs trouvées pour l'acide glutamique et l'acide aspartique dans les dialysats hydrolysés et dans les dialysats non hydrolysés.

TABLEAU 1

Caecums gastriques d'*Asterias rubens* L.

Variations de concentration des acides aminés et de la taurine libres, au cours de l'adaptation à l'eau saumâtre.

	EAU DE MER		EAU SAUMATRE (60 pour 100 d'eau de mer)	
	mg pour 100 g de tissu frais	millimoles pour 100 g de tissu frais	mg pour 100 g de tissu frais	millimoles pour 100 g de tissu frais
Alanine	15	0.17	—	—
Arginine	23	0.13	17	0.10
Acide aspartique	15	0.11	7	0.05
Acide glutamique	20	0.14	25	0.17
Asparagine	10	0.08	14	0.11
Glutamine	33	0.23	16	0.11
Glycocolle	1300	17.3	710	9.5
Histidine	0	0	0	0
Isoleucine	tr.	tr.	tr.	tr.
Leucine	tr.	tr.	tr.	tr.
Lysine	tr.	tr.	tr.	tr.
Phénylalanine	tr.	tr.	tr.	tr.
Proline	0	0	0	0
Sérine	tr.	tr.	tr.	tr.
Taurine	490	3.9	280	2.2
Thréonine	tr.	tr.	tr.	tr.
Tyrosine	tr.	tr.	tr.	tr.
Valine	tr.	tr.	tr.	tr.
Total		22.1		12.24
Azote non protéique total	490	35.0	330	23.6
Azote non protéique non expliqué		12.9		11.4

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. — Comportement des étoiles de mer
au cours de l'adaptation à l'eau saumâtre

Au cours du passage de l'eau de mer à l'eau saumâtre contenant 75 % d'eau de mer, les étoiles de mer gonflent et deviennent plus turgescentes, ce qui confirme les observations de Binyon (1961) sur l'augmentation du volume et du poids total des *Asterias* dans l'eau de mer diluée. Au cours des trois journées pendant lesquelles le milieu extérieur a été progressivement dilué, les étoiles de mer ont manifesté un ralentissement marqué de leur activité ; elles ne se sont pratiquement pas déplacées, et le mouvement des ambulacres, sans être complètement arrêté, était beaucoup plus lent que chez les témoins.

Au cours des deux derniers jours d'expérience, pendant lesquels la salinité du milieu n'a plus été modifiée (60 % d'eau de mer), l'activité des ambulacres est redevenue normale, et les étoiles de mer ont repris leurs déplacements dans les aquariums. La turgescence des téguments avait, dans le même temps, fortement diminué.

Deux étoiles de mer, conservées pendant 8 jours dans de l'eau saumâtre (60 % d'eau de mer), ont montré une activité normale ; elles ont ensuite été réadaptées à l'eau de mer, sans dommage apparent.

2. — Mécanisme de l'euryhalinité

Comme Binyon (1961) l'a observé chez *Asterias rubens* vivant dans la mer du Nord, l'abaissement cryoscopique des liquides périviscéraux de nos animaux est identique à celui du milieu extérieur, que ce dernier soit de l'eau de mer ou de l'eau saumâtre : il n'existe pas de régulation anisosmotique du milieu intérieur (Tableau II).

TABLEAU 2

Contribution des acides aminés et de la taurine libres à la balance osmotique au niveau des caecums gastriques d'*Asterias rubens*.

	EAU DE MER	EAU SAUMÂTRE (60 p. 100 d'eau de mer)	VARIATION
1. Pression osmotique du milieu extérieur, mesurée par l'abaissement cryoscopique	— 2°09	— 1°23	0°86
2. Pression osmotique du milieu intérieur (liquides périviscéraux)	— 2°12	— 1°24	0°88
3. Eau du tissu, p. 100 du poids de tissu frais	68	72	4 p. 100
4. Millimoles d'acides aminés et de taurine libres p. 100 g de tissu frais	22.1	12.2	9.9
5. Millimoles d'acides aminés et de taurine par litre d'eau	320	170 (1)	150
6. Pression osmotique due aux acides aminés dosés et à la taurine (calculée : 1 mole = —1°87 C)	— 0°6	— 0°32	0°28
7. Pression osmotique due aux substances azotées autres que les acides aminés dosés et la taurine	— 0°35	— 0°30	0°05

Cependant, le tissu des caecums gastriques ne présente, chez les animaux vivant dans l'eau saumâtre, qu'une faible augmentation d'hydratation (72 p. 100 du poids de tissu frais contre 68 p. 100 chez les

(1) Si l'hydratation du tissu entrainait seule en jeu, la concentration en acides aminés libres et en taurine passerait de 320 à 300 millimoles par litre d'eau. Cette modification ne rend compte que d'une différence de pression osmotique correspondant à 0°04 C.

témoins). A cette dilution du milieu extérieur, la régulation isosmotique intracellulaire est donc efficace, en ce sens qu'elle s'oppose à la pénétration d'eau dans les cellules.

Le tissu des caecums gastriques contient, comme le montre le Tableau I, des quantités relativement considérables de glycoColle et de taurine, et des quantités très faibles ou des traces des autres acides aminés dosés. La somme des acides aminés et de la taurine rend compte (Tableau II) d'une part importante de la pression osmotique intracellulaire.

Comme le montre le Tableau II, la modification de concentration des acides aminés et de la taurine rend compte d'une part importante de la compensation. La modification de concentration des acides aminés et de la taurine compense à concurrence de 0.28°C , soit à concurrence d'un tiers environ, la variation de Δ du milieu intérieur. Cet effet résulte presque exclusivement de la variation des concentrations du glycoColle et de la taurine. L'intervention de la taurine dans une régulation isosmotique intracellulaire n'avait pas été observée jusqu'ici.

CONCLUSIONS

La variation de concentration intracellulaire du glycoColle et de la taurine au niveau des caecums gastriques d'*Asterias rubens* vivant dans la Manche rend compte d'une part importante de la régulation isosmotique intracellulaire qui lui permet de tolérer une dilution du milieu extérieur amenant la concentration de ce dernier à 60 p. 100 de celle de l'eau de mer, c'est-à-dire à un Δ de $-1^{\circ}23\text{C}$.

Summary

The mechanism of euryhalinity in *Asterias rubens* has been studied in a batch collected in the Channel (Coast of Brittany). These starfishes are able to survive for at least a period of 10 days in a medium containing 60 % sea water (Δ : $-1^{\circ}23\text{C}$), when the transfer from sea water is realized progressively, within three days.

During the adaptation to diluted sea water, the osmotic pressure of the internal medium (perivisceral fluids) is the same as that of the external medium. The tissues of the gastric caeca, however, shows only a small variation of hydration, which implies an effective isosmotic intracellular regulation. The variation in the intracellular concentration of the free glycine and the free taurine in the tissues, plays an important part in this mechanism.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- BINYON, J., 1961. — *J. Mar. Ass. U.K.*, 41, pp. 161-174.
 BRATSTRÖM, H., 1941. — *Undersökningar över Oresund*. vol. 27.
 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 FLORKIN, M., 1961. — *Comp. Biochem. Physiol.*, 3, pp. 245-249.
- DUCHATEAU, GH., FLORKIN, M. et JEUNIAUX, CH., 1959. — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, pp. 489-500.
- DUCHATEAU-BOSSON, GH., JEUNIAUX, CH. et FLORKIN, M., 1961. — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, 69, pp. 30-35.
- JEUNIAUX, CH., BRICTEUX-GRÉGOIRE, S. et FLORKIN, M., 1961. — *Cah. Biol. Mar.*, 2, pp. 373-380.
- JEUNIAUX, CH., DUCHATEAU-BOSSON, GH. et FLORKIN, M., 1961. — *J. of Bioch. (Jap.)*, 49, pp. 527-531.
- SCHLIEPER, C., 1957. — *Ann. Biol.*, 33, pp. 117-127.
- SEGERSTRALE, S., 1949. — *Oikos*, 1, pp. 127-141.