

Reçu le 29 janvier 1964.

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

PAR

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

(Laboratoire de Biochimie, Institut Léon Fredericq, Université de Liège)

Introduction

Bien que poecilosmotique, *Ostrea edulis* est, comme il est bien connu, une espèce euryhaline. Chez d'autres Invertébrés poecilosmotiques et néanmoins doués d'une euryhalinité plus ou moins étendue, on a pu mettre en évidence une régulation isosmotique intracellulaire limitant les modifications de la distribution de l'eau et des électrolytes entre les cellules et le milieu intérieur (*Arenicola marina*, DUCHÂTEAU-BOSSON, JEUNIAUX et FLORKIN, 1961; *Perinereis cultrifera*, JEUNIAUX, DUCHÂTEAU-BOSSON et FLORKIN, 1961; *Mytilus edulis*, POTTS, 1958; BRICTEUX-GRÉGOIRE, DUCHÂTEAU-BOSSON, JEUNIAUX et FLORKIN, 1964; *Asterias rubens*, JEUNIAUX, BRICTEUX-GRÉGOIRE et FLORKIN, 1962). Le présent travail est consacré à l'étude des effecteurs de la régulation isosmotique intracellulaire au niveau des muscles adducteurs de l'huître transférée de l'eau de mer à l'eau saumâtre.

Matériel et méthodes

Les huîtres (*Ostrea edulis* L.) provenaient des parcs de Zélande (Mer du Nord). Elles ont été conservées pendant 48 heures dans de l'eau de mer aérée, avant d'être adaptées à des milieux dilués. Cette adaptation a été réalisée par paliers successifs, les huîtres étant amenées successivement dans des mélanges contenant respectivement 80, 70, 60 et 50 % d'eau de mer, et étant gardées pendant 24 heures dans chacun de ces milieux.

Les témoins ont été conservés dans de l'eau de mer aérée, renouvelée quotidiennement, pendant toute la durée de l'expérience d'adaptation.

Détermination de l'espace extracellulaire.

Pour déterminer l'espace extracellulaire et ses variations au cours de l'adaptation des huîtres à l'eau saumâtre, nous avons mesuré la teneur en inuline du sang et des muscles adducteurs, après injection d'une solution d'inuline à 20 % dans de l'eau de mer ou dans l'eau de mer diluée deux fois, selon les cas.

Les huîtres, conservées en eau de mer ou adaptées à l'eau saumâtre (eau de mer 50 %) sont légèrement anesthésiées par addition de quelques gouttes d'éther à l'eau dans laquelle elles baignent. Cette anesthésie entraîne le relâchement des muscles adducteurs; on maintient les valves entrouvertes au moyen d'un bouchon de caoutchouc, et on injecte la solution d'inuline (0.5 ml. par animal) dans la région dorsale, de manière à pénétrer dans les gonades et dans la glande digestive. Après 24 heures, l'inuline est uniformément distribuée dans le sang et les espaces extracellulaires. On récolte le sang par ponction cardiaque, et on prélève séparément les portions « lente » (blanche) et « rapide » (jaune) des muscles adducteurs. On les baigne pendant 30 secondes dans une solution d'eau de mer isotonique avec le sang, on les essore sur papier filtre, puis on les homogénéise (mixer). La teneur en inuline du sang et des broyats de fibres musculaires est estimée par la méthode de ROE *et al.* (1949).

Détermination de la teneur des fibres musculaires en constituants inorganiques et en constituants azotés dialysables.

Les portions « lente » (blanche) et « rapide » (jaune) des muscles adducteurs sont prélevées séparément, essorées sur papier, et agitées pendant 30 secondes dans de l'eau de mer ou de l'eau de mer diluée, isotoniques avec le sang. Les fragments de muscles sont ensuite essorés sur papier filtre et pesés (poids frais). Une portion est utilisée pour la détermination du poids sec. La poudre de muscles est divisée en deux lots. Le premier sert au dosage du chlore par la méthode de VAN SLYKE (1923). L'autre lot est incinéré au four à moufles à 500°. Les cendres sont utilisées pour le dosage du sodium et du potassium (spectrophotomètre

TABLEAU I. — Teneur en constituants inorganiques et en eau des fibres musculaires d'Ostrea edulis dans l'eau de mer (M) et dans l'eau de mer diluée deux fois (M/2)

M : Δ = -2.26°C; Cl 2388, K 578, Na 1132, Ca 32.5 mg p. 100 ml, Cl 672.7, K 14.8, Na 492.2, Ca 8.1 mOsm p.l.
M/2 : Δ = -1.20°C; Cl 1194, K 28.9; Na 566, Ca 16.2 mg p. 100 ml; Cl 336.3, K 7.4, Na 246.1, Ca 4.1 mOsm p.l.

	mg p. 100 g de tissu frais				mOsm p. Kilo d'eau de fibre musculaire			
	muscle jaune		muscle blanc		muscle jaune		muscle blanc	
	M	M/2	M	M/2	M	M/2	M	M/2
Cl	579.0	338.7	1014.7	623.2	106.9	99.8	243.4	198.5

l'eau de mer aérée,
de la durée de l'expé-

e et ses variations au
saumâtre, nous avons
s muscles adducteurs,
20 % dans de l'eau de
, selon les cas.

r ou adaptées à l'eau
ment anesthésiées par
eau dans laquelle elles
âchement des muscles
trouvées au moyen
de la solution d'inuline
le, de manière à péné-
estive. Après 24 heures,
s le sang et les espaces
ction cardiaque, et on
(blanche) et « rapide »
baigne pendant 30 se-
otonique avec le sang,
s homogénéise (mixer).
ts de fibres musculaires
(1949).

culaires en constituants
dialysables.

de » (jaune) des muscles
essorées sur papier,
eau de mer ou de l'eau
s fragments de muscles
pesés (poids frais). Une
du poids sec. La poudre
premier sert au dosage
KE (1923). L'autre lot
s cendres sont utilisées
um (spectrophotomètre

TABLEAU 1. — Valeur en constituants inorganiques et en eau des fibres musculaires d'*Ostrea edulis* dans l'eau de mer (M) et dans l'eau de mer diluée deux fois (M/2)

M : Δ = -2.26° C; Cl 2388, K 57.8, Na 1132, Ca 32.5 mg p. 100 ml, Cl 672.7, K 14.8, Na 492.2, Ca 8.1 mOsm p.l.
M/2 : Δ = -1.20° C; Cl 1194, K 28.9; Na 566, Ca 16.2 mg p. 100 ml; Cl 336.3, K 7.4, Na 246.1, Ca 4.1 mOsm p. l.

	mg p. 100 g de tissu frais				mOsm p. Kilo d'eau de fibre musculaire			
	muscle jaune		muscle blanc		muscle jaune		muscle blanc	
	M	M/2	M	M/2	M	M/2	M	M/2
Cl	579.0	338,7	1014.7	623.2	106.9	99.8	243.4	198.5
K	406.5	235.8	245.8	166.9	165.0	78.3	111.3	58.4
Na	419.4	228.2	630.2	382.0	179.9	111.4	299.6	197.6
Ca	26.7	21.8	50.1	34.6	9.0	6.8	19.9	11.5
					460.8	296.3	674.2	466.0
	p. 100 du poids de tissu frais				p. 100 de l'eau totale			
	muscle jaune		muscle blanc		muscle jaune		muscle blanc	
	M	M/2	M	M/2	M	M/2	M	M/2
Résidu sec	23.7	17.7	23.4	18.3				
Eau	76.3	82.3	76.6	81.7				
Espace « inuline » ..	14.4	5.6	23.1	9.6				
Espace « inuline » ..	18.9	6.8	30.2	11.8				

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

TABLEAU II. — *Constituants azotés dialysables des fibres musculaires d'Ostrea edulis maintenues 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			
	muscle jaune		muscle blanc		muscle jaune		muscle blanc	
	M	M/2	M	M/2	M	M/2	M	M/2
1. Acides aminés :								
Alanine	299	226	163	130	54.3	33.0	34.2	20.3
Arginine	30.6	25.9	24.9	21.2	2.8	1.9	2.7	1.8
Ac. aspartique total	23.4	33.5	62.9	80.7	2.8	3.3	8.8	8.4
Ac. glutamique total	89.7	87.3	76.7	87.2	9.9	7.7	9.8	8.2
Glycocolle	245	187	217	172	52.8	32.4	54.2	31.7
Histidine	tr	tr	tr	1.7				
Isoleucine	tr	tr	tr	3.0				
Leucine	37.4	24.8	39.3	30.1	4.1	2.2	5.0	2.9
Lysine	tr	tr	tr	tr				
Phénylalanine	58.6	40.2	36.3	33.8	8.2	4.6	5.9	4.1
Proline	8.1	5.6	7.8	6.1	1.2	.7	1.4	.8
Sérine	4.1	2.5	4.1	2.4	.6	.3	.6	.3
Thréonine	tr	tr	tr	tr				
Tyrosine	tr	tr	tr	2.7				
Valine	tr	tr	tr	tr				
Total	795.9	627.2	632.0	570.9	136.7	86.1	122.6	78.5
2. Taurine	581	497	426	466	75.1	51.9	63.8	51.7
3. Bétaine	741.1	619.6	517.6	422.3	102.3	69.1	82.8	51.2
4. Oxyde de triméthylamine	0	230	175	149	336.1	213.8	233.8	147.1
5. N aminé dialysable (nimhydrine)	291	409	316	262	635.1	380.7	422.7	259.5
6. N dialysable total	550							

TABLEAU III. — *Modifications de concentrations (mOsm p. Kilo d'eau de fibre) des constituants osmotiquement actifs des fibres musculaires lors du passage d'Ostrea edulis de l'eau de mer à l'eau de mer diluée deux fois et modifications prévisibles en raison de l'augmentation d'hydratation résultante.*

	Modifications observées		Modifications prévisibles par suite de l'hydratation		Différence	
	muscle jaune	muscle blanc	muscle jaune	muscle blanc	muscle jaune	muscle blanc
	1. Acides aminés dialysables :					

de flamme Eppendorf) et du calcium (précipitation sous forme d'oxalate; lavages avec un mélange à volumes égaux d'alcool, d'éther et d'ammoniacque à 2 p. 100; titrage de l'acide oxalique par le permanganate).

Une autre fraction de muscles frais est plongée dans de l'eau bouillante pour inactiver les enzymes et est homogénéisée (mixer). Les purées de muscles sont dialysées pendant 24 h. à 1° C contre un volume d'eau distillée égal à 10 fois le volume de purée; le dialysat est évaporé, sous vide, à une température inférieure à 60° C. Une fraction est utilisée, telle quelle, pour le dosage de l'azote total, de l'oxyde de triméthylamine et de la glycocolle-bétaïne suivant les méthodes indiquées par BRICTEUX-GRÉGOIRE *et al.*, 1962. Une autre partie du dialysat a été hydrolysée par HCl 6N à reflux pendant 24 h. Les dialysats hydrolysés sont utilisés pour le dosage des acides aminés libres (méthode chromatographique sur échangeurs d'ions de MOORE et STEIN) et de l'azote aminé (ninhydrine).

Résultats et discussion

Le tableau IV montre que les constituants inorganiques dosés et les constituants azotés dosés sous la forme d'azote total dialysable contribuent à concurrence de 90 p. 100 environ à la somme des constituants osmotiquement actifs du muscle jaune (rapide) ou du muscle blanc (lent). Toutefois les constituants inorganiques prédominent dans le muscle blanc tandis que dans le muscle jaune, ce sont les constituants azotés dialysables qui l'emportent. Il y a cependant peu de différence, sauf dans le cas de l'alanine et de l'acide aspartique, entre les acides aminés libres des deux muscles. La bétaïne, la taurine et l'azote indéterminé sont à plus forte concentration dans le muscle jaune.

L'espace « inuline » est plus grand dans le muscle blanc qui contient aussi nettement plus de Na et de Cl par rapport au volume d'eau de fibre.

Lors du transfert dans l'eau saumâtre, l'espace « inuline » est nettement réduit dans le cas des deux muscles et le volume de l'eau intracellulaire est nettement accru. Cette dilution du contenu intracellulaire rend compte d'une part importante de la variation des constituants osmotiquement actifs

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

		Différence	
	muscle blanc	M/2	muscle blanc
	muscle blanc	M	muscle jaune
	muscle blanc	M/2	muscle blanc
	muscle blanc	M	muscle blanc
	muscle blanc	M/2	muscle blanc
	muscle blanc	M	muscle blanc

precipitation sous forme
volumes égaux d'alcool,
ge de l'acide oxalique

plongée dans de l'eau
et est homogénéisée
ysées pendant 24 h. à
l à 10 fois le volume
de, à une température
e, telle quelle, pour le
méthylamine et de la
liquées par BRICTEUX-
dialysat a été hydro-
es dialysats hydrolysés
aminés libres (méthode
de MOORE et STEIN)

ion

nts inorganiques dosés
me d'azote total dialy-
00 environ à la somme
muscle jaune (rapide)
stituants inorganiques
s que dans le muscle
sables qui l'emportent.
dans le cas de l'alanine
aminés libres des deux
te indéterminé sont à
une.

is le muscle blanc qui
de Cl par rapport au

re, l'espace « inuline »
x muscles et le volume
t accru. Cette dilu-
pte d'une part impor-
osmotiquement actifs

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

	muscle jaune		muscle blanc		Différence	
	M	M/2	M	M/2	muscle jaune	muscle blanc
Constituants inorganiques	460.8	296.3	674.2	466.0	164.5	208.2
N total dialysable	635.1	380.7	422.7	259.5	254.4	163.2
Somme	1095.9	677.0	1096.9	725.5	418.9	371.4
Δ calc.	-2.05° C	-1.27° C	-2.05° C	-1.36° C	-1.06°	-1.06°
Δ de l'eau extérieure	-2.28°	-1.20°	-2.26°	-1.20°	(567 mOsm)	(567 mOsm)
N total dialysable	635.1	380.7	422.7	259.5	254.4	163.2
1. Oxyde de triméthylamine	0	0	0	0		
2. Bétaine	102	69	83	51	33	32
3. Taurine	75	52	64	52	23	12
4. Ac. aminés dialysables dosés	137	86	123	79	51	44
5. Glycocolle	53	32	54	32	21	22
6. N aminé (minhydrine)	336	214	234	147	122	87
7. Total 2 + 3 + 4	314	207	270	182	107	88
8. Total 2 + 6	438	283	317	198	155	119
9. N total dialysable — N aminé (minhydrine)	299	167	189	113	132	76
10. N total dialysable — N déterminé (2 + 6)	197	98	106	62	99	44

(plus de 50 p. 100 pour le muscle jaune, près de 80 p. 100 pour le muscle blanc). Toutefois le tableau III montre qu'il s'opère aussi une régulation active qui explique l'autre portion de l'ajustement. Cette régulation est plus importante, au niveau de l'ensemble des constituants osmotiquement actifs, dans le cas du muscle jaune que dans celui du muscle blanc. On doit noter que dans les deux muscles, dans le cas du chlorure, la variation de concentration observée après le passage dans l'eau douce est moindre que ne le ferait présager la dilution de sorte que la régulation, dans le cas de ce constituant particulier, s'opère à l'inverse de l'ajustement intracellulaire isosmotique.

L'azote dialysable total est plus élevé, avons-nous vu, dans le muscle jaune que dans le muscle blanc. Cette constatation s'applique aussi bien à l'azote aminé (ninhydrine) qu'à la glyco-colle-bétaïne, à la taurine et à l'azote indéterminé (N total-N aminé dosé par la ninhydrine).

Parmi les constituants identifiés de l'azote dialysable, les plus importants effecteurs de la concentration osmolaire intracellulaire sont, aussi bien dans le muscle blanc que dans le muscle jaune, la glyco-colle-bétaïne, la taurine, le glyco-colle et l'alanine. Ce sont ces mêmes constituants qui représentent les plus importants parmi les effecteurs identifiés de la régulation intracellulaire isosmotique dans le domaine des constituants azotés.

En résumé, l'ajustement osmotique intracellulaire, lors du passage de l'eau de mer à l'eau de mer diluée deux fois s'opère, au niveau des muscles adducteurs d'*Ostrea edulis* par une modification d'hydratation plus marquée que dans le cas des muscles adducteurs de *Mytilus*. Il s'opère néanmoins une régulation isosmotique active qui s'exerce principalement par la régulation de concentration du potassium, du sodium, de la glyco-colle-bétaïne, de l'alanine, du glyco-colle et de constituants azotés indéterminés.

La variation de concentration de la taurine est entièrement expliquée par la variation d'hydratation.

BIBLIOGRAPHIE

- BRICTEUX-GRÉGOIRE, S., DUCHÂTEAU-BOSSON, Gh., JEUNIAUX, Ch. et FLORKIN, M. (1962). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **70**, 273.
- BRICTEUX-GRÉGOIRE, S., DUCHÂTEAU-BOSSON, Gh., JEUNIAUX, Ch. et FLORKIN, M. (1964). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **72**, 116.

- DUCHÂTEAU-BOSSON, Gh., *Physiol. Bioch.*, **69**, 30.
- JEUNIAUX, Ch., BRICTEUX *Mar.*, **3**, 107.
- JEUNIAUX, Ch., DUCHÂTEAU (Jap.), **49**, 527.
- POTTS, W. T. W. (1952).
- ROE, J. H., EPSTEIN, J. I. 839.
- VAN SLYKE, D. D. (1923-)

- DUCHÂTEAU-BOSSON, Gh., JEUNIAUX, Ch. et FLORKIN, M. (1961). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **69**, 30.
- JEUNIAUX, Ch., BRICTEUX-GRÉGOIRE, S. et FLORKIN, M. (1962). — *Cah. de Biol. Mar.*, **3**, 107.
- JEUNIAUX, Ch., DUCHÂTEAU-BOSSON, Gh. et FLORKIN, M. (1961). — *J. Bioch. (Jap.)*, **49**, 527.
- POTTS, W. T. W. (1952). — *J. exp. Biol.*, **35**, 749.
- ROE, J. H., EPSTEIN, J. H. et GOLDSTEIN, N. P. (1949). — *J. biol. Chem.*, **178**, 839.
- VAN SLYKE, D. D. (1923-1924). — *J. biol. Chem.*, **58**, 523.

al.
 près de 80 p. 100 pour
 montre qu'il s'opère
 e l'autre portion de
 importante, au niveau
 ment actifs, dans le
 muscle blanc. On doit
 e cas du chlorure, la
 le passage dans l'eau
 r la dilution de sorte
 nstituant particulier,
 cellulaire isosmotique.
 avons-nous vu, dans
 c. Cette constatation
 ydrine) qu'à la glyco-
 adéterminé (N total-

azote dialysable, les
 tion osmolaire intra-
 nc que dans le muscle
 glycocolle et l'alanine.
 entent les plus impor-
 régulation intracellu-
 nstituants azotés.

tracellulaire, lors du
 uée deux fois s'opère,
edulis par une modi-
 ans le cas des muscles
 s une régulation isos-
 nt par la régulation
 um, de la glycocolle-
 e constituants azotés

urine est entièrement

UNIAUX, Ch. et FLORKIN, M.

UNIAUX, Ch. et FLORKIN, M.