

MIE

mesures quotidiennes
ont progressivement
ns 4 jours, par des
e excrété est mesuré
les trois premiers
érience identique est
ent adaptés à l'eau
à l'eau douce.

l'azote total excrété
es deux milieux. Au
eau douce à l'eau de
cessivement à 1.28-
our/individu. L'ex-
remiers jours en eau
le troisième jour).
eau douce (4 jours),
ment de 4.11-7.85,
individu. L'excrétion
s jours en eau douce

nt adaptés de l'eau
ément l'azote total
composés volatils
ésente entre 73 et
ation à l'eau douce,
et se maintient très
ent osmotique.

ration de la compo-
au cours de l'adap-
tion du catabolisme

Arch. internat. Physiol. Bioch.,

Physiol., Paris, 48, 520.

(1959). — *Arch. internat.*

, 209.

**Variation de la Composante Amino-acide des Tissus et Euryhalinité
chez *Perinereis cultrifera* Gr. et *Nereis diversicolor*
(O. F. Müller)**

Par

Ch. JEUNIAUX, Gh. DUCHÂTEAU-BOSSON et MARCEL FLORKIN

REPRINTED FROM
THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY
Vol. 49, No. 6
(June, 1961)

Variation de la Composante Amino-acide des Tissus et Euryhalinité chez *Perinereis cultrifera* Gr. et *Nereis diversicolor* (O. F. Müller)

Par CH. JEUNIAUX, GH. DUCHÂTEAU-BOSSON et MARCEL FLORKIN

(Université de Liège, Biochimie, Prof. M. Florkin, et Station biologique de Roscoff, Finistère)

(Reçu pour la publication, le 6 avril 1961)

Au cours d'un travail antérieur, nous avons fait remarquer que, chez les Invertébrés marins qui présentent un degré plus ou moins étendu d'euryhalinité, deux mécanismes différents peuvent être responsables de cette faculté d'adaptation (1). Chez des animaux comme la Moule (2) et *Arenicola* (1), le seul mécanisme mis en jeu est la variation de concentration des constituants intracellulaires, notamment de la composante amino-acide. Chez d'autres Invertébrés euryhalins, ce mécanisme est complété par une osmorégulation, c'est-à-dire par un mécanisme d'ionorégulation maintenant la concentration osmotique du milieu intérieur à une valeur supérieure à celle du milieu extérieur, quand ce dernier est moins concentré que l'eau de mer (*Carcinus* (3, 4), *Eriocheir* (5)).

Ce qui précède fait supposer que le mécanisme intracellulaire représente le mécanisme le plus ancien rendant compte d'un degré plus ou moins marqué d'euryhalinité, le mécanisme osmorégulateur étendant encore vers les régions de basses salinités du milieu aquatique, les capacités euryhalines des Invertébrés marins qui l'auraient secondairement acquis.

Le cas des espèces marines plus ou moins euryhalines que présentent les genres *Nereis* et *Perinereis* offre dans ce domaine un sujet d'études particulièrement adéquat. *Nereis diversicolor* (O. F. Müller) est le seul Invertébré marin connu, en dehors des Crustacés, comme présentant une osmorégulation lorsqu'il vit dans l'eau saumâtre où il supporte une dilution poussée jusqu'à celle de l'eau de mer diluée cinq fois (6). *Perinereis cultrifera* Gr.,

bien qu'étant poecilomotique (7), présente cependant un degré non négligeable d'euryhalinité qui l'oppose à *Nereis pelagica* L., elle aussi poecilomotique (6), mais dont l'aire de distribution est limitée à l'eau de mer, tandis qu'on trouve *Perinereis cultrifera* dans certains estuaires (8).

Nous avons donc mesuré chez *N. diversicolor* et *P. cultrifera* les variations de pression osmotique des milieux extracellulaires et celles de la concentration en quinze acides aminés libres intracellulaires, au cours de l'adaptation à des milieux hypotoniques.

METHODES

Les animaux utilisés pour ces expériences ont été choisis intacts, et ceux dont la partie postérieure du corps avait été abandonnée par autotomie en cours d'expérience ont été éliminés. D'autre part, afin d'éviter de trop grandes perturbations, les vers en expérience ont été conservés dans des aquariums garnis d'une couche de 3 à 4 cm de sable ou de vase provenant de l'endroit de récolte de ces vers. Toutes les expériences ont été réalisées au mois de juin 1960.

Les individus appartenant à l'espèce *Perinereis cultrifera* ont été recueillis dans le sable de la grève de Roscoff, en face du laboratoire maritime. Un lot témoin a été conservé en eau de mer courante, pendant que les vers du second lot étaient transférés dans des aquariums recevant une eau de mer de plus en plus diluée, jusqu'à atteindre la proportion d'un volume d'eau de mer pour un volume d'eau douce. Cette période d'adaptation a duré 6 heures. Les vers ont ensuite été conservés pendant 3 jours dans un mélange à parties égales d'eau de mer et d'eau douce, bien aéré et constamment renouvelé.

Vers témoins et vers adaptés à l'eau de mer diluée ont été utilisés pour le prélèvement des liquides organiques extracellulaires et pour la préparation des

broyés de tubes musculo-cutanés. Six individus ont fourni environ 1.5 ml. de mélange de sang et de liquide coelomique, dont la pression osmotique a été évaluée par mesure de l'abaissement cryoscopique. Pour la préparation des tubes musculo-cutanés, chaque animal, essoré sur papier filtre, a été ouvert, au moyen de ciseaux fins, sur toute sa longueur le long du vaisseau dorsal. Après élimination du 1/3 postérieur du corps, pauvre en muscles, de la tête et du pharynx, le contenu du tube musculo-cutané (tube digestif, néphridies) a été enlevé à la pince et par grattage au scalpel. La préparation a été ensuite essorée, lavée dans de l'eau de mer isotonique glacée, soigneusement essorée de nouveau, pesée sans délai, et plongée instantanément dans un volume connu d'eau distillée bouillante, afin d'inactiver les enzymes. Nous avons veillé à ce que l'ensemble de ces manipulations n'ex-cède jamais 10 minutes.

Les individus appartenant à l'espèce *Nereis diversicolor* ont été récoltés dans la vase de l'Aber de Roscoff. Pendant qu'une partie des animaux (lot témoin) était gardée dans de l'eau de mer courante, l'autre partie

a été adaptée progressivement à de l'eau de mer de plus en plus diluée, de telle sorte que, après 36 heures environ, la proportion d'eau de mer était de 1/5. Les vers ont été maintenus pendant 4 jours dans de l'eau de mer diluée 5 fois, bien aérée et constamment renouvelée.

La récolte du mélange de sang et de liquide coelomique a été réalisée par prélèvement au moyen d'une pipette capillaire. La préparation des tubes musculo-cutanés a été réalisée comme pour l'espèce précédente.

Les différentes préparations musculo-cutanées constituant un même lot ont été rassemblées, avec l'eau où on les a ébouillantées, et homogénéisées au moyen d'un Waring-blendor. La purée obtenue a été dialysée pendant 24 heures à 0°C contre un volume 10 fois supérieur d'eau distillée. Le dialysat, évaporé à sec, a été hydrolysé par chauffage à reflux pendant 24 heures en présence d'acide chlorhydrique 6N. Les résultats sont réunis dans les tableaux I et II, tandis que les tableaux III et IV rassemblent les différentes données numériques.

TABLEAU I

Variation de concentration de 15 acides aminés libres intracellulaires, au cours de l'adaptation à des milieux dilués (mg. d'acide aminé p. 100 g. de tissu frais)

	<i>Perinereis cultrifera</i>			<i>Nereis diversicolor</i>	
	Eau de mer		Eau de mer diluée 2 fois	Eau de mer	Eau de mer diluée 5 fois
	1	2			
Alanine	305.7	209.6	104.2	323.2	27.6
Arginine	2.8	3.1	1.3	2.1	2.1
Ac. aspartique	96.4	80.2	87.3	94.9	41.4
Ac. glutamique	217.3	168.9	115.9	210.5	91.3
Glycocolle	1329.6	1416.7	727.7	433.6	50.1
Histidine	24.6	22.6	9.5	31.3	11.0
Isoleucine	11.8	9.2	4.9	24.8	4.9
Leucine	15.4	12.2	6.6	22.8	6.0
Lysine	11.1	8.6	5.5	37.0	29.6
Méthionine	30.8	31.0	11.0	40.2	8.5
Phénylalanine	6.8	6.5	4.6	8.6	2.8
Proline	290.7	245.2	203.0	527.2	57.7
Thréonine	94.3	88.9	42.8	51.4	16.5
Tyrosine	10.5	9.9	6.9	24.7	5.5
Valine	24.4	22.4	12.8	44.9	6.5
Total	2472.2	2335.0	1344.0	1877.2	361.5

Variation

(mi

Alanine	
Arginine	
Ac. aspartique	
Ac. glutamique	
Glycocolle	
Histidine	
Isoleucine	
Leucine	
Lysine	
Méthionine	
Phénylalanine	
Proline	
Thréonine	
Tyrosine	
Valine	
Total	

Abaissement cryoscopique (Δ)	
Δe	Eau de mer
Δi	-2.08°C
	-2.06°C
	Eau de mer diluée 2 fois
Δe	-1.12°C
Δi	-1.17°C

Variation de concentrati

a) mg. pour 100 g. d'ea

b) résultant uniquement

c) non expliquée par la

Amino-acide des Tissus et Euryhalinité

TABLEAU II

Variation de concentration de 15 acides aminés libres intracellulaires,
au cours de l'adaptation à des milieux dilués
(millimoles d'acide aminé p. 100 g. de tissu frais)

	<i>Perinereis cultrifera</i>			<i>Nereis diversicolor</i>	
	Eau de mer		Eau de mer diluée 2 fois	Eau de mer	Eau de mer diluée 5 fois
	1	2			
Alanine	3.43	2.35	1.17	3.63	.31
Arginine	.02	.02	.01	.01	.01
Ac. aspartique	.72	.60	.66	.71	.31
Ac. glutamique	1.48	1.15	.79	1.43	.62
Glycocolle	17.71	18.87	9.69	5.78	.67
Histidine	.16	.15	.06	.20	.07
Isoleucine	.09	.07	.04	.19	.04
Leucine	.12	.09	.05	.17	.05
Lysine	.08	.06	.04	.28	.20
Méthionine	.21	.21	.07	.27	.06
Phénylalanine	.04	.04	.03	.05	.02
Proline	2.53	2.13	1.76	4.58	.50
Thréonine	.79	.75	.36	.43	.14
Tyrosine	.06	.05	.04	.14	.03
Valine	.20	.19	.11	.38	.06
Total	27.64	26.73	14.88	18.25	3.09
	Moy: 27.18 Différence=0.12 mole/litre (soit environ 0.2°C)			Différence=0.15 mole/litre (soit environ 0.3°C)	

intracellulaires,

s
(is)

<i>Nereis diversicolor</i>	
Eau de mer	Eau de mer diluée 5 fois
323.2	27.6
2.1	2.1
94.9	41.4
210.5	91.3
433.6	50.1
31.3	11.0
24.8	4.9
22.8	6.0
37.0	29.6
40.2	8.5
8.6	2.8
527.2	57.7
51.4	16.5
24.7	5.5
44.9	6.5
1877.2	361.5

TABLEAU III

Perinereis cultrifera

Abaissement cryoscopique (Δ)	Nombre d'individus	Poids de tissu frais g.	Eau g. p. 100 g. de tissu frais	mg. acides aminés p. 100 g. de tissu frais		mg acides aminés p. 100 g. d'eau
				2472.2	moy. 2403.6	
Δe -2.08°C	10	10.3281	76.5	moy. 75.7	2335.0	3175
Δi -2.06°C	8	10.4974	74.9			
Δe -1.12°C	8	12.0324	82.8	1344.0		1623
Δi -1.17°C						

Variation de concentration des acides aminés libres intracellulaires:

- a) mg. pour 100 g. d'eau: 3175-1623=1552 mg./100 g. d'eau
 b) résultant uniquement de la variation de teneur en eau: 3175-2903=272 mg./100 g. d'eau
 c) non expliquée par la variation de teneur en eau: 1552-272=1280 mg./100 g. d'eau

TABLEAU IV
Nereis diversicolor

Abaissement cryoscopique (Δ)		Nombre d'individus	Poids de tissu frais g.	Eau g. p. 100 g. de tissu frais	mg. acides aminés p. 100 g. de tissu frais	mg. acides aminés p. 100 g. d'eau
Δe	Eau de mer	44	7.4424	75.8	1877.2	2477
	-2.08°C					
Δe	Eau de mer diluée 5 fois	36	8.7739	82.4	361.5	439
	-0.43°C					
Δi	-1.04°C					

Variation de concentration des acides aminés libres intracellulaires :

a) mg. p. 100 g d'eau : 2477-439=2038

b) résultant uniquement de la variation de teneur en eau : 2477-2278=199

c) non expliquée par la variation de teneur en eau : 2038-199=1839 (90 p. 100)

DISCUSSION

Le tableau III montre que, dans l'eau de mer diluée deux fois, représentant la limite extrême de la tolérance à la dilution chez *Perinereis cultrifera*, la modification d'hydratation des muscles de cette espèce est faible, bien que la dilution du sang corresponde à une variation d'abaissement cryoscopique de 1°C environ, c'est-à-dire presque exactement à la valeur de la variation du milieu extérieur. La variation de concentration de la composante amino-acide (dont 82 p. 100 ne sont pas expliqués par la modification d'hydratation) correspond à une variation d'abaissement cryoscopique de 0.2°C environ.

Dans le cas de *Nereis diversicolor* (tableau IV), la forte dilution du milieu extérieur (de -2.08° à -0.43°C, soit une variation de 1.65°C) est compensée par l'osmorégulation du milieu intérieur à concurrence de 0.61°C (la valeur de l'abaissement cryoscopique du sang étant de -1.43°C), et par la diminution de concentration des acides aminés intracellulaires à concurrence de 0.3°C environ.

Les cas de *Perinereis cultrifera* et de *Nereis diversicolor* se rangent donc dans les deux catégories de mécanisme assurant l'euryhalinité : le premier se situant comme ceux de *Mytilus* et d'*Arenicola* parmi les organismes marins dont l'euryhalinité dépend uniquement d'une régulation intracellulaire à laquelle la modification de la composante amino-acide contri-

bue pour une part importante, le second se situant, comme *Carcinus* et *Eriocheir*, parmi les organismes dont l'euryhalinité, plus étendue que celle de la première catégorie, relève à la fois d'une régulation intracellulaire et d'une osmorégulation du milieu intérieur.

Beadle (10), considérant la théorie de Schlieper (6) selon laquelle les espèces homéosmotiques présentent une consommation d'oxygène plus élevée dans les milieux dilués, contrairement aux poecilosmotiques, observe au cours de l'adaptation à l'eau de mer diluée une augmentation de consommation d'oxygène aussi bien chez le poecilosmotique *Perinereis cultrifera* que chez l'homéosmotique *Nereis diversicolor*, l'augmentation de consommation d'oxygène étant plus élevée chez *Nereis diversicolor*. Il conclut que *Perinereis cultrifera* et *Nereis diversicolor* doivent leur euryhalinité au même mécanisme, plus développé chez le second, mécanisme qu'il tient pour "a fundamental property of living cells, which has become more highly developed in certain forms". On peut proposer une interprétation de l'augmentation de consommation d'oxygène chez les animaux euryhalins mentionnés ci-dessus, qu'ils soient poecilosmotiques ou homéosmotiques, par l'existence du mécanisme commun de l'abaissement, dans les milieux dilués, de la composante amino-acide intracellulaire qui limite la pénétration d'eau dans les cellules.

L'abaissement de la composante amino-

acide intracellulaire est vraisemblablement le résultat d'une métabolisation accrue des acides aminés, avec augmentation de consommation d'oxygène. Le transport actif d'acides aminés dans l'osmorégulation du milieu intérieur évidemment rendre compte de l'augmentation de consommation d'oxygène consommé, comme chez *Nereis diversicolor*, qui cumule l'abaissement intracellulaire et l'osmorégulation du milieu intérieur.

RÉSUMÉ

Deux espèces d'Annélides marines ont été étudiées : *Perinereis cultrifera*, poecilosmotique, et *Nereis diversicolor*, très euryhaline. La différence de degré d'euryhalinité résulte de la régulation du milieu intérieur, deux mécanismes concourent à compenser la différence de pression osmotique entre cellules et milieu extérieur. Ce mécanisme s'ajoute au mécanisme présent chez les poecilosmotiques qui met en jeu l'abaissement de la concentration intracellulaire. Chez les deux espèces, la diminution de concentration intracellulaire de l'acide amino intracellulaire joue pour une part importante à côté de la régulation de concentration.

SUMMARY

Among the two species of polychaetes

mg. acides aminés p. 100 g. de tissu frais	mg. acides aminés p. 100 g. d'eau
1877.2	2477
361.5	439

278=199
339 (90 p. 100)

part importante, le second se
Carcinus et *Eriocheir*, parmi les
et l'euryhalinité, plus étendue
première catégorie, relève à
régulation intracellulaire et d'une
du milieu intérieur.

0), considérant la théorie de
5) selon laquelle les espèces
s présentent une consommation
élevée dans les milieux dilués,
aux poecilomotiques, observe
adaptation à l'eau de mer diluée
on de consommation d'oxygène
le poecilomotique *Perinereis*
chez l'homéomotique *Nereis*
augmentation de consommation
plus élevée chez *Nereis diversicolor*
ut que *Perinereis cultrifera* et
r doivent leur euryhalinité au
me, plus développé chez le
me qu'il tient pour "a funda-
y of living cells, which has
highly developed in certain
eut proposer une interprétation
on de consommation d'oxygène
aux euryhalins mentionnés ci-
ent poecilomotiques ou homé-
r l'existence du mécanisme
abaissement, dans les milieux
omposante amino-acide intra-
mitte la pénétration d'eau dans

ent de la composante amino-

acide intracellulaire est vraisemblablement le résultat d'une métabolisation d'acides aminés, avec augmentation de consommation d'oxygène. Le transport actif mis en jeu dans l'osmorégulation du milieu intérieur peut évidemment rendre compte d'une autre portion d'oxygène consommé, comme c'est le cas chez *Nereis diversicolor*, qui cumule la régulation intracellulaire et l'osmorégulation du milieu intérieur.

RÉSUMÉ

Deux espèces d'Annélides marines ont été étudiées : *Perinereis cultrifera*, peu euryhaline, et *Nereis diversicolor*, très euryhaline. Cette différence de degré d'euryhalinité résulte de l'existence, chez *Nereis diversicolor*, d'une osmorégulation du milieu intérieur, dont les effets concourent à compenser la différence de pression osmotique entre cellules et milieu extérieur. Ce mécanisme s'ajoute à un autre mécanisme présent chez les deux espèces, qui met en jeu l'abaissement de la concentration intracellulaire. Chez les deux espèces étudiées, la diminution de concentration de la composante amino-acide intracellulaire contribue pour une part importante à cet abaissement de concentration.

SUMMARY

Among the two species of marine Annelids

studied, *Perinereis cultrifera* and *Nereis diversicolor*, the latter is more euryhaline than the former. This is the result of the existence, in *Nereis diversicolor*, of an osmoregulation of the internal medium, which concurs towards the compensation of the osmotic difference between the cells and the external medium. This mechanism adds its effects to the lowering of the intracellular concentration, a mechanism common to both species and in which the change of concentration of free intracellular aminoacids plays an important part.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Duchâteau, Gh., Jeuniaux, Ch., et Florkin, M., *Arch. Internat. Physiol. Bioch.*, **69**, 30 (1961)
- (2) Potts, W. T. W., *J. exptl. Biol.*, **35**, 749 (1958)
- (3) Duchâteau, Gh., et Florkin, M., *J. de Physiol.*, **48**, 520 (1956)
- (4) Shaw, J., *J. exptl. Biol.*, **35**, 920 (1958)
- (5) Duchâteau, Gh., et Florkin, M., *Arch. Internat. Physiol. Bioch.*, **63**, 249 (1955)
- (6) Schlieper, C., *Z. vergl. Physiol.*, **9**, 478 (1929)
- (7) Wells, G. P., et Ledingham, I., *J. exptl. Biol.*, **17**, 337 (1940)
- (8) Hesse, R., Allee, W. C., et Schmidt, K. P., "Ecological animal geography," New York, Wiley (1937)
- (9) Duchâteau, Gh., et Florkin, M., *Arch. Internat. Physiol. Bioch.*, **62**, 487 (1954)
- (10) Beadle, L. C., *J. exptl. Biol.*, **8**, 211 (1931)