

Indices biochimiques et milieux marins. Journées du GABIM, Brest, 18-20 Nov. 1981
Publi. CNEEXO (Actes Colloq.) n. 14, 1982, p. 221 à 230

ACTIVITES AMYLASIQUES ET PROTEASIQUES CHEZ LES ACTINIES,
INFLUENCE DE L'ALIMENTATION SUR LES ACTIVITES MEASUREES.

par

M. VAN PRAET

Laboratoire de Biologie des Invertébrés Marins et Malacologie
Muséum national d'Histoire naturelle - 75231 Paris Cédex 05

R E S U M E

— Les activités amylasiques subissent des fluctuations saisonnières et présentent une augmentation significative en juin. Ceci confirme la participation probable du phytoplancton au régime alimentaire d'Actinia equina L.

Durant la période estivale des différences de micro-environnement entraînent des modifications des taux d'amylase.

Des expériences d'incorporation de L-leucine 14-C dans des pelotes mésentériques isolées, en culture, font apparaître la lenteur des processus de synthèse protéique. Les cellules en phase de synthèse, à la base des entéroïdes, sont sélectivement marquées durant les 9 premières heures d'expérimentation.

Paradoxalement ces tissus ne présentent pas de baisse sensible de leur taux d'activité protéasique au cours de la digestion. Seule une faible proportion du stock de protéases serait excrétée et cette émission serait insuffisante pour entraîner une baisse sensible des activités trypsiques et chymotrypsiques dosées.

A B S T R A C T

— Seasonal variations of the amylasic activity, which increased during June, was correlated to the participation of microalgae to the food of Actinia equina L.

In summer, individual variations revealed the existence of different microenvironments.

During experiences of 14-C leucine incorporation, proteinal synthesis appeared slow. Radioactivity increased during 9 hours in the proteins of the mesenterial pellets and was located in granular synthesis cells at the base of mesenterial filaments.

Paradoxically proteasac activities did not decrease in these tissues during experimental nutrition. Only a little part of the protease stock should be secreted during digestion and the weak diminution of trypsin and chymotrypsin activities could not be measured.

M O T S - C L E S : Actinie, Amylase, Trypsine, Chymotrypsine.

K E Y W O R D S : Sea-anemone, Amylase, Trypsin, Chymotrypsin.

INTRODUCTION

Les activités enzymatiques digestives étudiées chez les Actiniaires furent, depuis la découverte de protéases en 1880 par KRUKENBERG, interprétées comme des confirmations du caractère prédateur de ces invertébrés marins.

Ces protéases ont depuis été localisées dans des tissus spécialisés dans la digestion extracellulaire des proies : les pelotes mésentériques (NICOL, 1959) et définies comme des sérine-protéases proches de la trypsine et de la chymotrypsine des mammifères par GIBSON et DIXON (1969). La détection de fortes teneurs de chitinases et chitobiases dans l'endoderme de quatre espèces étudiées par JEUNIAUX (1969) fut considérée comme une confirmation de l'importance des crustacés dans le régime alimentaire des actinies.

Les faibles concentrations en laminarinase et en amylase rapportées par SOVA et al. (1970) et par KRIJGSMAN et TALBOT (1953) furent analysées comme des éléments complémentaires en faveur du régime carné des actinies.

La notion de prédation doit néanmoins être considérée de manière moins stricte chez ces invertébrés sessiles que chez des animaux vagiles. Ainsi de nombreuses espèces d'actinies sont connues pour être microphages ou détritivores et les Cnidaires sessiles apparaissent bien adaptés pour collecter les éléments particuliers : bactéries, cyanophycées ... (DISALVO, 1971; TIFFON et BOUTIBONNES, 1976; VAN PRAET, 1980).

Dans une étude préliminaire nous avons détecté des variations des taux d'amylase en fonction de la saison et de la situation bathymétrique des actinies (VAN PRAET, 1981a). Afin de compléter les indices en faveur de notre hypothèse d'une intervention du phytoplancton dans le régime alimentaire d'*Actinia equina* L. nous rapportons dans cette note l'étude sur 18 mois des fluctuations des activités amylasiques et de la valeur du rapport amylase / chymotrypsine.

A l'inverse des activités amylasiques, les activités tryptiques et chymotrypsiques apparaissaient dans l'étude préliminaire relativement stables. Pour tenter d'expliquer cette stabilité nous abordons l'étude des sites et des vitesses de synthèse de ces enzymes par des expériences d'incorporation de leucine 14-C.

MATERIEL ET METHODE

1. Dosages enzymatiques quantitatifs.

Les individus prélevés à marée basse à la Pointe du Diable (Goulet de Brest) sont broyés au Potter dans de l'eau distillée. Après centrifugation les activités enzymatiques sont dosées sur le surnageant et rapportées au taux de protéines solubles (VAN PRAET, 1981 b).

2. Incorporation de L-leucine 14-C.

Les tissus digestifs (pelotes mésentériques) sont disséqués puis placés dans des saumures d'eau de mer de synthèse enrichie en L-leucine 14-C(U), ($1,4 \cdot 10^{-2}$ mCi/ml d'eau de mer; activité spécifique 300 mCi/mMole). Après 30 minutes d'incorporation les pelotes mésentériques de chaque individu sont réparties en deux lots. L'un est rincé et placé en eau de mer froide : pelotes dites à jeun; les pelotes de l'autre lot sont disposées sur des fragments de manteau de moule : pelotes dites nourries. Les lots de pelotes sont rincés puis broyés après des temps de chasse échelonnés de 15 minutes à 23 heures.

La radioactivité résiduelle des milieux d'incubation, celle fixée aux tissus et celle apparaissant dans les milieux de chasse sont mesurées en scintillation liquide.

Chaque broyat est centrifugé 20 minutes à 7000 g puis le surnageant est partiellement purifié sur colonne de Sephadex G 75 (colonne de 500 mm x 10 mm) éluée au tampon TRIS 0,1M, CaCl_2 0,04M, pH8. Les fractions présentant une forte activité trypsique et chymotrypsique sont réunies (fig.1; COAN et TRAVIS, 1970, ont montré la pureté satisfaisante des protéases de Cnidaire ainsi préparées).

La radioactivité incorporée dans cette fraction est rapportée d'une part à la radioactivité totale incorporée dans la fraction soluble et d'autre part au taux de protéines solubles, exprimé en mg (tableau 2). Les fractions constituant le dernier pic d'élution sont réunies puis une partie aliquote est chromatographiée sur gel de polyacrylamide (Biogel P4, colonne de 1000 mm x 5 mm) afin d'y déterminer la part des polypeptides et des acides aminés.

Des pelotes mésentériques sont fixées au glutaraldéhyde à 6% puis incluses en araldite. Une émulsion autoradiographique NTB 2 Kodak est coulée sur les coupes semi-fines; celles-ci sont colorées au bleu de toluidine après révélation.

RESULTATS

1. Dosages enzymatiques quantitatifs.

Les variations saisonnières des activités spécifiques amylasiques sont présentées sur la figure 2 (mU/mg de protéines solubles) Les valeurs de juin 1980 (I) et juin 1981 (II) sont significativement différentes de celles d'octobre 1980, février, mai et octobre 1981 (test de F, $p < 0,01$). En juillet les individus prélevés dans les flaques permanentes des plus hauts niveaux de la marée (F) présentent des valeurs plus homogènes et significativement différentes ($p < 0,05$) de celles des individus prélevés à des niveaux inférieurs (B).

Les variations saisonnières des activités chymotrypsiques sont représentées sur la figure 3 (mU/mg de protéines solubles). La relative constance de cette activité se traduit par une fluctuation des valeurs du rapport amylase/chymotrypsine (tableau 1) parallèle à celle de l'activité spécifique amylasique (figure 2). Les activités trypsiques évoluant comme les activités chymotrypsiques, mais étant moins aisées à doser (VAN PRAET, 1981b), elles ne seront pas considérées dans cette note.

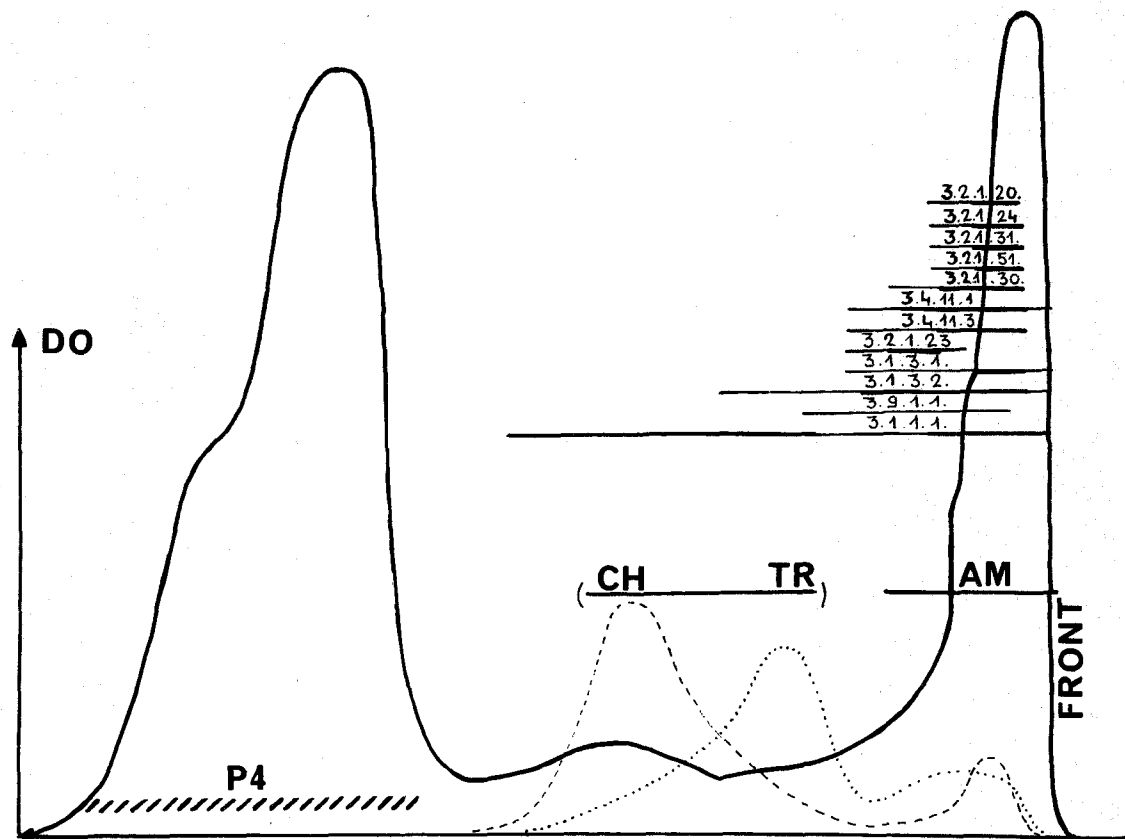


Figure 1. Profil d'élution du surnageant de broyat de pelotes mésentériques sur Sephadex G 75.

AM : activité amylasique; CH : activité chymotrypsique; TR : activité trypsique; (—) fractions "protéasiques" réunies; autres activités enzymatiques détectées : 3.2.1.20. α -glucosidase; 3.2.1.24. α -mannosidase; 3.2.1.31. β -glucuronidase; 3.2.1.51. α -fucosidase; 3.2.1.30. N-acétyl- β -glucosaminidase; 3.4.11.1. leucine arylamidase; 3.4.11.3. cystine arylamidase; 3.2.1.23. β -galactosidase; 3.1.3.1. phosphatase alcaline; 3.1.3.2. phosphatase acide; 3.9.1.1. phosphoramidase; 3.1.1.1. estérases (C₄ et C₈). P₄ fractions réunies puis éluées sur Biogel P₄.

Tableau 1. Variation saisonnière des valeurs du rapport de l'activité spécifique amylasique sur l'activité spécifique chymotrypsique : rapport A/C.

| JUIN | OCTOBRE | FEVRIER | MAI | JUIN | JUILLET | OCTOBRE |
|--------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|
| 67 ± 8 | 32 ± 9 | 25 ± 10 | 17 ± 6 | 78 ± 27 | 37 ± 25 | 26 ± 3 |

Lors des expériences de nutrition avec des fragments de manteau de moule, tant avec des actinies en aquarium, qu'avec des pelotes mésentériques isolées (lors des expériences d'incorporation de leucine), nous n'avons pas pu mettre en évidence de variations significatives des activités spécifiques trypsiniques et chymotrypsiques.

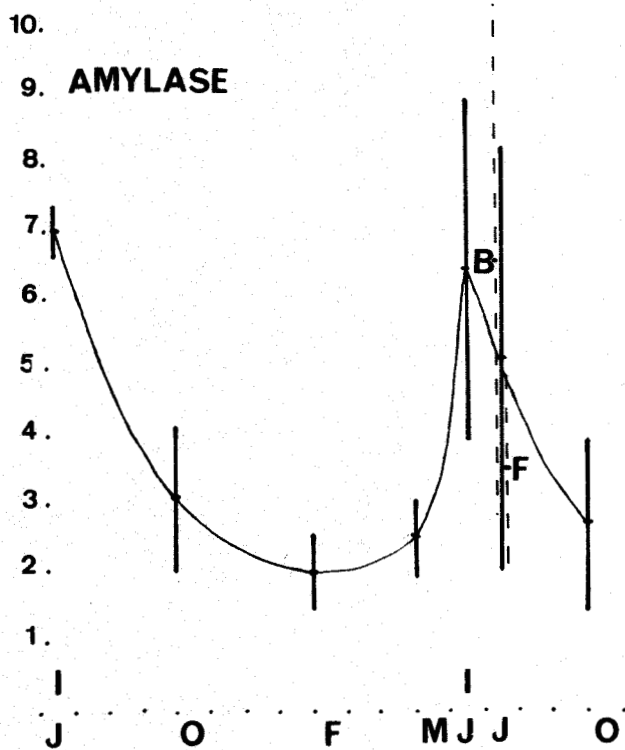


Figure 2. Variation saisonnière de l'activité spécifique amyliasi- que (mU/mg de protéine).

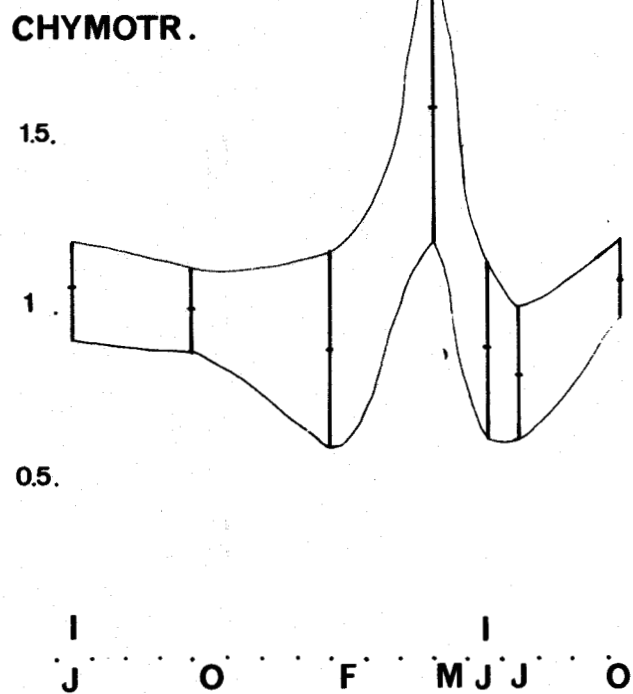


Figure 3. Variation saisonnière de l'activité spécifique chymo- trypsique (mU/mg de protéine).

2. Incorporation de L-leucine 14-C(U), chez Actinia equina.

2 a. Mesure en scintillation liquide.

Tableau 2. Mesure en scintillation liquide de la radioactivité incorporée dans les différentes fractions réunies selon leur poids moléculaire (PM). ² La radioactivité est exprimée en équivalents de picomoles de leucine 14-C. J:lots "à jeun", N:lots "nourris".

| % de radioactivité incorporée | | | | | radioactivité par mg de protéine ² | | |
|-------------------------------|---|-------------|-------|-------------|---|-------|-------------|
| | | PM > 30.000 | TR+CH | PM < 20.000 | PM > 30.000 | TR+CH | PM < 20.000 |
| 45' | J | 1,5 | 0,9 | 97,6 | 87 | 44 | 1713 |
| 45' | N | 1,9 | 1,1 | 96,9 | 38 | 23 | 1033 |
| 3h30 | J | 6,4 | 3,0 | 90,6 | 145 | 77 | 776 |
| 3h30 | N | 6,6 | 1,3 | 92,1 | 128 | 39 | 641 |
| 6h30 | J | 17,9 | 6,4 | 75,7 | 747 | 192 | 965 |
| 6h30 | N | 7,1 | 2,7 | 90,2 | 220 | 52 | 1010 |
| 9h30 | J | 26,1 | 7,8 | 66,1 | 896 | 174 | 623 |
| 9h30 | N | 13,8 | 4,9 | 81,3 | 267 | 98 | 861 |
| 24h | J | 21,6 | 5,6 | 72,8 | 655 | 134 | 639 |
| 24h | N | 16,6 | 5,4 | 78,0 | 384 | 107 | 713 |

Une radioactivité apparaît dans les milieux de culture (eau de mer filtrée dépourvue de leucine 14-C) où sont transférées les pelotes après le temps d'incorporation. La radioactivité augmente plus fortement dans les milieux de culture des lots "nourris" que dans ceux des lots "à jeun" d'un facteur 5. Elle apparaît dès 15 minutes après le début de la digestion, et est liée à des peptides et des acides aminés.

2 b. Autoradiographie sur coupes semi-fines.

Au temps 45 minutes le marquage est homogène au niveau des entéroïdes, il est plus faible au niveau de la paroi des mésentères. Aux temps 3, 6 et 9 heures la densité des grains d'argent impressionnés est plus élevée à la base des entéroïdes. Certaines cellules de cette zone sont de plus sélectivement marquées, il semble s'agir principalement de cellules glandulaires en phase de synthèse. Dès le temps 3 heures des cellules mobiles de la mésogléa apparaissent également marquées. Au temps 23 heures la densité de grains d'argent est globalement réduite par rapport aux temps précédents. A aucun des temps observés les cellules glandulaires fonctionnelles, en position apicale, ne sont sélectivement marquées.

DISCUSSION

1. Variation saisonnière de l'activité spécifique amylasique et de la valeur du rapport A/C.

Les fluctuations de l'activité amylasique ne semblent pas corrélées à l'utilisation des réserves glycogénolipidiques au cours de l'hiver, ou du jeûne. La valeur du K_m apparent : $0,7 \pm 0,2$ mg d'amidon soluble Merck/ml (VAN PRAET, 1981 b) est proche de celles d' α -amylases d'autres invertébrés marins : Palaemon serratus (VAN WORMHOUDT, 1981), Artemia salina (LE COZ et SAMAIN, communication personnelle). L'activité amylasique dosée semble donc bien correspondre à une activité digestive et ses variations peuvent être liées à des régulations nutritionnelles.

Les fluctuations saisonnières de l'activité amylasique et de la valeur du rapport A/C (figure 2, tableau 1) sont en accord avec notre hypothèse antérieure sur la participation d'éléments végétaux (phytoplancton, débris de macroalgues) au régime alimentaire de nombreuses espèces d'Actiniaires (VAN PRAET, 1980, 1981 a).

Les valeurs élevées des écart-types des lots de juin et juillet 1981 témoignent d'une forte variabilité individuelle. Celle-ci recoupe, en partie, des échantillonnages dans des microenvironnements différents : flaques permanentes des hauts niveaux (F) et bas niveaux exondés (B). A ces microenvironnements peuvent correspondre des conditions trophiques, mais aussi des luminosités, des températures différentes qui peuvent interférer dans les phénomènes de régulation des taux d'amylase, comme cela a été mentionné chez les crustacés (SAMAIN et al., 1980, VAN WORMHOUDT, 1981).

Les variations saisonnières des activités spécifiques trypsiques et chymotrypsiques (VAN PRAET, 1981 a; figure 3) sont au contraire de faible amplitude. L'étude des phénomènes d'activation, de dénaturation thermique, des vitesses maximales d'hydrolyse et des K_m à

différentes températures de ces deux enzymes chez Actinia equina permet de considérer les conditions de dosage comme satisfaisantes (VAN PRAET, 1981 b).

Pour tenter d'expliquer cette stabilité des taux de protéases y compris au cours de la digestion, les résultats des incorporations de leucine 14-C permettent de trancher entre deux hypothèses : le stock de protéases serait renouvelé en cours de digestion grâce à des synthèses rapides, ou seule une faible proportion des protéases dosées serait sécrétée lors de la digestion. C'est cette seconde hypothèse qui semble le mieux en accord avec les résultats obtenus (tableau 2, schéma 1).

2. Site et vitesse de synthèse des protéases.

L'examen des autoradiographies confirme l'observation antérieure, effectuée avec un mélange d'acides aminés (VAN PRAET, 1980), de l'absorption préférentielle de ceux-ci par les cellules des entéroïdes et non par les cellules phagocytaires de la paroi des mésentères.

Les processus de synthèses protéiques apparaissent relativement lents chez Actinia equina; chez les mammifères l'incorporation de leucine s'effectue en une heure et apparaît localisée dans les granules de zymogène en position fonctionnelle dès deux heures d'expérience (revue de Case, 1978). Chez Actinia equina l'incorporation dans les protéines (protéases et grosses protéines) croit durant 9 heures (tableau 2). Sur les autoradiographies elle reste localisée dans des cellules de la base des entéroïdes (schéma 1). Ces durées d'incorporation sont du même ordre que celles observées par GOSLINE 1971 lors d'expériences d'incorporation de proline dans le collagène de la mésoglyée d'Aiptasia (10 heures).

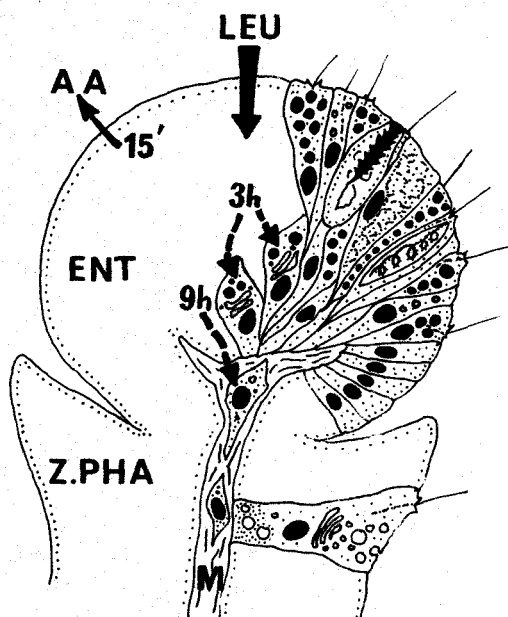


Schéma 1. Coupe transversale de l'extrémité d'une cloison mésentérique.

ENT : entéroïde; M : mésoglyée;
Z.PHA : zone de la paroi des mésentères riche en cellules phagocytaires. LEU → l'absorption de la leucine s'effectue principalement au niveau de l'entéroïde.

AA ← rejet d'acides aminés et de peptides marqués dès 15 minutes de digestion.

3h → incorporation de métabolites radioactifs par les cellules de la base des entéroïdes, marquées sélectivement à partir du temps 3 h.
9h → incorporation de métabolites dans les cellules mésoglyéennes du temps 3 h au temps 9 h.

Les pelotes en phase de digestion extracellulaire (15 mn à 8h 30) semblent incorporer la leucine moins rapidement dans leurs protéines que celles laissées à jeun (tableau 2). Deux phénomènes peuvent néanmoins fausser le taux apparent d'incorporation. Premièrement les acides aminés produits par la digestion (MURDOCK, 1971)

peuvent créer une dilution isotopique; deuxièmement l'expulsion d'acides aminés et de peptides marqués dès 15 minutes de digestion diminue la quantité de précurseurs radioactifs disponibles pour les synthèses protéiques.

La lenteur des processus d'incorporation, leur localisation préférentielle dans des cellules de la base des entéroïdes et la non détection de protéines radioactives dans les milieux de chasse au cours de la digestion vont à l'encontre de l'hypothèse d'une synthèse rapide de protéases capable de compenser une diminution massive du stock protéasique au cours de la digestion extracellulaire de proies.

Sans exclure que des phénomènes non décelés, tels que la présence d'inhibiteurs, puissent interférer lors des dosages quantitatifs, l'hypothèse la plus simple pour expliquer la stabilité apparente des taux de protéase au cours de la digestion est que seule une faible proportion du stock protéasique est alors émise.

Les observations cytologiques, les résultats des incorporations de leucine et de l'enzymologie (VAN PRAET, 1981 b) font apparaître que les activités trypsiques et chymotrypsiques dosées révèlent les teneurs en formes zymogènes contenues dans l'ensemble du tissu, mais que seule une fraction de ce stock protéasique est mobilisable à un instant donné.

L'étude de la régulation des enzymes digestives devrait faire appel à des expériences de nutrition permettant de varier la nature du régime alimentaire et de tenter d'épuiser le stock protéasique. Ces expériences sont difficiles à réaliser chez les Actiniaires. Celles-ci présentent rapidement des phénomènes de satiété et refusent les proies fournies (SANDBERG et al., 1971). L'expérimentation sur les pelotes isolées permet de contrôler les processus de digestion extracellulaire de proies et les taux d'absorption de molécules ou particules fournies, mais au delà de 24 heures une chute globale des activités digestives enzymatiques témoigne de changements métaboliques importants dans ces tissus isolés, en culture.

CONCLUSION

Les difficultés de nutrition expérimentale et la méconnaissance des processus des synthèses protéiques chez les Actiniaires limitent encore la compréhension des phénomènes de régulation de leurs enzymes digestives.

Divers éléments : température du milieu, stress, inhibiteurs, par exemple, peuvent interférer avec les facteurs trophiques dans la régulation des enzymes dosées, comme cela a été mentionné chez les crustacés (SAMAIN et al., 1980; VAN WORMHOUDT, 1981). Néanmoins l'étude des amylases, des trypsines et chymotrypsines like des Actiniaires fait apparaître de nombreuses convergences avec les résultats obtenus par ces mêmes auteurs sur les crustacés.

Les fluctuations saisonnières des activités amylasiques et du rapport amylase/chymotrypsine constituent un indice convergent avec les expériences de nutrition particulière pour ne plus considérer Actinia equina comme une carnivore stricte. Elle peut, comme probablement de nombreux Cnidaires sessiles, utiliser des aliments de

diverses origines : proies mais aussi molécules dissoutes et éléments particuliers comme le phytoplancton, des débris végétaux et animaux, des bactéries.

BIBLIOGRAPHIE

- CASE M.R. -1978- Synthesis, intracellular transport and discharge of exportable proteins in the pancreatic acinar cell and other cells. Biol. Rev., 53, 211-354.
- COAN M.H. et TRAVIS J. -1970- Comparative biochemistry of proteases from a Coelenterate. Comp. Biochem. Physiol., 32, 127-139.
- DISALVO L.M. -1971- Ingestion and assimilation of bacteria by two Scleractinian coral species. In Experimental Coelenterate Biology. LENHOFF, MUSCATINE et DAVIS eds. Univ. Hawaii Press, Honolulu, 129-136.
- GIBSON D. et DIXON G.H. -1969- Chymotrypsin like protease from the sea-anemone Metridium senile. Nature, 222, 753-756.
- GOSLINE J.M. -1971- Kinetics of incorporation of 14-C proline into mesogleal protocollagen and collagen of the sea-anemone Aiptasia. In Experimental Coelenterate Biology. LENHOFF, MUSCATINE et DAVIS eds. Univ. Hawaii Press, Honolulu, 146-156.
- JEUNIAUX C. -1962- Digestion de la chitine chez les Actiniaires. Cah. Biol. Mar., 3, 127-139.
- KRIJGSMAN B.J. et TALBOT F.H. -1953- Experiments on digestion in sea-anemones. Arch. Int. Physiol., 61, 277-291.
- KRUKENBERG C. -1880- Ueber den Verdauungsmodus der Actinien. Vergl. Physiol. Stud., 1, 33-56.
- MURDOCK G.R. -1971- The formation and assimilation of alcohol soluble proteins during intracellular digestion by Hydra littoralis and Aiptasia sp. In Experimental Coelenterate Biology. LENHOFF, MUSCATINE et DAVIS eds. Univ. Hawaii Press, Honolulu, 137-145.
- NICOL J.A. - 1959- Digestion in sea-anemones. J. Mar. Biol. Ass. UK. 38, 469-476.
- SAMAIN J.F., MOAL J., DANIEL J.Y., LE COZ J.R. et JEZEQUEL M.-1980- The digestive enzymes amylase and trypsin, during the development of Artemia salina. Effect of food conditions. In The brine shrimp Artemia 2 Physiol. Bioch. Mol. Biol. Universa Press, 239-255.
- SANDBERG D., KANCIRUK P. et MARISCAL R. -1971- Inhibition of nematocyst discharge correlated with feeding in sea-anemone Calliactis tricolor (Lesueur). Nature, 232, 263-264.

- SOVA V.V., ELYAKOVA L.A. et VASKOVSKY V.E. -1970- The distribution of laminarinases in marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol., 32, 459-464.
- TIFFON Y. et BOUTIBONNES P. -1976- Nutrition particulière expérimentale de l'Anthozoaire Cerianthus lloydi. C.R. Acad. Sc. Paris, 282, 1629-1632.
- VAN PRAET M. -1980- Absorption des substances dissoutes dans le milieu, des particules et des produits de la digestion extracellulaire chez Actinia equina L. Reprod. Nutr. Dével. 20, 1393-1399.
- 1981 a- Comparaison des taux d'activité amylasique, trypsique et chymotrypsique ainsi que des types cellulaires intervenant dans la digestion chez les actinies littorales et abyssales. Océanis, 7, 687-703.
- 1981 b- Amylase, trypsin and chymotrypsin like of Actinia equina, their role in the nutrition. Comp. Biochem. Physiol. (sous presse).
- VAN WORMHOUDT A. -1981- Régulation d'activité de l' α -amylase à différentes températures d'adaptation et en fonction de l'ablation des pédoncules oculaires et du stade de mue chez Palaemon serratus. Biochem. Syst. Ecol. , 8, 193-203.

REMERCIEMENTS

Nous remercions l'équipe d'Ecophysiologie du Centre Océanologique de Bretagne (Brest) et le laboratoire de Physiologie du Muséum (Paris) pour les facilités d'instrumentation qu'ils nous ont procurées.