

Incidence écophysiological de l'absorption épithéliale d'acides aminés dissous par *Crassostrea gigas*

Ecophysiological relevance of dissolved amino acid transepidermal uptake in Crassostrea gigas

SOLANGE LE GALL, CHRISTIAN BECHEMIN

CNRS/IFREMER, UMR 10, INSU, CREMA, BP 5, 17137 l'Houmeau, France.

Tirés à part : S. Le Gall

RÉSUMÉ

L'huître filtre d'importants volumes d'eau de mer contenant de la matière organique dissoute. Lors d'un seul passage de l'eau à travers le filtre branchial, l'huître retient 20 à 50 % de la sérine dissoute aux concentrations naturelles du milieu ($< 5 \mu\text{M}$). L'absorption de sérine en fonction de la concentration croissante du milieu obéit à une cinétique hyperbole de type Michaélis-Menten, caractéristique d'un processus saturable médié par un transporteur. La constante de mi-saturation K_m , proche de $20 \mu\text{M}$ traduit la forte affinité des transporteurs membranaires pour la sérine et souligne les potentialités écologiques de l'absorption active d'acides aminés par l'huître aux concentrations des eaux estuariennes de Marennes-Oléron. ▲

Mots clés : absorption, acide aminé, mollusque.

ABSTRACT

The oyster *Crassostrea gigas* feeds by filtering of large volumes of seawater containing dissolved organic material. During a single passage of seawater across the gill, oyster is capable of removing 20 to 50 % of the serine dissolved in natural concentrations ($< 5 \mu\text{M}$). The absorption of serine according increasing concentrations of the medium follows a hyperbol curve, well described by Michaelis Menten kinetics, typical of a carrier-mediated saturable process. Estimation of the half-saturation constant K_m to $20 \mu\text{M}$, emphasizes the high affinity of the membrane transportes for serine and cubances the ecological potentiabilities of active amino acid uptake, at concentrations in the same range as in estuarine waters of Marennes-Oléron Bay. ▲

Key words : uptake, aminoacid, mollusc.

See Abridged version (p. 460)

L'importance du phytoplancton dans la nutrition de l'huître est bien connue. Cependant, au niveau de l'écosystème aquacole de Marennes-Oléron, les microalgues-fourrages ne suffisent pas pour rendre compte de la totalité des apports organiques dans le bilan énergétique de l'huître [1]. On sait par ailleurs que la production de chair des huîtres y est fortement corrélée avec la teneur en acides aminés dissous de l'eau environnante [2].

Du fait de leur comportement filtreur, les mollusques bivalves sont exposés à d'importants volumes d'eau de mer : la matière organique dissoute (MOD) pourrait

alors représenter pour eux une source alternative ou complémentaire de nutriment.

Cependant, la concentration en acides aminés du milieu intérieur des bivalves, de l'ordre de 0,1 à 0,5 M [3], est très supérieure à celle de l'eau de mer environnante, qui varie entre 0,5 et $20 \mu\text{M}$ [4, 5]. L'existence d'un tel gradient (10^6 environ) devrait entraîner une fuite d'acides aminés par diffusion des tissus vers le milieu extérieur. Au contraire, un mécanisme de transport épithélial actif des acides aminés, dirigé contre ce gradient, a été mis en évidence chez la moule [6] et chez l'huître juvénile *Ostrea edulis* [7] ou adulte *Crassostrea gigas* [8].

La sérine est un des acides aminés majoritaires des eaux côtières [9], où elle représente environ 20 % de la totalité

Note présentée par Maurice Durchon.

Note remise le 27 janvier 1994, acceptée après révision le 11 avril 1994.

des acides aminés dissous [10]. Sa concentration varie entre 0,2 et 16 μM dans les claires ostréicoles [11].

Afin d'évaluer l'importance du phénomène de captation de la MOD dans les conditions du bassin de Marennes-Oléron, nous avons contrôlé chez *Crassostrea gigas* l'existence d'une absorption épithéliale de sérine aux concentrations habituelles du milieu. L'analyse de la cinétique d'absorption pour des concentrations expérimentales croissantes d'acide aminé a ensuite permis de préciser la nature du processus membranaire impliqué dans l'absorption.

Matériel et méthodes

Des huîtres *Crassostrea gigas* d'un an (environ 5 cm et 1 g de poids sec de chair) sont stockées dans le marais expérimental du CREMA. Après brossage de la coquille, les animaux sont acclimatés 24 h au laboratoire en milieu thermiquement contrôlé, dans un bac de 150 l d'eau de mer décantée et brassée.

De manière à minimiser la compétition bactérienne face au processus étudié, chaque huître filtre pendant 2 fois 15 mn une eau de mer artificielle stérilisée par double passage sur membrane polycarbonate à 0,22 μm , Nucléopore SN 111 106.

L'animal en expérience est placé successivement dans 6 bacs de 400 ml d'eau de mer enrichie en concentrations croissantes de sérine (0/1/5/10/50/100 μM). Sans aucun ajout de sérine, la mesure de la concentration en acides aminés libres constitue le « blanc » expérimental, qui correspond à la concentration en acides aminés dissous présents naturellement dans l'eau de mer oligotrophe qui sert à préparer les solutions. Salinité et température sont ajustées au même niveau que dans le marais et une agitation magnétique douce assure l'homogénéité du milieu. Après entrebaillement des valves et ouverture des siphons inhalant et exhalant, 3 min de filtration suffisent pour purger la chambre branchiale de son contenu initial en eau de mer.

La concentration en acides aminés de l'eau du bac est suivie toutes les 15 min par prélèvement de 3 fois 500 μl de milieu. Parallèlement, des échantillons d'eau de mer

filtrée par l'huître sont prélevés directement dans le siphon exhalant à l'aide d'une fine canule coudée, à une vitesse d'aspiration très inférieure à celle du courant exhalant de l'huître. Les échantillons sont ensuite stockés dans des tubes de verre et rapidement congelés à $-20\text{ }^\circ\text{C}$. La verrerie a été préalablement calcinée pour éviter toute contamination organique.

Le dosage global des acides aminés est réalisé par analyse en flux continu du complexe fluorescent acide aminé/OPA (o-phthaldialdéhyde) [9, 12]. L'excrétion de matière organique par l'huître (NH_4 et urée) est suivie en analyseur à flux continu SKALAR de manière à valider le dosage à l'OPA [12]. Les données sont traitées statistiquement par un programme informatique de régression non linéaire [13].

Résultats

Mise en évidence d'une absorption de sérine aux concentrations naturelles du milieu

- Influence de la filtration de l'huître sur la teneur en acides aminés du milieu

L'eau de mer artificielle stérile de salinité 34 ‰ utilisée pour l'expérience contient des acides aminés naturels dissous à la concentration de $0,63\ \mu\text{M}\cdot\text{l}^{-1} \pm 0,08$ ($n = 8$). Lorsqu'une huître filtre activement pendant 1 h, à $12\text{ }^\circ\text{C}$, cette eau de mer stérile non enrichie, la teneur en acides aminés naturels du milieu diminue progressivement de 0,6 μM à 0,3. Lorsque le milieu est enrichi en sérine, à des concentrations faibles comparables à celles qui existent naturellement dans les eaux côtières, la concentration est globalement réduite de moitié après une heure de filtration : 1 μM à 0,3 et 5 μM à 2 (Fig. 1). A l'inverse, si l'huître se referme ou lorsqu'on maintient les deux valves de la coquille closes par un lien, la teneur du milieu demeure inchangée.

- Absorption de la sérine par l'huître

L'analyse des échantillons d'eau prélevés au niveau des siphons inhalant et exhalant permet de comparer à un

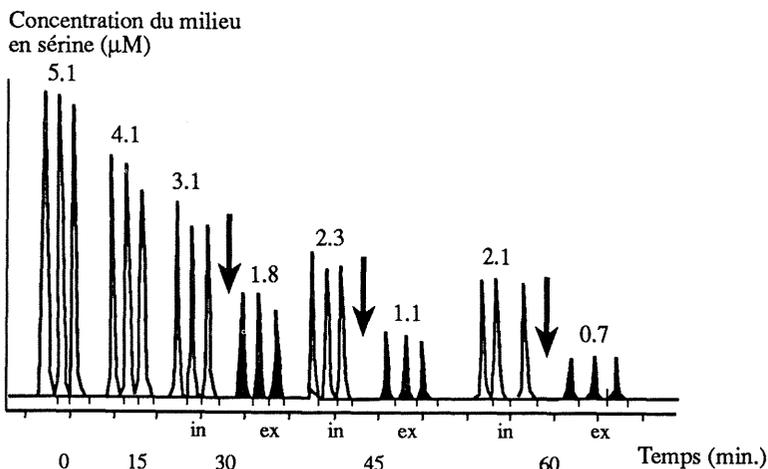
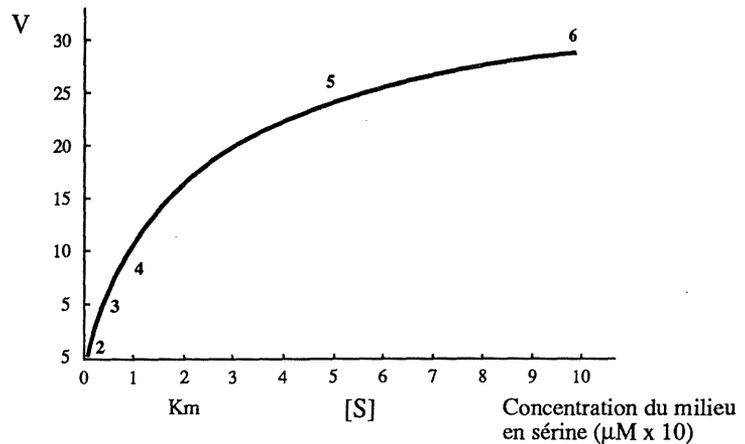


Figure 1. Absorption de sérine par *Crassostrea gigas* filtrant une eau de mer artificielle stérile enrichie à 5 μM de sérine (salinité 34 ‰ et température $12\text{ }^\circ\text{C}$). \blacktriangledown capture ponctuelle de sérine lors d'un seul passage de l'eau à travers le filtre branchial (concentration siphons inhalant-exhalant).

Figure 2. La captation épithéliale de sérine en fonction de concentrations croissantes du milieu suit une cinétique de type Michaelis-Menten, caractéristique d'un processus de transport actif saturable, médié par transporteur membranaire (à 12°C et 34‰ de salinité, $K_m = 20 \mu M$).

Vitesse d'absorption de la sérine ($\mu M \cdot hr^{-1} \cdot g^{-1}$)



même instant la concentration de l'eau avant et après filtration. Lors d'un seul passage à travers la chambre branchiale, 20 à 60 % de la sérine dissoute dans l'eau à une concentration de $5 \mu M$ est retenue par l'huître (Fig. 1).

Ponctuellement, on peut observer un relargage important, mais temporaire, de matière azotée par le siphon exhalant. Ce pic correspond à une excrétion azotée de l'huître. L'analyse au SKALAR permet de préciser qu'une huître de poids sec 1 g excrète environ $0,3 \mu M$ d'urée et $2 \mu M$ de NH_4 par heure dans une solution à $1 \mu M$ de sérine, $1 \mu M$ d'urée et $3 \mu M$ de NH_4 dans une solution à $5 \mu M$ de sérine et $1 \mu M$ d'urée et $5 \mu M$ de NH_4 dans une solution à $10 \mu M$ de sérine. Dans ces conditions, on peut considérer que l'interférence de NH_4 dans le dosage des acides aminés est négligeable [12].

Analyse cinétique et performance du mécanisme d'absorption épithéliale de la sérine

La vitesse de captation de la sérine est mesurée pour des concentrations expérimentales croissantes, pour certaines très supérieures à celles du milieu naturel (0,6/1/5/10/50 et $100 \mu M$). Une étude cinétique menée à 12°C et 34‰ de salinité, montre que la vitesse de captation de la sérine par l'huître demeure d'abord proportionnelle à la concentration du milieu. La courbe s'infléchit ensuite pour approcher une constante, qui traduit le potentiel maximal de captation de la sérine par l'huître (Fig. 2).

La constante de Michaelis (K_m), évaluée par régression non linéaire [13] est égale à $20 \mu M$ dans les conditions de l'expérience.

Discussion

Dans une eau de mer stérile, enrichie à l'origine par de la sérine à des concentrations naturelles (0,6 à $5 \mu M$), la filtration par *Crassostrea gigas* entraîne l'épuisement progressif de l'acide aminé dissous. La comparaison des concentrations au niveau des siphons exhalant et inhalant montre que lors d'un seul passage à travers la chambre

branchiale, 20 à 60 % de la sérine en solution est retenue (Fig. 1).

La vitesse de captation de la sérine par l'huître dans des solutions expérimentales de concentrations croissantes, obéit à une cinétique hyperbole de type Michaelis-Menten (Fig. 2), caractéristique d'un processus actif et saturable, médié par un transporteur membranaire.

La constante de mi-saturation K_m à $20 \mu M$ calculée à 12°C et pour une salinité de 34‰ traduit une forte affinité entre la sérine et les transporteurs membranaires de l'épithélium palléal de l'huître et souligne les performances du mécanisme épithélial de captation. Cette valeur du K_m pour la sérine, est du même ordre que celles obtenues pour l'alanine ($17 \mu M$) et la glycine ($12 \mu M$) chez les larves d'*Ostrea edulis* [7] et inférieure au K_m de $34 \mu M$ déterminé pour l'alanine chez l'huître en filtration forcée [8].

On peut se demander quelle est la spécificité des récepteurs membranaires qui assurent activement le transport des acides aminés. L'inhibition réciproque partielle de l'absorption d'alanine versus la lysine, l'aspartate et la phénylalanine chez *Crassostrea gigas* [8] suggèrent qu'un même transporteur membranaire peut assurer le transit de plusieurs acides aminés. Dans ce cas, l'absorption de la sérine seule serait bien représentative de l'absorption d'un mélange naturel d'acides aminés à concentration globale équivalente.

On ignore quel est le rôle de cette absorption épithéliale d'acides aminés : contribue-t-elle de manière significative au métabolisme énergétique de l'huître? L'alanine marquée en solution $5 \mu M$ se concentre au niveau des tissus de la branchie et du manteau de *Crassostrea gigas* [8]. Le fait qu'on ne la retrouve qu'en faible quantité dans l'hémolymphe pourrait signifier qu'elle a été rapidement métabolisée.

Les conditions axéniques de l'expérimentation minimisent l'éventualité d'une captation compétitive de l'acide aminé étudié par le bactérioplancton. Une étude en microscopie à balayage a montré l'absence de microflore bactérienne au niveau de l'épithélium palléal de l'huître [14]. Par ailleurs, on sait que les larves de *Mytilus edulis* sont capables de

prélever activement la glycine face à une population de bactéries marines [15].

Dans les eaux littorales où les concentrations naturelles en acides aminés dissous varient, dans l'espace et le temps, entre 0,5 et 20 μM [4], la sérine qui représente environ 20 % de la totalité des acides aminés dissous [10]

Remerciements : Françoise Mornet, technicienne IFREMER, a participé à ce travail en assurant les dosages de NH_4 et d'urée.

ABRIDGED VERSION

Because of their filter feeding habits, oysters are exposed to large volumes of sea water containing dissolved organic material. Active transepidermal uptake of amino acids, against a 10^6 concentration gradient has been experimentally demonstrated in mussels and oysters. Our study supports the evidence of such a mechanism for serine uptake in *Crassostrea gigas*. Each oyster was placed in 400 ml artificial sea water supplemented with increasing concentrations of serine (0.6 to 100 μM). Medium was sterile to avoid bacterial competition.

Derivatization by OPA (o-phthaldialdehyde) allowed rapid and accurate measurements of global free aminoacids by flow injection analysis.

Removal of serine during a single passage of sea water across the gill screen was tested by comparing serine concentrations of samples taken from a canula inserted into the excurrent siphon *versus* samples at the incurrent margin. About 50 % of the 0.6 or 1 or 5 μM free amino acid is uptaken from the filtrated

évolue donc entre 0,1 et 5 μM . Dans les claires ostréicoles atlantiques, la concentration en sérine varie entre 0,2 et 16 μM [11]. L'évaluation du K_m de la sérine aux environs de 20 μM suggère donc la pertinence d'une captation active d'acides aminés par l'huître aux concentrations existant naturellement dans l'écosystème aquacole de Marennes-Oléron. ▼

sea water during the brief transit through the mantle cavity of actively pumping *Crassostrea*. By using an axenic system, any contribution of prokaryote contaminant to the observed uptake must be negligible compared that of the eukaryote bivalve under study.

Uptake of serine, according increasing concentrations of the medium (0.6 to 100 μM) follows a hyperbol experimental curve, well described by Michaelis-Menten kinetics, typical of a carrier-mediated saturable process. The calculation of the half-saturation constant (K_m) provides an estimation of the efficiency of aminoacid uptake in a range of realistic *in situ* concentrations and thus indicates whether the oysters are adapted to local specific concentrations. In Marennes-Oléron Bay, aminoacid concentrations are 0.5 to 20 μM in near-shore or ponds waters. The estimation of K_m for serine to 20 μM by non linear regression emphasizes the ecological relevance of transepidermal aminoacid uptake by *Crassostrea gigas* at natural range of concentrations occurring in their estuarine oyster farming ecosystem. ▲

RÉFÉRENCES

1. Heral M. 1985. Evaluation of the carrying capacity of molluscan shellfish ecosystems (éditions IFREMER). *Shellf. Cult. Dev. Manag.* 287-317.
2. Heral M., Deslous-Paoli J. M., Razet D., Prou J. 1984. Essai de mise en évidence *in situ* de paramètres biotiques et abiotiques de l'eau et de l'interface eau-sédiment intervenant dans la production de l'huître. *Oceanis* 10 (4): 465-75.
3. Zurburg W., De Zwaan A. 1981. The role of aminoacids in aerobiosis and osmoregulation in bivalves. *J. Exp. Zool.* 215: 315-25.
4. Feuillet-Girard M., Heral M., Sornin J. M., Deslou-Paoli J. M., Robert J. M., Mornet F., Razet D. 1988. Eléments azotés de la colonne d'eau et de l'interface eau-sédiment du bassin de Marennes-Oléron: influence des cultures d'huîtres. *Aquat. Living. Ressour.* 1: 251-65.
5. Poulet S. A., William R., Conway D. V. P., Videauc. 1991. Cooccurrence of copepods and dissolved free aminoacids in shelf sea waters. *Marine Biology* 108: 373.
6. Wright S. H., Pajor A. M. 1989. Mechanisms of integumental amino acid transport in marine bivalves. *Am. J. Physiol.* 257: R 473-83.
7. Rice M. A., Wallis K., Stephens G. C. 1980. Influx and net flux of aminoacids into larval and juvenile european flat oysters, *Ostrea edulis* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 48: 51-9.
8. Rice M. A., Stephens G. C. 1987. Uptake and internal distribution of exogenously supplied aminoacids in the pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 66: 19-31.
9. Petty R. L., Michel W. C., Snow J. P., Johnson K. S. 1982. Determination of total primary amines in seawater and plant nectar with flow injection sample processing and fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta.* 142: 299-304.
10. Thurman E. M. 1986. Amino acids. In: Nijhoff M., Junk W., eds. *Organic geochemistry of natural waters*. Dordrecht: 151-80.
11. Maestrini S. Y. et Robert J. M. 1987. La production micro-algale des claires à huîtres: particularités nutritionnelles, importance de l'azote organique dissous. *IFREMER Act. Coll.* 5: 185-214.
12. Delmas D., Frikha M. G., Linley E. A. S. 1990. Dissolved primary amine measurement by flow injection analysis with o-phthaldialdehyde: comparison with high-performance liquid chromatography. *Mar. Chemistry* 29: 145-54
13. Brooks S. P. J. 1922. A simple computer program with statistical tests for the analysis of enzyme kinetics. *Biotechniques* 13: 906-11.
14. Garland C. D., Nash G. V., McMeekin T. A. 1982. Absence of surface-associated microorganisms in adult oysters (*Crassostrea gigas*). *Appl. environ. Microbiol.* 1205-11.
15. Manahan D. T., Richardson K. 1983. Competition studies on the uptake of dissolved organic nutrients by bivalve larvae (*Mytilus edulis*) and marine bacteria. *Mar. Biology* 75: 241-7.