

## Absorption directe d'un acide aminé par *Phoronis psammophila*

C. C. Emig et Y. Thouveny

Station Marine d'Endoume; Marseille, France et

Laboratoire d'Histologie et de Morphogénèse Animale, Centre Universitaire de Luminy; Marseille, France

---

### Abstract

#### *Direct Uptake of an Amino-Acid by Phoronis psammophila*

Experiments on  $^{14}\text{C}$ -valine uptake by *Phoronis psammophila* Cori revealed polyphasic kinetics of uptake at external concentrations higher than  $1.5\ \mu\text{M}$ . This uptake displays seasonal variations, with a maximum in summer. In winter, increases in uptake are induced by preincubation in high amounts of amino-acids in the external medium; such increases are, however, inhibited by the action of cycloheximide.

---

### Introduction

L'absorption directe par des invertébrés marins de substances organiques dissoutes dans le milieu marin est considérée comme un processus normal de nutrition par assimilation directe à travers des téguments avec gain de substances (Stephens, 1968; Taylor, 1969; Ferguson, 1971; Southward et Southward, 1972; Tiffon et Daireaux, 1974). Nous avons entrepris l'étude expérimentale de l'influence des variations de concentration d'un acide aminé sur le taux d'absorption au cours du cycle annuel chez *Phoronis psammophila* Cori (Phoronida: Lophophorata), qui vit dans un biotope vraisemblablement affecté par de grands changements de la concentration en substances organiques dissoutes. Ces apports organiques proviennent des courants en fonction des vents dominants (Est; Nord-Ouest) et du déversement temporaire d'un petit fleuve côtier près du lieu de récolte.

### Matériel et méthodes

*Phoronis psammophila* est récoltée sur la plage du Prado (Marseille) à une profondeur de 5 m. Les animaux, par lot de trois, sont incubés dans 10 ml d'eau de mer stérile contenant  $100\ \mu\text{g}$  par ml de chloramphénicol pour éviter la prolifération bactérienne. Les expériences sont conduites à  $20^\circ\text{C}$ , ou à des températures plus basses ( $10^\circ$  et  $2^\circ\text{C}$ ) pour établir le

coefficient d'absorption lié à la température ( $Q_{10}$ ). La  $^{14}\text{C}$ -valine (D-L-valine), d'activité spécifique 73 C/mM, est ajoutée à différentes concentrations dans le milieu d'incubation; son choix a été guidé par le fait que cet amino-acide est parmi ceux dont la concentration est la plus basse dans les organismes marins (Florin, 1969) et qu'il ne paraît pas jouer un rôle comparable à celui d'acides aminés non essentiels dans les processus d'osmorégulation (Oglesby, 1969). On sait que, dans les systèmes cellulaires, la valine est absorbée par des réactions d'échanges et par un mécanisme de transport actif (Christensen, 1969). Les animaux ayant été exposés à la  $^{14}\text{C}$ -valine pendant différents laps de temps sont rincés dans une solution de valine "froide" et homogénéisés dans 1 ml d'eau distillée. Une aliquote de  $100\ \mu\text{l}$  est prélevée pour déterminer la concentration en protéines de l'homogénat (méthode de Lowry et al., 1951); 5 ml de TCA à 10% sont ajoutés à l'homogénat et le matériel TCA-insoluble est retenu sur filtre Millipore (HAWP-O,25; O,45). Les filtres, rincés par 2 ml de TCA à 5%, puis séchés aux rayons infrarouges, servent à déterminer la valeur de la  $^{14}\text{C}$ -valine liée aux protéines, qui s'avère être environ de 10% de la valeur totale absorbée. La valeur de la  $^{14}\text{C}$ -valine libre incorporée par les animaux est mesurée sur une aliquote de filtration (filtrat). Les mesures sont réalisées en scintillation liquide dans le toluène-PPO-POPOP, en présence de tri-

ton X-100 pour le filtrat aqueux. Les valeurs en cpm rapportées à la concentration en protéines sont les moyennes d'au moins cinq déterminations pour une même durée d'incorporation.

## Résultats

### Cinétique de l'absorption

Le volume interne des animaux utilisés (*Phoronis psammophila*) pour la détermination de l'absorption a été évalué à 60  $\mu$ l après calcul du poids sec. Ce volume a permis de calculer la concentration interne ( $\mu$ M) après chaque durée d'incubation. La Fig. 1 montre la cinétique de l'absorption pour différentes valeurs de concentrations du milieu d'incubation sur les animaux prélevés l'hiver. Les courbes A et B, représentant l'absorption du précurseur dans la fraction libre (FAA), suivent un profil diphasique très accentué, alors que les courbes C et D, correspondant à l'absorption du précurseur pour les concentrations les plus faibles, atteignent rapidement un plateau. Dans toutes nos expériences, réalisées pour des concentrations supérieures à 1,5  $\mu$ M, on observe après un premier maximum (après 30 min d'incubation) une légère décroissance de l'absorption; celle-ci est suivie par une nouvelle augmentation (généralement après 1 h d'incubation), pour atteindre un taux d'absorption trois fois supérieur à celui du premier maximum. Au second maximum fait suite une décroissance, elle-même suivie par une nouvelle phase d'incorporation (Fig. 2).

### Variations saisonnières de l'absorption

Chez les *Phoronis psammophila* récoltées en été, les cinétiques d'absorption présentent également des profils di- et polyphasiques pour des valeurs de concentration externe supérieures à 1,5  $\mu$ M. Cependant, le taux d'absorption est beaucoup plus élevé que chez les animaux prélevés en hiver, comme en témoignent les valeurs de concentration interne atteintes pour les différentes concentrations externes utilisées en fonction du temps d'absorption (Tableau 1).

Pour les concentrations utilisées, le facteur de concentration (concentration interne/concentration externe) est environ cinq fois supérieur pour la période estivale par rapport à celui de la période hivernale (Tableau 2). Il est vraisemblable que ce facteur soit plus élevé pour de fortes concentrations.

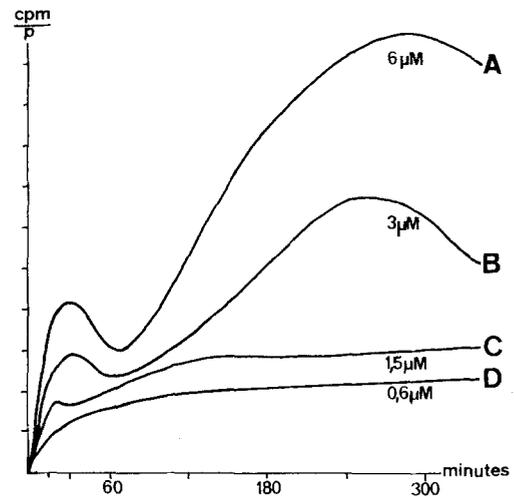


Fig. 1. *Phoronis psammophila*. Cinétique de l'absorption en fonction de la concentration externe en acide aminé (hiver). Ordonnée: cpm sur concentration en protéines des échantillons

Tableau 1. *Phoronis psammophila*. Valeurs de la concentration interne atteintes exprimées en  $\mu$ M pour différentes concentrations externes, en fonction du temps d'incubation, l'hiver et l'été. -: pas de données

Concentration externe ( $\mu$ M)	Concentration interne atteinte après (min)					
	15	30	60	120	180	240
Hiver						
6	6,99	7,3	5,7	11,3	14,6	18
3	5,8	4	6,6	4,8	6,8	10
Été						
15	60	85	84	333	280	-
6	-	19,6	28,2	51	61	-
3	5,3	10	17,5	22	-	-

Tableau 2. *Phoronis psammophila*. Facteur de concentration (rapport de concentration interne sur concentration externe)

Concentration externe ( $\mu$ M)	Été	Hiver
1,5	-	1,4
3	7,3	1,9
7,5	8,3	2
15	22,2	2,6

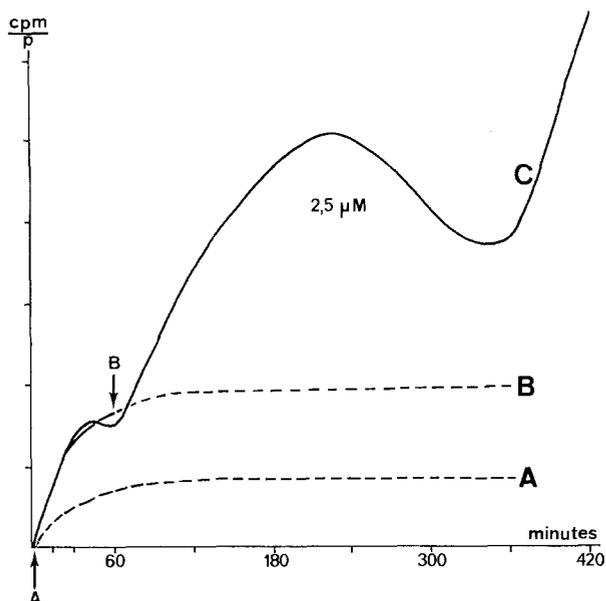


Fig. 2. *Phoronis psammophila*. Inhibition de l'absorption par la cycloheximide (hiver). Les flèches indiquent le début de la mise en contact avec la cycloheximide. Courbe A: cycloheximide dès le début de l'expérience; courbe B: cycloheximide ajoutée au milieu d'incubation après 1 h; courbe C: l'absorption normale (courbe témoin)

Tableau 3. *Phoronis psammophila*. Influence de la température sur l'absorption (cpm sur concentration en protéines des échantillons)

	Minutes						
	15	30	60	120	180	240	300
Température							
18°C	2,21	3,10	2,79	3,58	10,25	7,29	6,20
10°C	2,31	2,57	-	3,45	6,81	-	-
0-4°C	1,12	1,16	1,34	2,45	2,98	2,80	2,76
Inhibition (%) entre 0°-4°C et 18°C	50	63	52	32	71	62	56
Q <sub>10</sub>	1,88	2,67	2,08	1,46	3,44	2,60	2,25

Ces résultats suggèrent l'existence d'un mécanisme de transport actif, qui est nettement décelable lorsque la concentration externe de l'acide aminé est supérieure à 1,5 µM, principalement chez les animaux récoltés en période estivale.

#### Inhibition de l'absorption par inhibition du métabolisme énergétique

Nous avons pu analyser l'importance des mécanismes de transport actif en faisant varier la température d'incu-

bation, ou en étudiant l'action de la ouabaïne. La majeure partie de l'absorption pour la concentration utilisée (3 µM) est sous la dépendance du métabolisme énergétique. Les valeurs du Q<sub>10</sub> varient avec la durée d'incubation, mais demeurent significatives d'un système de transport actif (Tableau 3). Pour la concentration de 3 µM, le facteur de concentration passe de 8,6 à 20°C à 4,3 à 2°C. Pour les faibles concentrations (0,5 µM), ce facteur ne varie pas significativement en fonction de la température.

L'incorporation de la valine est également sensible à l'action de la ouabaïne (50 µg/ml), inhibiteur des systèmes de transport ATPase-dépendants; les pourcentages d'inhibition varient de 53 à 71% suivant la durée d'incubation.

Ces résultats confirment l'existence probable d'un transport actif pour des concentrations supérieures à 1,5 µM. Les différences de vitesses d'absorption entre les animaux récoltés en été et ceux en hiver suggèrent que le nombre de transporteurs est plus important chez les premiers.

#### Action de la cycloheximide

Les cinétiques d'absorption, obtenues chez *Phoronis psammophila*, nous conduisent à penser que des concentrations relativement importantes en acides aminés du milieu extérieur modifient le taux d'absorption, par action sur la synthèse protéique. Les expériences d'inhibition par la cycloheximide ont été effectuées aux deux périodes suivantes: février-mars et septembre-octobre. Lors de la première période l'action de cet inhibiteur a été éprouvée par deux séries d'expériences (Fig. 2): (1) Les animaux sont incubés dans une solution de <sup>14</sup>C-valine contenant, dès le début de l'expérience, la cycloheximide (courbe A); l'action de cette dernière diminue fortement l'absorption qui atteint rapidement un plateau, alors qu'elle présente les deux maximums chez les animaux témoins (courbe C); (2) la cycloheximide a été ajoutée au milieu d'incubation après 1 h (courbe B); dans ce cas, son action inhibe le second maximum de l'absorption. Lors de la seconde période, les courbes de l'absorption normale, comparées à celles obtenues en présence de cycloheximide (dès le début de l'expérience), montrent que l'inhibition de la synthèse protéique ne modifie pas le taux d'absorption. La concentration en acides aminés libres est même, chez les animaux traités à la cycloheximide, supérieure à celle des témoins.

Tableau 4. *Phoronis psammophila*. Expériences de pré-incubation en période hivernale (exprimés en cpm sur concentration en protéines des échantillons)

Concentration de la solution radioactive ( $\mu\text{M}$ )	Concentration de la solution de pré-incubation			
	8 $\mu\text{M}$ Lot 1		16 $\mu\text{M}$ Lot 2	
	Sans cycloheximide	Avec cycloheximide en % d'inhibition	Sans cycloheximide	Avec cycloheximide en % d'inhibition
32	14,1 $\pm$ 0,6	66	15,6 $\pm$ 0,5	75
16	6,1 $\pm$ 0,8	69	8,7 $\pm$ 0,5	63
8	3,1 $\pm$ 0,2	74	6,1 $\pm$ 0,2	61
4	2,2 $\pm$ 0,2	73	2,0 $\pm$ 0,3	63
2	1,0 $\pm$ 0,1	-	1,0 $\pm$ 0,1	-
1	0,5 $\pm$ 0,2	-	0,5 $\pm$ 0,1	-
0,5	0,3 $\pm$ 0	-	0,3 $\pm$ 0,1	-

#### Expériences de pré-incubation

Les résultats précédents suggèrent que la concentration externe en amino-acides agit sur le système de transport. Les phoronides, prélevées en période hivernale, sont pré-incubées pendant 1 h dans des milieux contenant respectivement 8 et 16  $\mu\text{M}$  de valine froide; chaque lot est ensuite séparé en 6 fractions et incubé pendant 30 min dans une solution à différentes concentrations de  $^{14}\text{C}$ -valine (Tableaux 4). Pour les concentrations inférieures à 8  $\mu\text{M}$  du milieu d'incubation, on n'observe pas de différence significative des taux d'absorption entre les deux lots. Par contre, l'absorption est significativement plus élevée dans le lot 2 que dans le lot 1, pour les concentrations de 8 et 16  $\mu\text{M}$  de la solution radioactive. Pour les concentrations inférieures à 8  $\mu\text{M}$ , l'efflux masque vraisemblablement l'importance de l'absorption.

Dans une autre série d'expériences, nous avons éprouvé simultanément l'action de la pré-incubation et de la cycloheximide pour chacun des lots. Les résultats, exprimés en pourcentage d'inhibition, figurent sur le Tableau 4; ils montrent que cet inhibiteur de la synthèse protéique annule l'accroissement de l'absorption sous l'influence de la concentration externe en amino-acide.

Chez les animaux récoltés pendant la période hivernale, la pré-incubation augmente donc le taux d'absorption de la valine probablement par synthèse de transporteurs.

#### Conclusions

L'étude de l'absorption de  $^{16}\text{C}$ -valine à différentes concentrations, chez *Phoronis psammophila*, nous a permis de mettre en

évidence l'existence d'un processus polyphasique se manifestant pour des concentrations supérieures à 1,5  $\mu\text{M}$ . Ce processus conduit à une accumulation d'acide aminé libre interne. L'absorption a lieu au travers des téguments, puisque des expériences réalisées sur des animaux autotomisés ou sectionnés (sans bouche ni anus) (Emig, 1972) ont fourni des résultats similaires.

La concentration interne est supérieure d'un facteur 2 pour les animaux en période hivernale et d'un facteur 7 à 20 au cours de la période estivale, par rapport à la concentration externe. Ceci suggère l'intervention d'un transport actif mis en évidence en période estivale. Ce fait est confirmé par l'effet sur l'absorption de la température et des inhibiteurs de l'ATP.

Il est probable que, pendant la période hivernale, le système de transport est pratiquement absent, mais il peut être induit par la présence d'acides aminés dans le milieu extérieur. Ainsi, on comprend pourquoi la cycloheximide diminue la fraction d'acides aminés libres internes, car elle arrête la synthèse induite des transporteurs l'hiver. L'été, le système est présent; il n'est pas induit par la concentration externe d'acides aminés, ce qui explique les vitesses élevées d'absorption et également l'action de la cycloheximide. Celle-ci, en bloquant la synthèse protéique, conduit à une accumulation d'acides aminés libres internes, mais n'empêche pas leur pénétration, d'où l'augmentation de la concentration d'acides aminés chez les animaux traités par rapport aux animaux témoins. Ceci correspond peut-être à une richesse supérieure du milieu marin en substances organiques directement assimilables pendant la période estivale.

*Remerciements.* Nous remercions le Dr. R. Jean-jean pour les échanges d'idées et les critiques sur les résultats. Ce travail a été effectué dans le cadre du contrat avec le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS-LA 41 et CNRS-LA 179).

#### Littérature citée

- Christensen, H.N.: Some special kinetic problems of transport. *Adv. Enzymol.* 32, 1-20 (1969)
- Emig, C.C.: Régénération de la région antérieure de *Phoronis psammophila* Cori (Phoronida). *Z. Morph. Tiere* 73, 117-144 (1972)
- Ferguson, J.C.: Uptake and release of free amino-acids by starfishes. *Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole* 141, 122-129 (1971)
- Florkin, M.: Nitrogen metabolism. *Chem. Zool.* 4, 147-160 (1969)
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)
- Oglesby, L.C.: Inorganic components and metabolism. *Chem. Zool.* 4, 211-301 (1969)
- Southward, A.J. and E.C. Southward: Observations on the role of dissolved organic compounds in the nutrition of benthic invertebrates. III. Uptake in relation to organic content of the habitat. *Sarsia* 50, 29-46 (1972)
- Stephens, G.C.: Dissolved organic matter as a potential source of nutrition for marine organisms. *Am. Zool.* 8, 95-106 (1968)
- Taylor, A.G.: The direct uptake of amino acids and other small molecules from sea water by *Nereis virens* Sars. *Comp. Biochem. Physiol.* 29, 243-250 (1969)
- Tiffon, Y. et M. Daireaux: Phagocytose et pinocytose par l'ectoderme et l'endoderme de *Cerithanthus lloydi* Gosse. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 16, 155-165 (1974)

Dr. C.C. Emig  
Station Marine d'Endoume  
Rue de la Batterie-des-Lions  
13007 Marseille  
France

Date of final manuscript acceptance: May 7, 1976. Communicated by J.M. Pérès, Marseille