

Variations mensuelles des acides aminés libres dissous (AALD) présents en un point de la rade de Villefranche-sur-Mer: utilisation par les larves de *Paracentrotus lividus* et de *Sphaerechinus granularis*

Jean-François Pavillon⁽¹⁾ et Pascale Rault⁽²⁾

⁽¹⁾ Institut océanographique. Laboratoire de Physiologie des Etres Marins, 195, rue Saint-Jacques, 75005 Paris, France.

⁽²⁾ Université de Marseille. Laboratoire de Microbiologie et Biochimie Marine, CNRS ER 223, Campus de Luminy, Case 907, 70, route de Léon-Lachamp, 13288 Marseille Cedex 9, France.

Received January 11, 1990; accepted February, 19, 1990.

Monthly variations of dissolved free amino acids (DFAA) observed in the Bay of Villefranche-sur-Mer, France: experimental study on their uptake by *Paracentrotus lividus* and *Sphaerechinus granularis* larvae.

Pavillon J.-F., P. Rault. *Aquat. Living. Resour.*, 1990, 3, 147-150.

La concentration des acides aminés libres dissous (AALD), dans le milieu marin, dépend du cycle saisonnier de la matière vivante. Ces AALD constituent une source nutritive pour les invertébrés et en particulier les larves. Ils sont absorbés par des mécanismes physiologiques et métabolisés (Stephens, 1988). Leur utilisation qualitative et quantitative par les larves d'oursin, au cours des différentes phases de développement est peu connue (Pavillon, 1985).

L'importance relative, du dissous et du particulaire, dans l'alimentation des larves d'invertébrés marins est encore mal connue et limitée principalement à l'étude d'une seule famille de molécules organiques simples.

A partir d'une étude analytique, des variations mensuelles (saisonnnières) de la concentration des AALD analysés à partir d'échantillons d'eau de mer prélevés en un point de la rade de Villefranche-sur-Mer, on s'est efforcé d'établir une relation entre la concentration, la nature des AALD et leur consommation par les larves.

L'eau de mer est prélevée par 7 m de profondeur à l'aide d'une bouteille Niskine. Dès son arrivée au laboratoire, l'eau de mer est filtrée sur membrane 0,22 µm (Gelman) puis congelée à -70°C.

L'analyse des AALD est effectuée par la technique de chromatographie liquide haute performance, selon la méthode décrite par Lindroth et Mopper (1979). Les acides aminés sont complexés avec l'ortho-phthalaldéhyde (OPA) et le 2 mercapto-éthanol, pour donner des composés fluorescents. Ceux-ci sont séparés sur une colonne de silice, en phase inversée (particules de 5 µm, colonne 4,6 mm × 250 mm, greffée par une chaîne alkyle en C18, Beckman), à l'aide d'un gradient acétate de Na 0,05 méthanol. L'évaluation des acides aminés se fait par la détermination de la fluorescence de l'effluent. La proline n'est pas dosée par cette technique. Alanine et tyrosine sont confondues sur les chromatogrammes.

Les expériences au laboratoire, sur les larves pluteus d'oursin, ont été effectuées en mars et octobre 1986 et en juin 1987 avec de l'eau de mer prélevée en décembre 1985, mars et octobre 1986 et juin 1987. Les larves sont obtenues axéniquement selon la méthode mise au point par Davis *et al.* (1983). Elle consiste, avant le recueil des gamètes, à dégager par grattage, un champ stérilisé à l'éthanol autour du pôle anal de l'oursin. La fécondation est effectuée en ambiance stérile sous hotte à flux laminaire et filtre

Tableau 1. — Concentration mensuelle des acides aminés libres dissous (AALD), dans l'eau de mer prélevée à 7 m de profondeur, en un point S, de la rade de Villefranche-sur-Mer. Les résultats sont donnés en nmol/l et en pourcentage de la totalité des AALD (l'absence de valeurs pour certains acides aminés correspond à la non détection par la méthode utilisée).

Monthly concentration of dissolved free amino acids (DFAA) in sea water collected at point S in the bay of Villefranche-sur-Mer at a depth of 7m. Results are given in nmol/l and as a percentage of the total number of DFAA (the absence of a value for certain amino acids signifies that none was detected by the method used).

AALD nmol/l %	1985			1986				1987					Moy.	Ecart-type			
	Oct. 15/	Nov. 19/	Dec. 1/	Jan. 21/	Fev. 26/	Mars 6/	Juin 24/	Oct. 7/	Nov. 26/	Dec. 16/	Jan. 26/	Mars 10/			Avr. 28/	Mai 12/	Juin 23/
ASP	43 0,06	132 0,08	122 0,09	120 0,07	83 0,04	341 0,11	62 0,10	175 0,08	283 0,09	188 0,08	198 0,08	75 0,05	93 0,13	154 0,03	94 0,08	144 0,008	83 0,03
THR	—	—	60 0,04	99 0,05	88 0,05	—	88 0,14	—	—	—	—	93 0,06	39 0,06	340 0,08	76 0,06	70 0,04	95 0,04
SER	205 0,28	379 0,24	359 0,24	454 0,25	547 0,28	600 0,20	132 0,21	336 0,16	674 0,21	335 0,15	389 0,16	284 0,18	189 0,27	1135 0,26	285 0,23	420 0,22	249 0,04
GLY	188 0,25	—	363 0,23	812 0,13	247 0,13	278 0,14	685 0,23	77 0,12	847 0,40	810 0,25	886 0,18	257 0,17	124 0,14	773 0,17	179 0,14	448 0,22	311 0,09
GLU	22 0,03	—	30 0,02	147 0,08	185 0,10	90 0,03	37 0,06	81 0,04	103 0,03	47 0,02	64 0,03	90 0,06	36 0,05	158 0,04	61 0,05	82 0,04	51 0,02
ALA+TYR	118 0,016	258 0,16	211 0,16	264 0,14	241 0,12	445 0,15	66 0,10	197 0,09	397 0,12	297 0,13	309 0,13	122 0,08	97 0,14	676 0,15	173 0,13	257 0,13	158 0,02
VAL	33 0,04	160 0,10	80 0,06	97 0,05	87 0,05	146 0,05	23 0,04	62 0,03	141 0,04	115 0,05	123 0,05	35 0,02	34 0,05	283 0,06	64 0,05	99 0,05	68 0,02
ILE	16 0,02	74 0,05	65 0,05	80 0,04	56 0,03	95 0,03	14 0,02	19 0,02	104 0,03	85 0,04	98 0,05	76 0,02	20 0,05	177 0,06	40 0,05	70 0,05	42 0,01
LEU	41 0,06	82 0,05	66 0,05	72 0,04	85 0,04	94 0,03	22 0,03	178 0,08	81 0,03	69 0,03	71 0,04	200 0,05	35 0,03	192 0,04	47 0,03	88 0,03	56 0,01
PIIE	16 0,02	33 0,02	35 0,03	40 0,02	—	56 —	—	26 0,01	57 0,02	43 0,02	47 0,02	—	—	100 0,02	28 0,02	44 0,01	22 0,01
HIS	14 0,02	15 0,01	35 0,03	43 0,02	95 0,02	138 0,05	21 0,03	60 0,03	158 0,05	—	—	103 0,06	31 0,04	172 0,04	101 0,06	76 0,03	56 0,02
LYS	2 —	12 0,01	5 0,01	9 —	4 —	—	—	—	—	—	38 0,02	137 0,08	8 0,01	69 0,02	34 0,03	41 0,02	32 0,02
ARG	9 0,01	18 0,01	15 0,01	44 0,02	36 0,02	45 0,02	14 0,02	62 0,03	54 0,03	38 0,03	64 0,01	17 —	—	65 0,01	8 0,01	35 0,01	24 —
ORN	12 0,02	24 0,02	21 0,02	33 0,02	15 0,01	53 0,02	2 0,00	49 0,02	80 0,03	40 0,02	5 —	2 —	—	19 —	4 —	5 —	4 —
ASN	1 —	3 —	3 —	4 —	8 —	8 —	2 —	4 —	7 —	5 —	—	6 —	—	15 —	3 —	6 —	4 —
TAU	—	—	1 —	4 —	7 0,01	—	7 —	5 —	—	—	—	—	—	—	—	1 —	12 —
MET	—	—	—	—	—	—	—	5 —	22 —	—	—	—	—	—	—	1 —	12 —
CIT	22 0,03	28 0,02	55 0,04	83 0,05	115 0,06	193 0,06	75 0,12	8 —	224 —	129 0,07	140 0,06	55 0,03	—	86 0,02	54 0,04	91 0,04	64 0,03
TRY	2	3	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
TOTAL	744	1584	1350	1840	1930	2979	642	2144	3195	2222	2432	1622	708	4421	1243	1937	1031

absolu. L'expérience se déroule à la température de 20°C. Les tests biologiques sont effectués dans les erlenmeyers de 25 ml, renfermant 20 ml d'eau de mer analysée, prélevée aux périodes indiquées précédemment et contenant de 80 à 100 larves d'oursin par millilitre. La consommation des AALD, par les larves est mesurée par comparaison des concentrations au début de l'expérience ($t=0$) et en fin d'expérience, au bout de 4 heures d'incubation ($t=4$ heures). Les échantillons d'eau de mer recueillis en fin d'expérience sont filtrés sur membrane 0,22 μm et conservés à -40°C, 3 mois maximum avant d'être analysés. Chaque test est renouvelé trois fois.

Variations mensuelles des AALD

Les variations mensuelles de concentration des AALD totaux d'octobre 1985 à juin 1987, sont comprises entre 640 et 4421 nmol/l (tabl. 1). Dix à quatorze acides aminés libres sont détectés. Les quatre plus abondants sont par ordre décroissant: la sérine, la glycine, l'ensemble alanine-tyrosine et l'acide aspartique qui représentent globalement 65 % du total des AALD détectés.

La plus faible concentration d'AALD a été observée en avril 1987, la plus forte en mai 1987.

CONSOMMATION DES AALD PAR LES LARVES PLUTEUS

La consommation des AALD par les larves pluteus des oursins *Paracentrotus lividus* et *Sphaerechinus granularis*, varie selon la phase trophique du développement (tabl. 2). Pendant la phase endotrophe, on observe, dans sept tests sur huit, au bout de 4 heures, une diminution de la concentration de 29,6 à 61,6 %. Pendant la phase exotrophe, trois tests sur les quatre effectués sur les larves âgées de 5 jours ne montrent pas une variation de la concentration totale des AALD.

L'analyse des variations individuelles des AALD montre des différences importantes entre les concentrations initiales et celles observées à la fin des tests. La diminution de la sérine est plus faible que pendant la phase précédente (0,025 à 0,24 pmol/larve/h). L'alanine et la tyrosine également (0,007 à 0,24 pmol/larve/h). En ce qui concerne la glycine, un seul test a montré une diminution de 0,25 pmol/larve/h (correspondant au minimum observé pendant la phase précédente).

CONCLUSION

La variation saisonnière de la concentration en AALD en un point de la rade de Villefranche-sur-Mer, ne peut donner qu'une idée approximative (en

Tableau 2. — Variation de la concentration totale en AALD (nmol/l) dans les milieux d'élevage des larves pluteus de *Paracentrotus lividus* et *Sphaerechinus granularis*, pendant une durée de 4 heures, au cours des phases endotrophes (pluteus âgés de 96 heures) et exotrophes (pluteus âgés de 120 heures), du développement. C_0 est la concentration des AALD à $t=0$; C_4 est la concentration de AALD, à $t=4$ heures, au bout de 4 heures d'incubation la concentration des larves est de 75 à 100 par ml).

Variation of the total concentration of DFAA (nmol/l), in places where the pluteus larvae of *Paracentrotus lividus* and *Sphaerechinus granularis* are reared, during a 4-hour period in the course of the endotrophic phases (pluteus aged 96 hours) and exotrophic phases (pluteus aged 120 hours) of growth. C_0 concentration of DFAA at $t=0$; C_4 concentration of DFAA at $t=4$ hours after 4 hours incubation (larvae concentration is 75 to 100 individuals per ml)

Larve pluteus	Age (heures)	Concentration (C_0) des AALD (nmol/l) à $t=0$	Concentration (C_4) des AALD (nmol/l) à $t=4$ heures	C_4/C_0 (%)
1985:				
<i>P. lividus</i>	96	3 187	2 230	0,69
	96	1 794	1 947	1,08
	120	1 824	1 750	0,95
1986:				
<i>P. lividus</i>	96	2 786	1 958	0,70
	96	2 152	1 354	0,62
<i>S. granularis</i>	96	1 349	793	0,58
	96	1 515	946	0,62
1987:				
<i>P. lividus</i>	96	1 688	637	0,37
	96	1 515	615	0,40
	120	1 247	1 242	0,99
	120	1 807	2 722	1,50

terme de concentration des AALD), des caractéristiques de l'écosystème côtier, soumis aux influences terrestres (eaux de ruissellement, rivières, activités humaines) et marines à caractère physique (courants, houle) et biologiques (floraisons printanières, dégradation de la matière organique).

L'absence de prélèvements de milieu pendant les mois d'été, ne permet pas d'établir les liens existant entre les périodes de faibles ou fortes concentrations, les périodes de floraison phytoplanktonique et les périodes de développement larvaire.

Les données recueillies sont à rapprocher de celles obtenues par Daumas (1988) pour les variations mensuelles des AALD dans la rade de Marseille, la richesse relative en glycine et en sérine serait due à l'excrétion et à la lyse des cellules algales. Aux variations saisonnières s'ajoutent des variations annuelles d'origine climatique.

L'existence de deux phases trophiques différentes, chez la larve pluteus d'oursin est confirmée par les variations quantitatives de la consommation des AALD. Pendant la phase endotrophe, qui dure jusqu'au quatrième jour, en l'absence de système digestif fonctionnel, l'organisme utilise ses réserves vitellines et les molécules organiques simples pompées dans le milieu. A cette phase trophique succède entre le cinquième et le sixième jour une phase exotrophe à partir de laquelle le tube digestif est fonctionnel et la larve se nourrit de particules. Les molécules organiques dissoutes absorbées ne constituent plus qu'un faible apport énergétique par rapport à la nourriture particulaire consommée.

Les acides aminés absorbés suivent deux voies métaboliques. Au cours de travaux antérieurs (Pavillon, 1985), nous avons montré que chez la larve de l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus*, pendant la phase dite endotrophe 7% de l'alanine absorbée était oxydée et 93% anabolisée. Pour les cinq principaux acides aminés dont la consommation, par *Paracentrotus lividus* et *Sphaerechinus granularis*, a été observée au cours des expériences décrites dans cette note, la valeur énergétique (1 g d'acide aminé nécessite 11 d'oxygène pour être oxydé et dégage 4,8 kcal) en équivalent calorique est : pendant la phase endotrophe de

0,3 à 1,6 $\mu\text{cal/larve/h}$ pour le premier et de 0,45 à 0,74 $\mu\text{cal/larve/h}$ pour le second. Pendant la phase exotrophe les valeurs sont de 0,08 à 0,7 $\mu\text{cal/larve/h}$ pour *Paracentrotus lividus*.

A chaque phase du développement larvaire correspond une évolution du métabolisme des AALD absorbés. La limite (durée) des différentes phases trophiques et la métabolisation des AALD absorbés, en fonction des conditions expérimentales, devront être précisées par des expériences ultérieures. L'existence d'une relation entre l'importance quantitative des AALD aux différentes périodes étudiées et l'importance de leur consommation par les larves au cours des tests effectués n'est pas établie. La consommation la plus importante est observée avec des échantillons d'eau de mer prélevés en juin 1987, à un moment où la concentration globale des AALD était assez faible (1243 nmol/l) mais la diversité la plus grande. En mars, octobre 1985, 1986, la consommation des AALD est relativement identique.

RÉFÉRENCES

- Daumas R. A., 1988. Les amino-acides dissous en milieu marin : distribution et facteur de régulation. *Océanis.*, **14**, 309-310.
- Davis J. P., G. C. Stephens, 1983. Uptake of neutral amino acids by bacteria free larvae of the Sand dollar *Dendraster excentricus*. *Am. Physio. soc.*, 733-739.
- Lindroth P., K. Mopper, 1979. HPLC determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with ortho-phthalaldehyde. *Anal. Chem.*, **51**, 1667-1674.
- Manahan D. T., J. P. Davis, G. C. Stephens, 1983. Bacteria free sea urchin larvae selective uptake of neutral amino acids from sea water. *Science*, **220**, 204-206.
- Pavillon J. F., 1985. Les substances organiques dissoutes : maillons de la chaîne alimentaire ou constituants permanents de l'alimentation chez les êtres marins? In: Caractères biologiques des eaux côtières. Colloque franco-japonais, Marseille, 16-21 septembre 1985, 121-131.
- Stephens G. C., 1988. Epidermal amino acid transport in marine invertebrates. *Biochimica et Biophysica Acta*, **947**, 113-138.