

2138

Bull. Inst. r. Sci. nat. Belg.
Bull. K. Belg. Inst. Nat. Wet.

44

40

Brux. 31.12.1968

**Vlaams Instituut voor de Zee**
*Flanders Marine Institute*ETUDE ELECTROPHORETIQUE DU SANG
D'EUPHAUSIA SUPERBA

PAR

W. DECLEIR (Gand)

INTRODUCTION.

Les eaux antarctiques offrent un milieu écologique unique à cause de leur basse température, leur très haute teneur en oxygène et leur forte concentration en substances nutritives. Dans ces conditions, il n'est pas étonnant qu'on puisse retrouver parmi les animaux qui peuplent ce milieu, des individus dont le métabolisme présente des aspects tout à fait particuliers. Il est encore impossible pour le moment de nous faire une idée générale de l'adaptation du métabolisme à cet écosystème très spécial que constitue l'Antarctique. En effet, notre connaissance de la physiologie et de la biochimie des animaux des régions polaires est presque inexistante du fait des difficultés que représente l'installation d'un laboratoire biologique bien équipé dans ces régions. Ainsi ce n'est pas une recherche systématique des propriétés du sang, mais l'aspect particulier de celui-ci qui a attiré l'attention de quelques chercheurs sur le fameux « ice-fish » décrit pour la première fois en 1931 par L. HARRISON et auquel J. T. RUUD a consacré une étude plus poussée (J. T. RUUD 1965). Il s'agit, en fait, de 16 espèces de poissons appartenant à la famille des chaenichthyidae qui se nourrissent du « Krill » et qui ont des branchies incolores à cause de l'absence dans leur sang d'érythrocytes et, par conséquent, d'hémoglobine. Ce dernier, pigment respiratoire rouge généralement répandu dans le sang des vertébrés où il est localisé dans les globules rouges ou érythrocytes, contient dans sa molécule quatre groupes d'hème qui ont chacun un atome de fer ferreux responsable de la liaison réversible d'une molécule d'oxygène. Ainsi chaque molécule d'hémoglobine transporte 4 molécules d'oxygène, qui seront distribuées aux divers tissus pour le processus normal de leur métabolisme. Toute la lumière n'a pas encore été faite sur la

manière dont les chaenichthyidae de l'Antarctique arrivent à effectuer leur métabolisme sans pigment respiratoire. Quoi qu'il en soit, ces poissons ne pourraient pas survivre hors des eaux polaires (une élévation de 10 degrés de la température doublant la consommation d'oxygène). Une étude plus poussée de ce problème donnerait des informations très intéressantes sur l'adaptation des organismes au milieu marin particulier que constitue l'Antarctique ainsi que sur l'évolution des êtres vivants dans ces eaux.

Le maillon central de la chaîne alimentaire dans les eaux antarctiques se trouve être un petit crustacé, *Euphausia superba*, qu'on appelle aussi « krill ». Ce petit invertébré, qui se nourrit de plantes unicellulaires, est à son tour mangé par les phoques, les baleines, les manchots et les autres oiseaux antarctiques, etc.

Dans le cadre de nos recherches sur le sang des crustacés, nous avons eu la chance de pouvoir continuer notre étude sur *Euphausia superba* si important pour la vie en Antarctique, lors de l'expédition Antarctique Belgo-Néerlandaise de 1967. C'est grâce à M. STEYAERT que nous avons pu participer à cette expédition et nous désirons lui adresser ici toute notre reconnaissance. Nous avons pu capturer une centaine d'*Euphausia* dans la baie de Breid (Breidvika) grâce à l'aide très appréciée de M. J. M. SAN FELIU. Ils furent placés immédiatement dans un aquarium bien aéré. Des morceaux de glace ajoutés à l'eau assuraient une température ne dépassant pas 0° C. Malheureusement il n'a pas été possible, dans ces conditions, de tenir vivants les crustacés pendant plus de trois jours. Les animaux ont été divisés en deux populations égales. Les animaux du premier lot ont été utilisés, à bord du « Magga Dan », pour des recherches dont nous vous présentons ici les résultats. Les animaux du deuxième lot ont été surgelés et destinés à des mesures enzymatiques et des déterminations de métaux au laboratoire de chimie physiologique de l'Université de Gand. Ces résultats seront publiés plus tard dans une étude comparative du sang des crustacés.

MATERIEL ET METHODE.

Nous avons fait nos recherches sur une seule espèce, *Euphausia superba*, DANA. Nous avons pu apprécier l'aide de L. B. Holthuis (Leiden — Pays-Bas) pour la détermination de cette espèce. Ces animaux, qu'on trouve en grande quantité dans les eaux antarctiques ont une longueur moyenne de 4 à 5 cm. Ce sont des crustacés du super-ordre *Eucarida*, divisé lui-même en deux ordres dont le premier contient les *Euphausia*, qui sont plus primitifs, et le deuxième les *Decapoda*, crustacés plus grands et les plus évolués.

Pour l'analyse du sang, nous avons utilisé la technique microélectrophorétique de WIEME (WIEME 1959) adaptée au travail à température constante (WIEME 1961). Cette technique est facilement utilisable à

bord d'un bateau en marche, même sur une mer un peu mouvementée, principalement à cause de la courte durée nécessaire pour effectuer une électrophorèse.

Toutes les électrophorèses ont été effectuées dans un gel d'agar (Difco spécial agar noble) à 0,9 % (tampon borate pH = 9,0 et $\mu = 0,05$), mis en couches de 2,5 mm sur des lames microscopiques. La durée était toujours de 30 minutes et la température 5° C. Le voltage était fixé à 140 Volts. Immédiatement après l'électrophorèse, les plaques étaient immergées dans un bain fixateur, préparé comme suit :

- éthanol 70 volumes;
- acide acétique 5 volumes;
- eau distillée 25 volumes.

Après une fixation d'environ une heure, elles étaient séchées dans une étuve à 35° C et colorées ensuite à l'aide de la solution suivante :

- Amidoblack 10 B 0,5 g;
- HgCl₂ 5,0 g;
- acide acétique 5,0 ml;
- eau distillée jusqu'à 100 ml.

Après la coloration (durée environ 30 minutes), les plaques étaient différenciées par lavage dans trois bains successifs d'acide acétique à 2 %.

Les différentes fractions protéiniques étaient colorées en bleu.

Les électrophérogrammes colorés furent enfin analysés dans un densitomètre Vitatron à une longueur d'onde de 538 m μ . Ainsi ont été obtenus les graphiques représentés dans les figures 1 à 4.

RESULTATS.

L'étude des électrophérogrammes, colorés par le noir d'amidon, nous révèle au total six fractions protéiniques dans l'hémolymphe d'*Euphausia superba*. Cependant on ne les trouve pas toujours ensemble. Il est possible de reconnaître trois types d'électrophérogrammes.

Les type 1 et type 2 sont obtenus comme suit : une pipette « microcap » (Drummond scientific company) est introduite très prudemment dans l'artère dorsale. Il est possible de prélever ainsi deux à quatre microlitres d'hémolymphe. Deux microlitres sont introduits tout de suite dans le gel d'agar pour l'électrophorèse. Environ 80 % des électrophérogrammes obtenus ainsi sont du type 1. Celui-ci montre trois fractions dont la fraction intermédiaire est beaucoup plus faible que les autres (fig. 1). Le type 2 a en plus une fraction protéinique, migrant plus lentement que les autres fractions dans le champ électrique (fig. 2).

Le type 3 s'observe lorsqu'on essaie d'obtenir plus d'hémolymphe en appuyant, même très légèrement, avec les doigts des deux côtés de l'animal. De cette manière, on peut récupérer 5 à 8 microlitres d'hémo-

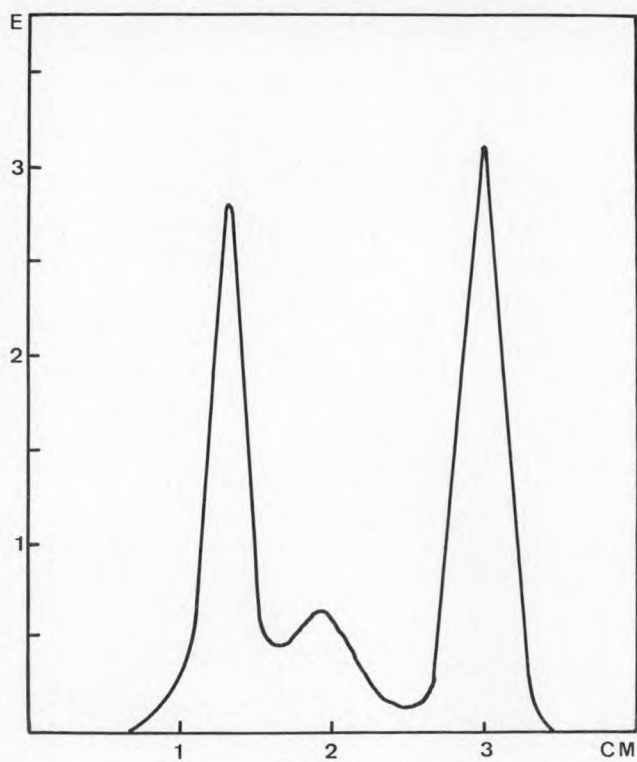


Fig. 1.

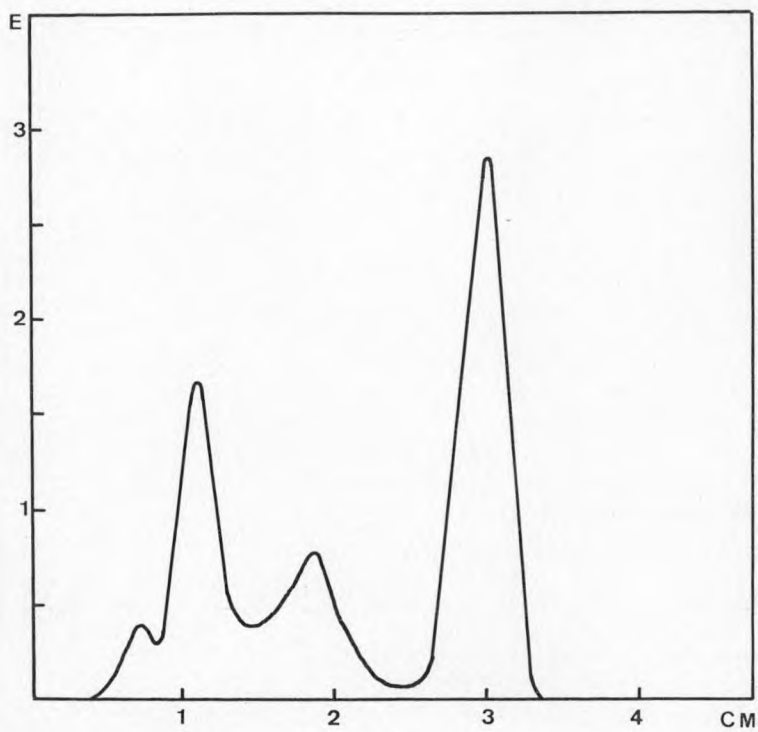


Fig. 2.

lymphe. L'électrophérogramme correspondant est représenté dans la figure 3. En plus des fractions mentionnées plus haut, on trouve toujours deux fractions assez faibles qui migrent plus vite que les autres.

L'origine de ces deux fractions supplémentaires se situe probablement dans l'hépatopancréas. Cet organe coloré d'un ton vert-brun est bien visible chez l'animal intact. Lorsqu'on tente de récupérer, par légère pression des doigts, l'hémolymphe, normalement incolore, on constate que celle-ci prend une couleur verte, tandis que l'hépatopancréas se décolore lentement. L'hépatopancréas d'*Euphausia superba* contient donc un liquide vert qui se mélange très facilement à l'hémolymphe. Afin de vérifier si les deux fractions protéiniques supplémentaires, que nous avons retrouvées sur les électrophérogrammes du type 3, proviennent, elles aussi, de l'hépatopancréas, nous avons procédé comme suit : l'hépatopancréas d'un animal est prélevé, rincé très vite dans l'eau de mer et séché entre du papier filtre pour éliminer l'erreur possible due au sang. Ensuite l'organe est placé dans un petit tube à essai avec quelques gouttes de tampon phosphate pH-7,8 et puis agité pendant quelques minutes au moyen d'une spatule. Après centrifugation, on obtient un surnageant clair, coloré en vert, que nous avons analysé par électrophorèse. Comme le montre la figure 4, nous retrouvons les deux fractions supplémentaires, même plus concentrées, ainsi que deux fractions de l'hémolymphe normale c'est-à-dire celles qui migrent le plus vite.

Il est bien connu que beaucoup de crustacés ont dans leur sang un pigment respiratoire bleu, l'hémocyanine. C'est une protéine à poids moléculaire élevé (environ 800.000 chez le homard) qui contient plusieurs atomes de cuivre liés probablement aux groupements — SH de cystéine. Ce pigment représente 80 à 100 % de la totalité des protéines du sang des crustacés. Afin de déterminer si une des fractions protéiniques que nous avons démontrées dans le sang d'*Euphausia* correspond à ce pigment respiratoire, nous avons fait trois tests pour déceler la présence éventuelle de cuivre ou d'hémocyanine.

1° Réaction avec l'acide rubéanique (dithiooxamide).

Dans un microtube à essai, on ajoute 2 microlitres d'hémolymphe à 2 microlitres d'une solution alcoolique d'acide rubéanique à 1 %. Dans ces conditions, l'hémolymphe de crabe, même très dilué, donne immédiatement une couleur verte due à la présence de cuivre (Declair 1966). L'hémolymphe d'*Euphausia superba* ne montre aucune réaction.

2° Réaction pseudoperoxydasique.

L'hémocyanine des crustacés supérieurs montre une réaction pseudoperoxydasique due à la présence de cuivre (GHIRETTI 1956; DECLAIR 1966). MANWELL et BAKER (1963) ont utilisé cette propriété pour mettre au point une méthode très sensible de détection d'hémocyanine sur des électrophérogrammes en les immergeant dans une solution conte-

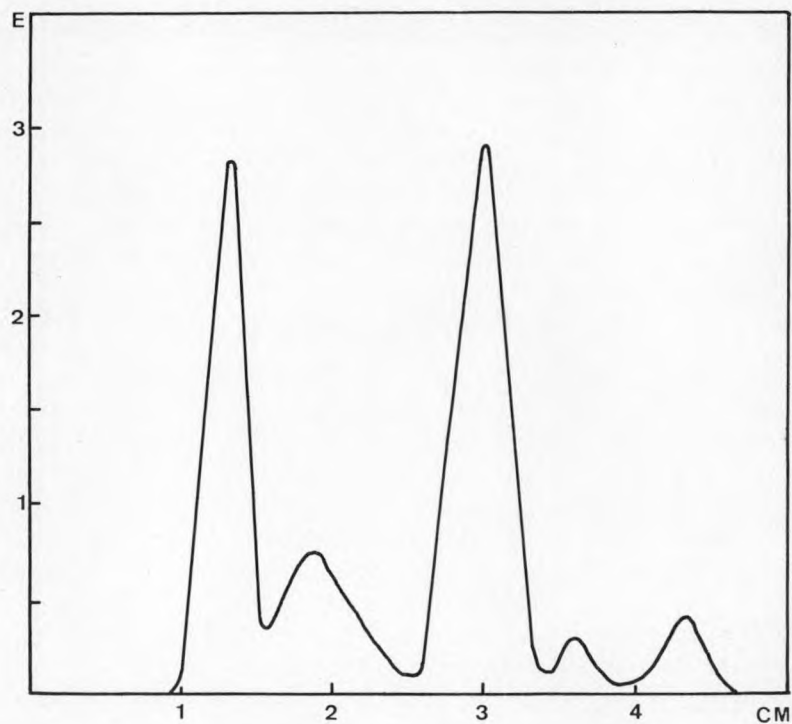


Fig. 3.

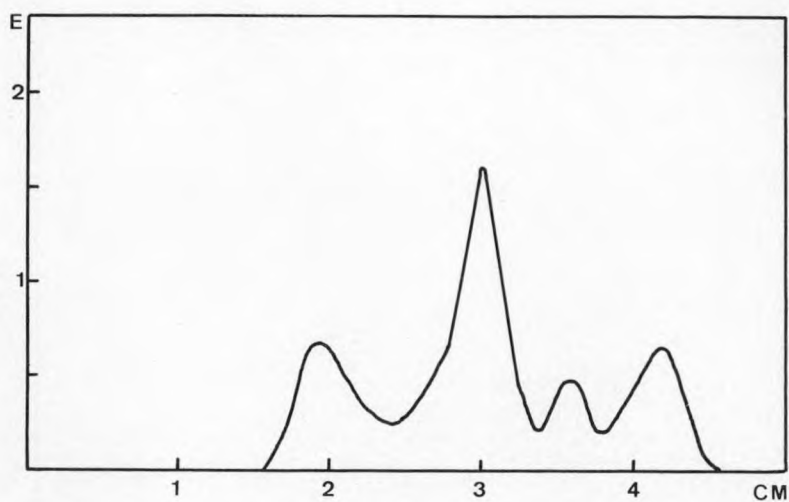


Fig. 4.

nant de l'o-dianiside, H_2O_2 et de l'alcool tamponné à un pH = 5,7. Avec cette méthode, la formation d'une couleur brun-rouge indique la présence de traces d'hémocyanine, mais l'hémolymphe d'*Euphausia* n'indique pas cette coloration.

3° Réaction pseudophénoloxydasique.

L'hémolymphe des crustacés décapodes montre une réaction phénoloxydasique due à un enzyme à base de cuivre qui se trouve dans les leucocytes (PINHEY 1930; BHAGVAT et RICHTER 1938; DECLEIR 1966; DECLEIR et VERCAUTEREN 1965 et 1967) et une réaction pseudophénoloxydasique due à l'hémocyanine (BHAGVAT et RICHTER 1938; ZUCKERKANDL 1953; DECLEIR et VERCAUTEREN 1965). Nous avons analysé le sang d'*Euphausia* pour retrouver une réaction phénoloxydasique suivant la méthode que nous avons décrite antérieurement (DECLEIR et VERCAUTEREN 1965). La solution employée s'obtient en mélangeant 2 microlitres de sang et 2 microlitres d'une solution composée de 10 micromoles d'oléate de soude et de 10 micromoles de 4-méthylcatechol dans 1 ml de tampon phosphate M/10 pH = 6,7. Dans ces conditions, nous n'avons trouvé aucune réaction dans le sang d'*Euphausia superba*. De même des homogénats d'animaux entiers donnent une réaction négative. Cependant nous avons constaté que les homogénats d'animaux dont l'hépatopancréas a été enlevé montrent une réaction positive. Cette dernière réaction est relativement forte et se produit également à des températures en dessous de 0 °C. La réaction est positive pour les trois substrats utilisés, c'est-à-dire un monophénol (tyramine-HCl), un diphénol (4-méthylcatechol) et un triphénol (pyrogallol). Ainsi nous avons retrouvé chez *Euphausia superba* une phénoloxydase qui ne se retrouve pas dans le sang et l'hépatopancréas semble contenir un inhibiteur pour cet enzyme.

DISCUSSION.

Nous avons fait une étude électrophorétique de l'hémolymphe d'*Euphausia superba*, petit crustacé très connu sous le nom de « krill » et qui constitue un élément clé de la chaîne alimentaire en Antarctique. L'hémolymphe est incolore et ne contient pas de pigment respiratoire comme c'est le cas chez les crustacés décapodes. Ce pigment, l'hémocyanine est un métalloprotéine à base de cuivre qui, d'après les dernières données, semble avoir un fonction complexe et multiple, comme par exemple celle de pigment respiratoire, de régulation de la pression osmotique, de réserve alimentaire, de transport, etc. Ses propriétés ont été étudiées chez les grandes espèces, mais la composition du sang des petits crustacés est peu connue. Le rôle des différentes protéines sanguines chez les crustacés dépourvus de ce pigment est également inconnu. L'analyse du sang d'*Euphausia* est effectuée dans le cadre d'une étude comparative de l'hémolymphe des invertébrés en général et des

crustacés en particulier. Nous avons décrit dans cet esprit les propriétés électrophorétiques du sang d'*Euphausia*. L'aspect comparatif en sera publié plus tard.

Nous avons trouvé dans le sang d'*Euphausia superba* six fractions protéiniques, que nous avons numérotées de 1 à 6 comme indiqué dans la figure ci-dessous.

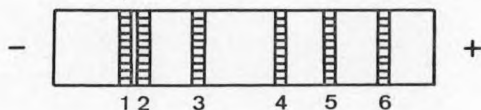


Fig. 5.

Le sang normal incolore contient toujours les fractions 2, 3 et 4 et chez 20 % des animaux que nous avons analysés il contient également la fraction 1. Nous avons trouvé dans le cas du crabe *Cancer pagurus* (DECLEIR 1966), à l'approche de la mue, une fraction protéinique apparaissant dans le sang, qui migre moins vite que les autres fractions dans le champ électrique et qui trouve son origine dans la décomposition de l'ancienne cuticule. Peut-être la fraction 1 du sang d'*Euphausia* est-elle analogue à la fraction décrite chez *Cancer pagurus*.

Nous avons pu démontrer qu'un liquide clair, contenant un pigment vert et les fractions protéiniques 5 et 6, provenant de l'hépatopancréas, se mêle à l'hémolymphe quand on essaie de récupérer l'hémolymphe par légère pression des doigts. Nous ne savons pas si le pigment est associé avec l'une des deux protéines. Il est impossible, en effet, de retrouver la couleur verte dans le gel d'agar après l'électrophorèse. Néanmoins les pigments de l'hémolymphe des invertébrés sont souvent liés à des protéines. Le fait qu'une légère pression fasse apparaître dans le sang un liquide clair contenant un pigment vert et des protéines est bien remarquable. Ce liquide provient de l'hépatopancréas. Celui-ci est un organe peu fragile qu'il est facile de prélever en entier. Nous savons que l'hépatopancréas chez les crustacés décapodes est composé d'un grand nombre de petits tubes digestifs qui s'ouvrent dans des canaux sécréteurs; ceux-ci se réunissent dans un canal collecteur qui aboutit dans l'intestin juste après l'estomac. Tous ces canalicules ménagent entre eux un espace extracellulaire dans lequel une grande quantité d'hémolymphe peut être retenue par des forces capillaires. Ainsi une quantité importante d'hémolymphe retenue dans les espaces pericapillaires de l'hépatopancréas existe et peut être mobilisée en cas de nécessité (ZUCKERKANDL 1960). Nous ne savons pas s'il existe une différence de la composition entre l'hémolymphe retenue dans les capillaires et l'hémolymphe en circulation. Nous pensons que les résultats électrophorétiques dont nous avons parlé plus haut montrent qu'il existe aussi chez *Euphausia superba* une quantité importante d'hémolymphe immobile dans l'hépatopancréas.

Si cette hypothèse est correcte, la grande différence de composition montrerait que la quantité d'hémolymphe immobile n'est certainement pas une simple réserve. Peut-être ce liquide, en contact intime avec l'hépatopancréas, a-t-il un rôle spécial et permet la survie de l'animal dans des conditions moins favorables.

L'hémolymphe normale sans pigment vert, contient normalement les trois fractions indiquées dans la figure 1 (fractions 2, 3 et 4 de la figure 5). Il est remarquable que le liquide provenant de l'hépatopancréas contient aussi les fractions 3 et 4 mais non la fraction 2. Ceci indiquerait que les fractions 3 et 4 n'ont pas la même origine que la fraction 2. Plusieurs organes pourraient donc élaborer les protéines sanguines. À ce sujet, il faut remarquer que l'origine des protéines sanguines des crustacés supérieurs est encore totalement inconnue.

LABORATOIRE DE CHIMIE PHYSIOLOGIQUE
CASINOPLEIN 21 — GENT.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

- BHAGVAT, K. et RICHTER, D.
1938. *Biochem J.* 32 : 1397-1406.
- DECLAIR W.
1966. Thèse de doctorat. Université de Gand.
- DECLAIR W. et VERCAUTEREN R.
1965. *Cah. Biol. Marine* VI : 163-172.
1967. *Cah. Biol. Marine* VIII : 101-111.
- GHIRETTI F.
1956. *Arch. Biochem. Biophys.* 63 : 165-176.
- MANWELL C. et BAKER C. M. A.
1963. *Comp. Biochem. Physiol.* 8 : 193-208.
- PINHEY K. G.
1930. *J. Exp. Biol.* 7 : 19-36.
- RUUD J. T.
1965. *Scientific American* 213 : 108.
- WIEME
1959. *Clinica Chimica Acta* 4 : 317.
1961. *Nature* 140 : 806.
- ZUCKERKANDL, E.
1953. *C. R. Soc. Biol.* 147 : 629.
1960. *Cah. Biol. Marine* I : 1.

