

TENEURS DES PLASMAS SANGUINS DE DEUX COLÉOPTÈRES
(HYDROPHILUS PICEUS, LEPTINOTARSA DECEMLINEATA) EN
 UNE SÉRIE D'ACIDES AMINÉS, LIBRES OU SOUS FORME
 DE COMBINAISONS NON PROTÉINIQUES

par

HENRI SARLET, GHISLAINE DUCHÂTEAU,
 M. N. CAMIEN* ET MARCEL FLORKIN

Laboratoires de Biochimie, Université de Liège (Belgique)

Il est de plus en plus généralement reconnu que le taux élevé de l'aminoacidémie des Insectes constitue un caractère biochimique de cette classe d'Invertébrés (FLORKIN¹). Outre cette importance taxonomique, l'aminoacidémie des Insectes est un facteur de l'établissement de la pression osmotique de leur milieu intérieur (BISHOP, BRIGGS ET RONZONI²) et, comme BEADLE ET SHAW³ l'ont récemment montré, un facteur de leur osmorégulation.

Il existe une série de données qualitatives relatives aux molécules non protéiniques porteuses d'azote aminé et présentes dans le plasma des Insectes (USSING⁴; RAPER ET SHAW⁵; AUCLAIR ET PATTON⁶; FINLAYSON ET HAMER⁷; DRILHON⁸; LEVENBOOK⁹; PRATT¹⁰) mais nos connaissances d'ordre quantitatif restent très sommaires.

En 1942, FLORKIN ET DUCHÂTEAU ont, au moyen des méthodes colorimétriques en usage à l'époque, dosé dans le filtrat tungstique du plasma sanguin de *Dytiscus*, l'arginine, le tryptophane, la phénylalanine, la cystine, l'histidine et la tyrosine. Ces dosages ont montré que ce plasma contenait, pour 100 ml, 30 mg d'histidine et 117-168 mg de tyrosine. Les autres acides aminés n'étaient pas présents en quantités décelables par les méthodes utilisées. En 1946, parut une étude d'USSING sur les acides aminés et les composés voisins présents dans le plasma sanguin des larves d'*Oryctes nasicornis* et de *Melolontha vulgaris*. Outre de nombreuses autres données fort intéressantes, le mémoire d'USSING contient une série de chiffres relatifs à la concentration d'acides aminés dans le sang de la larve de *Melolontha*: histidine, 300; tryptophane, 12.5; tyrosine, 106; leucine, 131; valine, 88 mg p. 100 ml.

La présente étude est limitée aux résultats de la détermination, par voie microbiologique, dans les filtrats tungstiques, soumis à l'hydrolyse acide, des plasmas de deux Coléoptères à l'état d'imago, *Hydrophilus piceus* et *Leptinotarsa decemlineata*, respectivement de quatorze et de treize acides aminés.

MÉTHODES

L'échantillon de sang d'*Hydrophilus* résultait du mélange des sanguins (fournis par cinquante animaux) recueillis par arrachement d'un élytre. Les 20 ml de plasma ont subi la déprotéinisation

* U.S. Fulbright Scholar. Present address Dept of Chemistry, University of California, Los Angeles.

Bibliographie p. 574.

tungstique selon les indications de FLORKIN¹². Chaque ml de filtrat tungstique correspondait à 0.1 ml de plasma. On a repris 175 ml de filtrat qu'on a réduits à 5 ml par évaporation à l'étuve à 110°. Après addition de 5 ml d'HCl 12 N, l'hydrolyse a été accomplie par chauffage à reflux sur bain de sable à 110°, pendant 24 heures.

Le mélange des sangs, recueillis par arrachement d'un élytre, de 2000 *Leptinotarsa*, a fourni 7 ml de plasma, qu'on a amenés à 210 ml. Six ml ont été utilisés pour les essais de déprotéinisation. Aux 204 ml restants, on a ajouté 15 ml de tungstate sodique à 10%, puis 16.5 ml de H₂SO₄ 0.6 N. Du liquide obtenu par centrifugation, on a utilisé pour les essais 212 ml (correspondant à 6.12 ml de plasma) qui ont été, comme décrit ci-dessus, réduits à 5 ml puis hydrolysés.

L'acide aspartique, l'arginine, l'acide glutamique, le glycocolle, l'isoleucine, la leucine, la lysine la phénylalanine et la valine ont été dosés par la méthode de DUNN, CAMIEN, MALIN, MURPHY, ET REINER¹³. La tyrosine a été dosée par la même méthode, à part le fait que, dans le milieu d'essai, l'arginine était remplacée par la tyrosine (concentration finale: 19 mg p. 100 ml). L'alanine, l'histidine la proline et la thréonine ont été respectivement déterminées par les méthodes de SAUBERLICH ET BAUMANN¹⁴, de DUNN, CAMIEN, SHANKMAN, ET ROCKLAND¹⁵, de DUNN, MCCLURE, ET MERRIFIELD¹⁶ et de HENDERSON ET SNELL¹⁷. Dans le tableau rapportant les résultats obtenus, on a inséré les valeurs recueillies au moyen des mêmes méthodes, par CAMIEN, SARLET, DUCHATEAU, ET FLORKIN¹⁸, lors de l'analyse du filtrat tungstique hydrolysé du sérum d'un Crustacé, *Homarus vulgaris*.

DISCUSSION

Dans le cadre de la série des acides aminés dosés, la comparaison avec le Crustacé montre qu'à part le glycocolle et la tyrosine, les concentrations sont nettement plus fortes chez les deux Insectes. Ce caractère prend une intensité particulière dans les cas de l'acide glutamique et de la proline. La somme des molécules (à l'état libre ou combiné sous forme non protéinique) de ces deux acides aminés représente, chez *Hydrophilus* plus des six dixièmes, et chez *Leptinotarsa*, plus des huit dixièmes de l'ensemble considéré qui est respectivement 9.4 et 18.5 fois plus élevé que celui du plasma de *Homarus*, dans la somme duquel l'acide glutamique et la proline réunis ne constituent qu'un dixième.

Il faut noter qu'USSING a trouvé de la glutamine dans les plasmas de *Melolontha* et *Oryctes* et a estimé, pour cette dernière, la concentration de cette amide à 150 mg p. 100 ml. Quant à la proline, USSING n'a pu la mettre en évidence dans les sangs des larves d'*Oryctes* et de *Melolontha*, dans lesquels il a par contre relevé la présence de quantités notables d'hydroxyproline. La méthode que nous avons utilisée pour la détermination de la proline ne dose cependant pas l'hydroxyproline (DUNN, MCCLURE ET MERRIFIELD¹⁶). D'autre part, nous n'avons pas déterminé cette dernière substance. Il faut aussi remarquer que notre matériel consiste en Coléoptères à l'état d'imago tandis qu'USSING, qui a étudié d'autres espèces, les a utilisées à l'état larvaire.

Un autre point qui mérite considération est la faible valeur, dans nos résultats, des chiffres relatifs à la tyrosine, par comparaison avec les résultats obtenus au moyen de méthodes colorimétriques, par FLORKIN ET DUCHATEAU, chez l'imago de *Dytiscus* et par USSING, chez la larve de *Melolontha*. Sans doute y a-t-il lieu de signaler comme cause d'erreur la destruction enzymatique de la tyrosine, phénomène qui entre certainement en ligne de compte chez *Leptinotarsa*, dont le sang brunit à l'air, mais ce phénomène ne s'observe pas dans le plasma d'*Hydrophilus*. Il y a de bonnes raisons de croire que la méthode microbiologique du dosage de la tyrosine est plus spécifique que les méthodes colorimétriques. La question de la teneur en tyrosine du sang des Arthropodes devrait être revue en tenant compte, non seulement des variations résultant d'actions enzymatiques, mais encore de la spécificité des procédés de dosage.

TABLEAU I

TENEURS EN DIFFÉRENTS ACIDES AMINÉS, LIBRES OU COMBINÉS SOUS FORME NON PROTÉINIQUE, DES PLASMAS SANGUINS D'*Hydrophilus piceus*, DE *Leptinotarsa decemlineata* ET DE *Homarus vulgaris**

	mg p. 100 ml			mM p. 100 ml		
	<i>Hydrophilus</i>	<i>Leptinotarsa</i>	<i>Homarus</i>	<i>Hydrophilus</i>	<i>Leptinotarsa</i>	<i>Homarus</i>
Alanine	60.9	34.0	8.7	0.68	0.38	0.10
Arginine	7.5	19.3	1.6	0.04	0.11	0.01
Acide aspartique	18.7	21.2	7.0	0.14	0.16	0.05
Acide glutamique	195.0	611.0	3.5	1.32	4.15	0.02
Glycocolle	26.1	16.7	24.0	0.35	0.22	0.32
Histidine	12.9	42.8	3.5	0.08	0.27	0.02
Isoleucine	25.8	—	—	0.20	—	—
Leucine	7.7	12.1	4.2	0.06	0.09	0.03
Lysine	24.7	42.2	2.1	0.17	0.29	0.01
Phénylalanine	7.4	9.1	0.2	0.04	0.05	0.001
Proline	283.0	637.0	6.0	2.46	5.53	0.05
Thrénanine	17.8	20.6	0.0	0.15	0.17	0.00
Tyrosine	9.2	0.0	3.3	0.05	0.00	0.02
Valine	20.8	24.5	0.0	0.18	0.21	0.00
				5.92	11.63	0.63

* Les valeurs correspondant au plasma de *Homarus* sont tirées de CAMIEN, SARLET, DUCHATEAU, ET FLORKIN¹⁸.

RÉSUMÉ

La détermination par voie microbiologique, dans les plasmas sanguins de deux Coléoptères, *Hydrophilus piceus* et *Leptinotarsa decemlineata* d'une série d'acides aminés libres ou combinés sous forme non protéinique (alanine, arginine, acide aspartique, acide glutamique, glycocolle, histidine, leucine, lysine, phénylalanine, proline, thrénanine, tyrosine et valine et, en outre, chez *Hydrophilus*, isoleucine), a montré qu'à part le glycocolle et la tyrosine, ces différents acides aminés sous forme libre ou combinés sous forme non protéinique, existent dans les plasmas des deux Insectes, à concentrations notamment plus fortes que dans le sang de *Homarus*. Ce caractère est marqué de manière particulière pour l'acide glutamique et la proline. La somme des molécules de ces deux acides aminés représente, chez *Hydrophilus*, plus des six dixièmes de l'ensemble considéré, et elle en constitue plus des huit dixièmes, chez *Leptinotarsa*.

SUMMARY

The microbiological determination, in the blood plasmas of two Coleopteres, *Hydrophilus piceus*, and *Leptinotarsa decemlineata*, of a series of amino acids, free or combined in a non-protein form, (alanine, arginine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, histidine, leucine, lysine, phenylalanine, proline, threonine, tyrosine, valine, and moreover, in the case of *Hydrophilus*, isoleucine) has shown that, apart from glycine and tyrosine, these different amino acids, free or combined in a non-protein form, exist in the plasma of the two insects in concentrations notably stronger than in the blood of *Homarus*. This is particularly marked for glutamic acid and proline. The total number of molecules of these two amino acids is, in the case of *Hydrophilus*, more than 60% of the mixture considered, and, in the case of *Leptinotarsa*, more than 80%.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei der mikrobiologischen Bestimmung im Blutplasma von zwei Coleopteren, *Hydrophilus piceus* und *Leptinotarsa decemlineata*, einer Reihe von freien oder nicht als Protein gebundenen Aminosäuren (Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glykokoll, Histidin, Leucin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Threonin, Tyrosin und Valin und ausserdem, bei *Hydrophilus*, Isoleucin) hat

sich gezeigt, dass mit Ausnahme von Glykokoll und Tyrosin diese verschiedenen Aminosäuren in freier oder nicht als Protein gebundener Form im Plasma der beiden Insekten in bedeutend höheren Konzentrationen vorkommen als im Blut von *Homarus*. Dies ist besonders deutlich bei Glutaminsäure und Prolin. Die Summe der Moleküle dieser beiden Aminosäuren stellt bei *Hydrophilus* mehr als sechs Zehntel und bei *Leptinotarsa* mehr als acht Zehntel der Gesamtmenge dar.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ M. FLORKIN, *L'évolution biochimique*, 1944, Masson, Paris.
- ² G. H. BISHOP, A. P. BRIGGS, ET E. RONZONI, *J. Biol. Chem.*, 66 (1925) 77.
- ³ L. C. BEADLE ET J. SHAW, *J. Exptl Biol.*, 27 (1950) 96.
- ⁴ H. USSING, *Acta Physiol. Scand.*, 11 (1946) 61.
- ⁵ R. RAPER ET J. SHAW, *Nature*, 162 (1948) 999.
- ⁶ J. L. AUCLAIR ET R. L. PATTON, *Rev. can. biol.*, 9 (1950) 3.
- ⁷ L. H. FINLAYSON ET D. HAMER, *Nature*, 163 (1949) 843.
- ⁸ A. DRILHON, *Compt. rend. soc. biol.*, 144 (1950) 224.
- ⁹ L. LEVENBOOK, *Biochem. J.*, 47 (1950) 336.
- ¹⁰ J. J. PRATT JR., *Ann. Entom. Soc. of America*, 43 (1950) 573.
- ¹¹ M. FLORKIN ET G. DUCHATEAU, *Bull. Cl. des Sci., Acad. Roy. de Belgique*, 28 (1942) 373.
- ¹² M. FLORKIN, *Mémoires Cl. des Sci., Acad. Roy. de Belgique*, 16 [5] (1937) I.
- ¹³ M. S. DUNN, M. N. CAMIEN, R. B. MALIN, E. A. MURPHY, ET P. J. REINER, *Univ. Calif. Publ. Physiol.*, 8 (1949) 293.
- ¹⁴ H. E. SAUBERLICH ET C. A. BAUMANN, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 545.
- ¹⁵ M. S. DUNN, M. N. CAMIEN, S. SHANKMAN, ET L. B. ROCKLAND, *J. Biol. Chem.*, 159 (1945) 653.
- ¹⁶ M. S. DUNN, L. E. MCCLURE, ET R. B. MERRIFIELD, *J. Biol. Chem.*, 179 (1949) 11.
- ¹⁷ L. M. HENDERSON ET E. E. SNELL, *J. Biol. Chem.*, 172 (1948) 15.
- ¹⁸ M. N. CAMIEN, H. SARLET, G. DUCHATEAU, ET M. FLORKIN, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 881.

Reçu le 31 août 1951