

### Eléments chimiques dans l'hémolymphe de *Mytilus galloprovincialis* Lamarck

Maria MIRZA\*, Domnica RUGHINIS\*\* et Cornelia PALIVAN\*\*

\* Institut Roumain de Recherches Marines, Constantza (Roumanie)

\*\* Institut de Recherches Chimico-Pharmaceutiques, Bucarest (Roumanie)

#### ABSTRACT

The concentration of ten hydrosoluble elements and oligoelements from the soft tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lamarck was determined by atomic absorption spectrophotometry. With a few exceptions, the concentrations are similar to those in the human serum. High values were registered in spawning animals.

#### RESUME

On a déterminé la concentration de 10 macro- et micro-éléments hydrosolubles dans les tissus mous de *Mytilus galloprovincialis* Lamarck par spectroscopie à absorption atomique. A quelques exceptions près, ces concentrations sont voisines des valeurs normales du sérum humain. Des valeurs supérieures ont été enregistrées chez les animaux en état de reproduction.

*Mytilus galloprovincialis* a été prélevé sur le littoral roumain de la mer Noire (Constantza Nord) au printemps et en été 1987. Les animaux se trouvaient à deux stades physiologiques distincts, celui de reproduction (en mai) et celui de l'après ponte (en juin).

Le matériel biologique a été libéré de tout organisme épibiotique, lavé à l'eau désionisée et, après avoir ouvert les valves, on a écarté le liquide intervalvaire, on a lavé les tissus à l'eau désionisée en les tamponnant ensuite avec du papier filtre, et après on a recueilli l'hémolymphe par des coupes longitudinales du corps de l'animal. L'hémolymphe a été déprotéinée et délipidée avec de l'acétone 1:3 V/V et, après avoir écarté le solvant par distillation sous vide, on l'a encore délipidé avec du benzène V/V. Le produit obtenu après la séparation du solvant a été utilisé pour les déterminations.

La présence, dans l'extrait d'une large gamme de cations en diverses concentrations, depuis des dizaines jusqu'à des milliers de ppm, à côté de différents composants organiques, a nécessité un procédé d'élimination des interférences par destruction par voie humide, en deux variantes, en utilisant le mélange d'acides HNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et HClO<sub>4</sub>-HNO<sub>3</sub> respectivement, à une pression de 1.5 at et à la température de 120°C.

Quant aux interférences chimiques, les perturbations des éléments analysés ont été insignifiantes à l'exception du Ca et du Mg, où l'on a utilisé le tampon spectral Sr. Les micro-éléments ont été déterminés à l'aide d'un spectrophotomètre AAS IN Zeiss Jena, par deux procédés : émission et absorption atomique à la flamme, les conditions expérimentales étant choisies de telle manière que l'on obtienne le maximum de sensibilité.

Les courbes d'étalonnage ont été calculées analytiquement par la méthode des plus petits carrés, selon un programme de calcul LSDRQ utilisé sur un calculateur CORAL 4030. L'équation des droites a la forme  $y=ax+b$ , où les paramètres a et b calculés selon le programme LSDRQ sont présentés dans le tableau 1, à côté des coefficients de corrélation qui attestent la concordance avec les résultats expérimentaux.

TABLEAU 1

Calcul des droites d'étalonnage par la méthode des plus petits carrés

Elément	Cu	Zn	Ca	Mg	Mn	Co
a	0.024	0.126	0.022	0.623	0.028	0.015
b	-0.001	-0.070	-0.002	0.017	0.004	0.002
coefficient de corrélation	0.999	0.993	0.994	0.998	0.996	0.998
	K	Cr	Ni	Fe	Na	
a	4.23	0.033	0.010	0.016	9.840	
b	2.89	0.002	0.001	-0.001	3.700	
coefficient de corrélation	0.999	0.999	0.987	0.995	0.997	

TABLEAU 2

Composition des éléments chimiques dans le sérum humain et dans l'hémolymphe de *Mytilus*

Eléments	Valeurs normales dans le sérum(1)	Hémolymphe de <i>Mytilus</i> Spectroscopie à absorption atomique
Fer	0.700 - 1.700	0.13 - 0.70
Cuivre	0.850 - 1.500	0.20 - 0.66
Zinc	0.800 - 1.400	0.30 - 0.91
Nickel	0.001 - 0.005	0.13 - 0.70
Cobalt	0.001 - 0.036	0.13 - 0.30
Chrome	environ 1.000	0.13 - 0.30
Sodium	1.332.000 - 1.378.000	2.400.00
Potassium	183.000	1.030.00
Calcium	90.000 - 100.000	21.00 - 71.60
Magnésium	18.200 - 22.000	19.00 - 30.78

Les données mettent en évidence une ressemblance, de l'ordre de grandeur des concentrations des éléments chimiques, du sérum humain, et de l'hémolymphe de *Mytilus*, à l'exception du Ni, Co, Na et K (Tableau 2).

#### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- MITROPOLSKII A.I.U., A.A. BEZBORODOV, E.I. OVSENYI - Geochemistry of Black Sea. Naukova Dumka, Kiev, 1982 (in russian).
- POPESCU Aurora, CRISTEA Elena, ZAMPINESCU CHEORGHIU M. - Biochimie medicala. Ed. Medicala, Bucuresti, 1980.

### Caractéristiques biochimiques des protéases partiellement purifiées d'*Engraulis encrasicolus* ponticus

Maria MIRZA\* et M. SERBAN\*\*

\* Institut Roumain de Recherches Marines, Constantza (Roumanie)

\*\* Faculté de Médecine Vétérinaire, Bucarest (Roumanie)

#### ABSTRACT

The paper presents several parameters of partially purified proteases from *Engraulis encrasicolus* ponticus : optimum pH and temperature, the effect of the enzyme (partially purified) concentration on the reaction speed as well as the optimum substrate concentration and the substrate specificity. The existence of some natural inhibitors for these proteases in the blood, heart and pig spleen is noticed.

#### RESUME

Ce travail présente plusieurs paramètres des protéases partiellement purifiées d'*Engraulis encrasicolus* ponticus : pH optimal, température optimale, influence de la concentration des enzymes partiellement purifiées sur la vitesse de réaction, concentration optimale du substrat et spécificité du substrat. On signale la présence de certains inhibiteurs naturels de ces protéases dans le sang, le coeur et la rate du porc.

Les travaux ont été effectués sur l'anchois - *Engraulis encrasicolus* ponticus - prélevé sur le littoral roumain de la mer Noire en juin 1980, dans la zone d'Agigea (Constantza Sud). Les poissons ont été homogénéisés et extraits à l'aide d'eau désionisée 1:1 V/G, pendant deux heures à 4°C. Les enzymes furent obtenus par la précipitation en acétone 1:4 V/G de la phase aqueuse. Après avoir séché la précipité protéique, on a procédé à une purification sur colonne de Sephadex G 50 avec élution en gradient de concentration de NaCl. Les protéases furent dosées par la méthode d'Anson (1), et les protéines par la méthode de Lowry et coll.(2). En vue d'effectuer les déterminations on a utilisé les tampons acide citrique - phosphate bisodique (pH 3.30-7.10), Tris (hydroxyméthyl) aminométhane - HCl (pH 7.2-8.6), et le pH 2.0 a été obtenu avec HCl 0.2 N.

Les caractéristiques biochimiques des protéases partiellement purifiées obtenues de *Engraulis encrasicolus* ponticus, sont les suivantes :

- A la concentration optimale des enzymes de 0.2 - 0.5 mg protéine/ml, la vitesse des réactions catalysées augmente d'une façon linéaire.
- Les pH optimaux sont : 2.1; 6.1; 8.0.
- La concentration optimale du substrat est : pH - 6.1/15 mg hémoglobine Anson; pH - 8.0/20 mg hémoglobine Anson; pH 8.0/15 mg caséine Hammersten; pH - 2.0/20 mg hémoglobine Anson.
- La température optimale de réaction est de 33°C à un pH de 6.1 et de 51°C pour le pH de 8.0.
- La spécificité du substrat est présentée dans le tableau ci-dessous :

Substrat	Activité protéolytique nmol tyrosine.minute <sup>-1</sup> .g protéine <sup>-1</sup>	
	pH 6.1	pH 8.0
Sérumalbumine bovine (BDH)	25.529.9	7.508.0
Albumine ovi (Merck)	25.529.9	36.642.9
Hémoglobine Anson (UCB)	12.013.0	30.003.5
Pepton aus Fleisch Triptisch Verdant (Merck)	12.015.0	7.508.0
Bacto tripton (Difco)	19.222.8	52.561.0
Bacto beef extract (Difco)	90.105.0	3.003.5
Tripticar (Inst.Cantacuzino)	18.621.8	24.328.0

Les protéases obtenues de l'anchois hydrolysent également les protéines à grande masse moléculaire (sérumalbumine, ovalbumine, hémoglobine) et les peptones obtenues par hydrolyse bactérienne ou tryptique, ce qui met en évidence la possibilité de ces enzymes extraites du poisson, d'hydrolyser un large spectre de liaisons peptidiques.

Les protéines dégradées partiellement par l'ébullition, extraites de divers organes de porc, ont été hydrolysées par les protéases de l'anchois comme suit (les résultats sont exprimés en nmol tyrosine.minute<sup>-1</sup>.g produit<sup>-1</sup>): foie-54.063; sang-0.00; rognon-66.377; coeur-0.00; pancréas-78.091; duodénum-52.861; rate-0.00; ovaire-30.035; langue-5.105; poumons-36.342. Les déterminations ont été faites à des valeurs du pH de 8.0. Des effets similaires ont été observés au pH 6.1.

Les données ci-dessus suggèrent la présence d'inhibiteurs naturels de protéases dans le sang, le coeur et la rate du porc.

#### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BIOCHEMICA MERCK - Preparations for Biochemistry. 1978, pp 34.
- LOWRY O.H., ROSENBOUGH N.J., FARR L.A. and RANDALL R.J. - J.Biol.Chem., 1981, 193, 265.