



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise en réserve et utilisation des métabolites des couches sous-cuticulaires du crabe *Carcinus maenas* (L.), au cours d'un cycle de mue

WELCOMME, Luc

Award date:
1986

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

Mise en réserve et utilisation des
métabolites des couches sous-cuticulaires
du crabe Carcinus maenas (L.) ,
au cours d'un cycle de mue.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

WELCOMME Luc

1985-1986

*FM

B04/1986/

09

BUMP

Arrivé au terme de ce travail, je tiens à témoigner toute ma gratitude envers tous ceux qui ont contribué à sa réalisation.

Je remercie plus particulièrement le Professeur P. Devos pour sa constante disponibilité, pour les conseils dont j'ai bénéficié toute l'année et, finalement, pour m'avoir permis de réaliser ce mémoire dans son laboratoire.

Je tiens aussi à remercier Mademoiselle J. Naisse ainsi que le Professeur A. Bauchau qui m'ont fourni aide et documents utiles à l'élaboration de ce travail.

Je n'oublie pas tous les membres du laboratoire dont la présence a été un soutien continué dont je leur suis reconnaissant.

Merci aussi à Madame D. Louis-Winand dont le travail inlassable ainsi que les encouragements m'ont aidés à la réalisation de ce travail.

Enfin, je remercie mes parents qui m'ont permis de suivre ces études; leur soutien m'a toujours été précieux.

TABLE DES MATIERES

ORIENTATION DU MEMOIRE

a-b-c

CHAPITRE I - INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE:NOTIONS PRELIMINAIRES

1.1 L'exuviation	1
1.2 Le cycle de mue	1
1.3 Les stades de mue	1
1.4 L'apolyse	2

DEUXIEME PARTIE:CONTROLE DE LA MUE ET STRUCTURES

PRINCIPALES IMPLIQUEES DANS LA MUE

2.1 Structures endocrines contrôlant la mue	
2.1.1 L'organe X-Glande du sinus	4
2.1.2 L'organe Y	5
2.2 Principaux organes impliqués dans la mue	8
2.2.1 L'hépatopancréas	8
2.2.2 Le tissu musculaire	10
2.2.3 Le tissu sanguin	11
2.2.4 L'épiderme et le tissu conjonctif sous-épidermique	13

TROISIEME PARTIE:LE TEGUMENT-DESCRIPTION CYTOLOGIQUE

ET DYNAMIQUE

3.1 Description générale	14
3.2 L'épiderme	14
3.2.1 Aspect généraux	14
3.2.2 Morphologie des cellules composant l'épiderme	15
3.2.2.1 Cellules principales	15
3.2.2.2 Cellules pigmentaires	16

3.2.3	Organes sesoriels	17
3.2.3.1	Mécanorécepteurs	18
3.2.3.2	Chémorécepteurs	20
3.2.3.3	Photorécepteurs et thermorécepteurs	21
3.3	La cuticule	
3.3.1	Histologie de la cuticule	
3.3.1.1	Lépicuticule	22
3.3.1.2	La procuticule	22
3.3.2	La chitine	
3.3.2.1	Structure moléculaire	23
3.3.2.2	Synthèse et régulation de la chittine	24
3.3.3	Les protéines	
3.3.3.1	Diversité des protéines cuticulaires	28
3.3.3.2	Sclérotisation ou tannage quinonique	29
3.3.4	Le calcium	
3.3.4.1	Calcification	29
3.3.4.2	Mise en réserve et mobilisation	
3.3.5	Les lipides	31
3.3.6	La cuticule comme réservoir de nourriture	32
3.4	Description du mésenchyme sous-épidermique	
3.4.1	Aspect général	32
3.4.2	Description du tissu conjonctif lâche	
3.4.2.1	Eléments cellulaires intrin- sèques principaux	33
3.4.2.2	Substance fondamentale	33
3.4.2.3	Eléments cellulaires extrinsèques	34
3.4.3	Glandes tégumentaires	34
3.4.5	Les réserves d'inclusions	35

CHAPITRE IV-DISCUSSION DES TRAITEMENTS

4.1 Mortalité	75
4.2 Obtention du stade de mue	75
4.3 Variation de la concentration en métabolites pour un stade donné comme conséquence d'un traitement	77
4.4 Variation du pourcentage de forme active/forme totale des enzymes pour un stade donné comme conséquence d'un traitement	78

CHAPITRE V-CONCLUSIONS GENERALES

° ° °

APPENDICE:MATERIEL ET METHODES

1. Matériel biologique	
1.1 Description de l'espèce <u>Carcinus maenas</u>	79
1.2 Récolte	79
1.3 Elevage	80
1.4 Traitements	
1.4.1 Epedonculatation	80
1.4.2 Injection d'ecdysone	81
1.4.3 La température et la photopériode	
1.4.4 Injection d'ecdysone et longue photopériode	82
1.4.5 Injection d'ecdysone et épédonculatation	82
1.5 Prélèvement des tissus	82
2. Dosages enzymatiques	
2.1 La glycogène-phosphorylase	
2.1.1 Principe de la réaction	83
2.1.3 Mode opératoire	83
2.1.3 Préparation des réactifs	85
2.2 La glycogène synthase	
2.2.1 Principe de la réaction	86
2.2.2 Mode opératoire	86

3. Dosages des métabolites	
3.1 Dosage du glucose par la méthode de la glucose oxydase	
3.1.1 Principe du dosage	88
3.1.2 Réactifs	89
3.1.3 Mode opératoire	89
3.2 Dosage du glycogène	
3.2.1 Principe du dosage	90
3.2.2 Réactifs	90
3.2.3 Mode opératoire	91
3.3 Dosage des sucres réducteurs	
3.3.1 Principe du dosage	91
3.3.2 Réactifs	91
3.3.3 Mode opératoire	91
3.4 Dosage de la glucosamine	
3.4.1 Principe du dosage	92
3.4.2 Réactifs	92
3.4.3 Mode opératoire	93
3.5 Dosage de la glucosamine-6-P et de l'acetylglucosamine-6-P	
3.5.1 Principe du dosage	94
3.5.2 Réactifs	94
3.5.3 Mode opératoire	95
3.6 Isolation de la glucosamine-6-phosphate- N-acétylase	
3.6.1 Solutions à préparer	95
3.6.2 Mode opératoire	96
3.7 Dosage des protéines	
3.7.1 Principe du dosage	96
3.7.2 Réactifs	97
3.7.3 Mode opératoire	97

BIBLIOGRAPHIE

ORIENTATION DU MEMOIRE

ORIENTATION DU MEMOIRE
=====

Le cycle de mue chez les crustacés occupe activement l'animal trois saisons sur quatre et mobilise une grande partie des réserves accumulées tout au long de l'année. Nous pouvons considérer l'importance de ce phénomène sous deux angles, selon que l'on envisage ce qu'il permet ou ce qu'il exige de l'animal.

D'une part, il permet de passer de la forme larvaire à la forme adulte (mue de métamorphose), d'augmenter de taille et, chez le Carcinus maenas, de se reproduire (mue de reproduction).

D'autre part, la mue entraîne une dépense d'énergie et l'utilisation de matériaux pour l'édification du nouvel exosquelette. Différents organes sont susceptibles de jouer un rôle dans la mise en réserve et la mobilisation des métabolites utiles lors de la mue : l'hépatopancréas, les muscles, le tissu conjonctif sous-épidermique et le tissu sanguin. L'ensemble des mécanismes impliqués dans la mue est sous contrôle enzymatique, lui même sous contrôle hormonal.

Le contrôle hormonal de la mue, les variations en constituants que subissent différents organes-cibles, ainsi que les principales voies de mise en réserve et de mobilisation des métabolites ont déjà été étudiés. Le contrôle hormonal serait le fait d'un équilibre entre deux hormones : l'une, issue des pédoncules oculaires, inhibitrice de la mue et l'autre issue d'un organe situé sous le bouclier dorsal (organe Y), promouvant la mue (MEGUSAR, 1912 ; HANSTRÖM, 1931 ; BLISS et PASSANO, 1952 ; GABE, 1953 ; ECHALIER, 1954 ; FAUX et HORN, 1968). Au niveau des organes-cibles sensibles à ces hormones, on a montré que l'hépatopancréas (pour le phosphate de calcium, les lipides et le glucose), les muscles (pour la mise en réserve du glucose), l'hémolymphe (pour le métabolisme et la mise en

réserve du glucose ainsi que pour le phosphate de calcium), montrent des variations cycliques suivant la mue (APPLEMAN, 1966 ; HOCHACHKA, 1971 ; MEENAKSHI et SCHEER, 1961 ; SEIFERT, 1982 ; MARREC, 1944 ; JOHNSONS et alii, 1973).

En ce qui concerne le tissu conjonctif sous-épithélial et l'épiderme, des études aux microscopes photonique et électronique ont permis de montrer des variations morphologiques des cellules épidermiques et des fluctuations des réserves incluses dans le tissu sous-épithélial, et ce, suivant le moment du cycle de mue où se trouve l'animal (DENNEL, 1947 ; HEGDAL et alii, 1977a ; KANNUPANDI, 1967c ; DIGBY, 1980 ; GRAF, 1978 ; SPECK et URICH, 1971).

Nous avons choisi de travailler sur l'épiderme et le tissu sous-épidermique car, tout d'abord, ils sont directement impliqués dans la résorption de l'ancien exosquelette ainsi que dans la restauration de la nouvelle cuticule ; ils représentent aussi un lieu important de réserves de métabolites susceptibles de jouer un rôle dans la mue et, enfin, il n'existe, à notre connaissance, aucunes données quantitatives concernant ce phénomène. Nous nous sommes demandés si la quantité de métabolites tels que les protéines, le glucose et ses dérivés, varient de façon significative tout au long du cycle de mue. Une réponse positive à cette question confirmerait les résultats morphologiques déjà obtenus et appuierait l'hypothèse déjà émise selon laquelle ils joueraient un rôle de réserve énergétique lors de l'exuviation, et de substrat lors de l'élaboration du nouvel exosquelette.

Pour répondre à cette question, nous avons dosé dans l'épiderme et le tissu sous-épidermique, et ce, à différents moments de la mue, les protéines, le glucose et le glycogène ainsi que les enzymes limitants pour la glycogénolyse et la

glycogénosynthèse soit respectivement la glycogène phosphorylase et la glycogène synthase. Nous avons finalement dosé la glucosamine qui est, comme le glucose, un précurseur de la chitine.

Notons, enfin, pour conclure cette présentation, que le Carcinus maenas montre une période pendant laquelle il semble suspendre son cycle. Il a dès lors, fallu influencer artificiellement le phénomène de mue afin que les animaux rentrent dans des phases plus actives du cycle. Le but était d'avoir, même en hiver, des individus à différents stades du cycle.

CHAPITRE I - INTRODUCTION

Première partie :

Notions préliminaires

Deuxième partie :

Contrôle de la mue et structures principales impliquées dans la mue

Troisième partie :

Le tégument - description cytologique et dynamique

PREMIERE PARTIE : NOTIONS PRELIMINAIRES

- 1.1 L'exuviation
- 1.2 Le cycle de mue
- 1.3 Les étapes du cycle de mue
- 1.4 L'apolyse

PREMIERE PARTIE : NOTIONS PRELIMINAIRES

1.1 L'exuviation

L'exosquelette des crustacés contient en moyenne 50 % de carbonate de calcium, 5 à 19 % de phosphates de calcium et de magnésium, le reste étant de la chitine (polymère de l'N-acétyl glucosamine) et des protéines. Pour croître, l'animal doit se libérer de son exosquelette. Le rejet de cet exosquelette s'appelle l'exuviation.

1.2 Le cycle de mue

Le processus de mue se déroule de manière cyclique toute la vie d'un individu. Chaque cycle s'étale sur environ un an chez l'adulte Carcinus maenas. Il comprend tous les phénomènes préparatifs à l'exuviation, l'exuviation proprement dite et les phénomènes liés à la formation du nouvel exosquelette. Il y a, en plus, une période de latence pendant laquelle l'animal semble suspendre son cycle : l'intermue. Celle-ci peut durer de quelques semaines à quelques mois.

1.3 Stades de mue

DRACH (1939) a, par son étude, permis d'identifier les stades de mue principaux du cycle de mue. Un stade correspond à une période dans le cycle pendant laquelle le crabe montre une homogénéité dans certaines caractéristiques physiologiques et morphologiques. Le stade est désigné par une majuscule : A, B, C, D et E. Chaque stade peut lui-même être divisé en étapes désignées par un indice ajouté à la majuscule : A₁, A₂, etc...

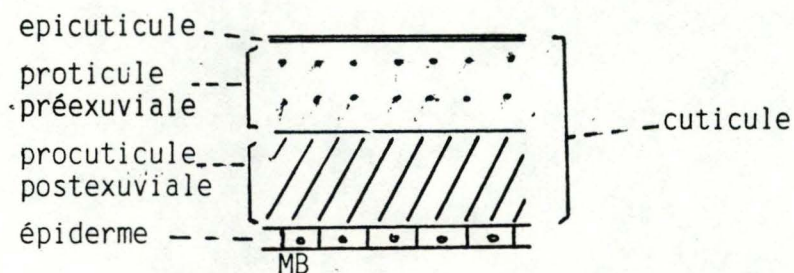
Durée	Caractéristiques physiologiques	Caractéristiques morphologiques
10 - 15 h	(Immédiatement après l'exuviation) <ul style="list-style-type: none"> Absorption d'eau. Inactivité apparente de l'animal (ni déplacement, ni alimentation). 	Déplissement du nouvel exosquelette qui offre une consistance molle.
20 - 40 h	<ul style="list-style-type: none"> Fin de l'absorption d'eau. Début de calcification de la partie antérieure du bouclier dorsal. Déplacement de l'animal, jeune. 	Bouclier dorsal à consistance parcheminée.
2 - 3 jours	<ul style="list-style-type: none"> Calcification croissante de l'exosquelette. Déplacements, jeune. 	Bouclier dorsal durci sauf dans région cardiaque, propodites des pattes déprimables sans casser. Propodites rigides.
quelques jours	<ul style="list-style-type: none"> Début de formation de la couche principale, calcification croissante. Déplacements, alimentation intense. 	Rigidité complète du bouclier dorsal sauf dans région cardiaque, flexibilité de région postérieure des branchiostégites, flexibilité des méropodites des pattes dans le sens de leur aplatissement.
quelques jours	<ul style="list-style-type: none"> Suite de la formation de la couche principale et de la calcification. Déplacements, alimentation intense. 	Rigidité totale du bouclier dorsal, flexibilité très réduite de la région postérieure des branchiostégites.
quelques jours	<ul style="list-style-type: none"> Achèvement de la couche principale. Déplacements, alimentation. 	Rigidité totale de l'exosquelette.
plusieurs semaines ou plusieurs mois	<ul style="list-style-type: none"> Formation de la couche membraneuse. Déplacements, alimentation. 	Test de présence de la couche membraneuse : une cassure d'un fragment du bouclier dorsal n'entraîne pas une séparation des deux morceaux.
quelques jours	<ul style="list-style-type: none"> Décollement de l'épiderme par rapport à l'exosquelette (apolyse), mitoses ectodermiques, genèse des futures soies. Déplacements, alimentation. 	Examen microscopique de l'épipodite branchial externe : faisceau fibrillaire des soies pas encore invaginé sous l'épiderme.
quelques jours	Suite de D ₀ .	Examen microscopique de l'épipodite branchial externe : faisceau fibrillaire des soies invaginé sous l'épiderme.
quelques jours	<ul style="list-style-type: none"> Sécrétion de l'épicuticule, début de sécrétion de la couche pigmentaire du futur exosquelette. Déplacements, fin d'alimentation. 	Cassure d'un dactylopodite : l'extrémité de la patte se dégage de son ancien exosquelette.
quelques jours	<ul style="list-style-type: none"> Résorption de l'ancienne cuticule, suite de l'édification de la couche pigmentaire. Déplacements, jeune. 	Fragilité de la suture épimérienne qui cède sous la pression d'un trait.
quelques heures	<ul style="list-style-type: none"> Achèvement de la résorption de l'ancien exosquelette. Inactivité, jeune. 	Suture épimérienne ouverte : fente bien apparente.
quelques minutes	<ul style="list-style-type: none"> Absorption importante d'eau. 	Soulèvement du bouclier dorsal, dégagement des appendices, rejet de l'ancien exosquelette (exuviation).

Voici un tableau récapitulant les principales observations à faire pour déterminer un stade mue. Ce tableau a été établi par Mme M.-TH. CANTINEAUX-FONTAINE (1978) d'après les observations de DRACH (1939).

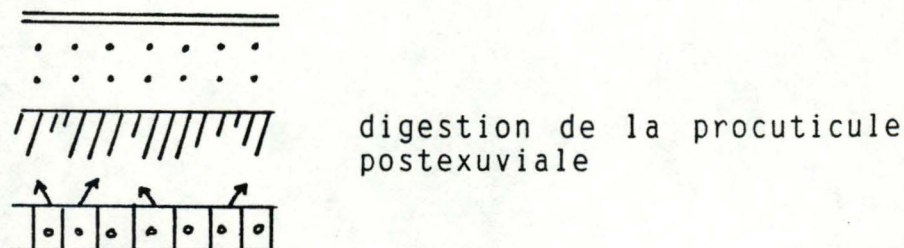
1.4 L'apolyse

L'épiderme se décolle de l'exosquelette aux environs de l'étape D_0 : c'est l'apolyse.

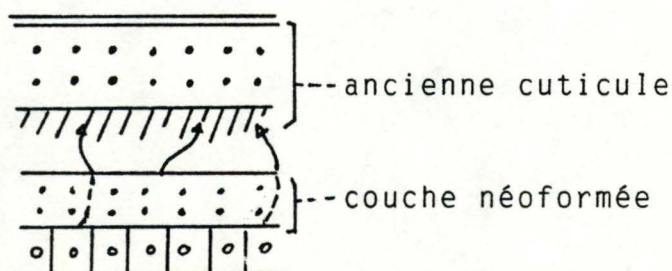
Avant ce phénomène, l'épiderme était étroitement accolé à l'ancienne cuticule.



Lors de l'apolyse, l'épiderme va d'abord sécréter des chitinases qui hydrolysent la chitine en N-acétylglucosamine et des chitobiases qui sont des disaccharidases hydrolysant les chitobioses (polymère de deux acétylglucosamines). Elles sont sans doute sécrétées sous forme inactive et seront activées au niveau de la procuticule, là où elles sont nécessaires à sa digestion (partie postexuviale).



Ensuite, une substance lipidique, qui formera l'épicuticule, est sécrétée. Elle protégera l'épiderme et les couches en formation. Cette membrane est semi-perméable et permet la récupération des ions et des petites molécules (phosphates et carbonates de calcium, acides aminés, acétylglucosamine). Ainsi, la digestion de l'ancienne cuticule pourra se faire sans que les couches néoformées en soient altérées



Etonnamment, l'épiderme de Maja squinado et de Cancer pagurus produisent des chitinases en quantité constante durant tout le cycle de mue (JEUNIAUX, 1963). Alors que la chitobiase y a une activité variant au long du cycle de mue.

o
o o

L'ablation éleative de la glande du sinus n'induit pas la mue alors que la destruction de l'organe X le fait. PASSANO, (1951), BLISS (1965) et JAROS (1979) ont montré que des neurosécrétions élaborées dans l'organe X sont véhiculées via les axones des cellules monopolaires dans la glande sinusinale. A ce niveau, ces substances sont exocytées et se retrouvent dans l'hémolymphe où elles sont véhiculées jusqu'à des sites récepteurs dont la stimulation entrainera différentes réactions métaboliques

La substance sécrétée par l'organe X et qui influence la mue a été isolée et identifiée pour la première fois par FAUX et HORN (1968) qui l'ont appelée la "Moult Inhibiting Hormone" ou M.I.H.

2.1.2 Organe Y

Les organes Y jouent eux aussi un rôle important dans le processus de mue. Chez les Brachioures, ils sont systématiquement accolés à l'épiderme ventral, en avant des chambres branchiales, et sont innervés par le ganglion oesophagien (figure 2). ECHALIER (1956 et 1959) a montré que ces organes sécrètent l'hormone de croissance. Lui, et d'autres auteurs par après, ont établi une homologie entre leur rôle chez les Brachioures et celui de la glande prothoracique chez les insectes. Une ablation bilatérale de ces organes en intermue (stade C4) empêche toute mue et leur réimplantation le rétablit. Il était vraisemblable que l'hormone en question soit un ecdystéroïde semblable à l'hormone de mue des insectes. De fait, en 1956, HAMPSHIRE et HORN ont identifié l'hormone comme étant la crustecdysone (β -ecdysone ou 20 hydroxystérone

Cette hormone de mue (Moult Hormone) diffère de celle des insectes par la présence d'un groupement hydroxyle en C₂₀ (figure 3).

DEUXIEME PARTIE : CONTROLE DE LA MUE ET PRINCIPALES STRUCTURES
IMPLIQUEES DANS LE CYCLE DE MUE

2.1 Structures endocrines contrôlant la mue

2.1.1 Organe X - Glande du sinus

2.1.2 Organe Y

2.2 Principaux organes impliqués dans le cycle de mue

2.2.1 Hépatopancréas

2.2.2 Tissu musculaire

2.2.3 Tissu sanguin

2.2.4 Epiderme et tissu conjonctif sous-épidermique

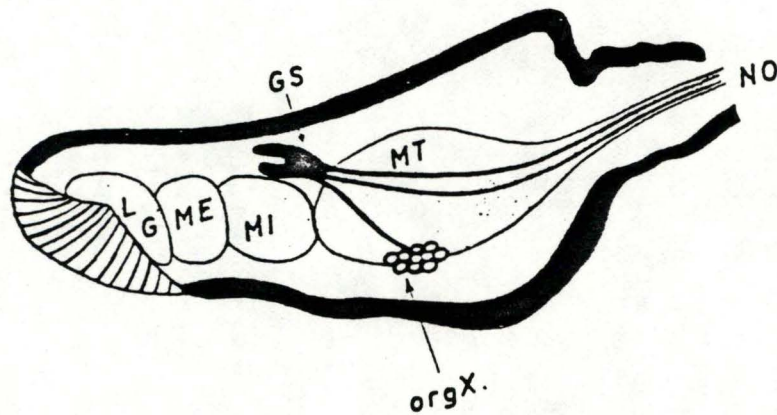


Figure 1

Schéma d'une coupe sagittale d'un pédoncule oculaire de Crustacé Brachyoure montrant les différents lobes nerveux et les glandes endocrines.

L.G: Lamina ganglionaris

M.E: Medulla externa

M.I: Medulla interna

M.T: Medulla terminalis

N.O: Nerf optique

Org.X: Organe X

G.S: Glande sinusaire

(BAUCHAU, 1966)

2.1 Structures endocrines contrôlant la mue

2.1.1 Organe X - Glande du sinus

Chez la plupart des Malacostracés, le protocérébron qui innerve tous les récepteurs céphalothoraciques autres que les antennes et les antennules est localisé en grande partie dans les pédoncules oculaires. Ces pédoncules, non rétractibles, ne peuvent être régénérés et, en 1905, ZELÉNY a remarqué qu'ils jouaient un rôle dans le processus de la mue. En effet, il constata que, chez un crabe épédonculé, les étapes préparatoires à la mue étaient accélérées.

Une coupe dans les pédoncules montre la présence de quatre ganglions nerveux : la lamina ganglionaris, la medulla externa, la medulla media et enfin, la medulla terminalis. Cette dernière est flanquée de deux petites glandes découvertes par HANSTRÖM en 1934 : l'organe X du côté ventral et la glande du sinus du côté dorsal (figure 1). L'organe X est composé du corps de cellules monopolaires à partir desquelles les axones s'éloignent pour se terminer dans une zone tissulaire fortement vascularisée qui forme la glande du sinus. Ces terminaisons, en plus de leurs caractéristiques neuroniques, libèrent des sécrétions qui modulent beaucoup de processus physiologiques.

Le rôle de l'organe X et celui de la glande du sinus dans le contrôle de la mue a été démontré par PASSANO en 1951. L'ablation bilatérale des pédoncules oculaires réduit le temps de mue de tous les crabes testés.

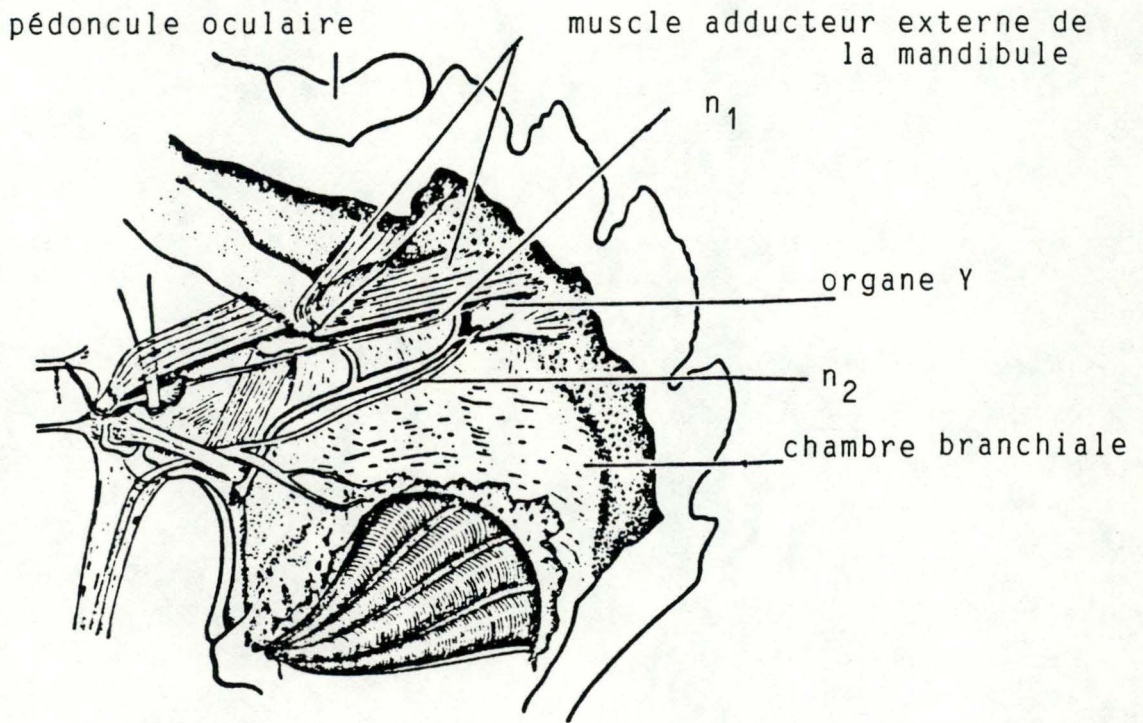


Figure 2

Situation de l'Organe Y de Carcinus maenas (ECHALIER 1954)
 n_1 et n_2 : filets nerveux se rendant à l'Organe Y.

Les organes Y sont aussi responsables de la libération d'un facteur provoquant non pas la préparation à la mue, comme la M.H., mais l'exuviation proprement dite. BLANCHET (1974), ADELUNG (1979), CHARMANTIER (1980), l'appellent le "facteur d'exuviation". La nature chimique de ce facteur n'a pas encore été précisée.

Comme cela apparaît à la figure 4, l'évolution de ces sécrétions hormonales est coordonnée de façon remarquable. Aussi longtemps que les pédoncules émettent la

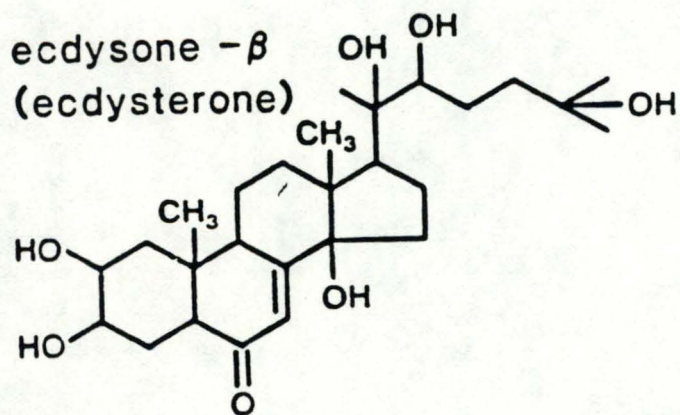
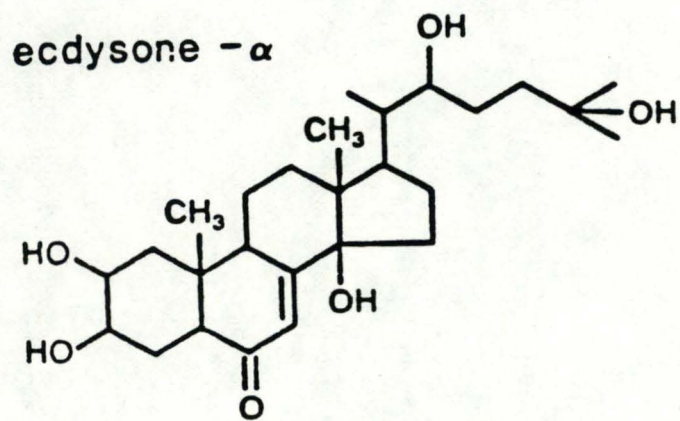


Figure 3

M.I.H., les organes Y sont inhibés et ne libèrent pas la M.H. Lorsque le taux de M.I.H. baisse, l'inhibition est levée et les organes Y libèrent la M.H. sous forme inactive (α -ecdysone) (BAZIN, 1976). Son hydroxylation en forme active (β -ecdysone) se fait à hauteur d'organes tels que l'hépatopancréas, le tube digestif, le tégument et les gonades (BAZIN, 1976). Le contrôle de la production du facteur d'exuviation n'est pas connu.

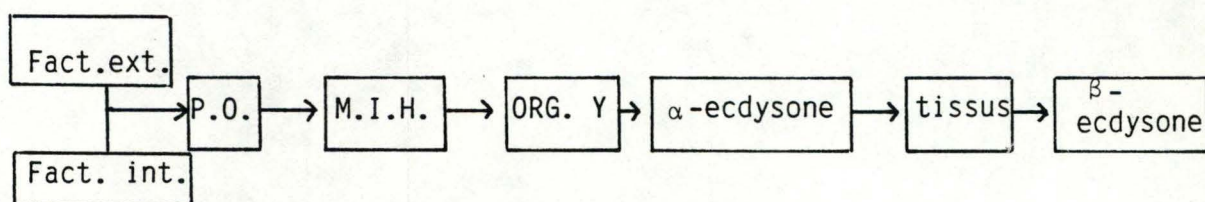
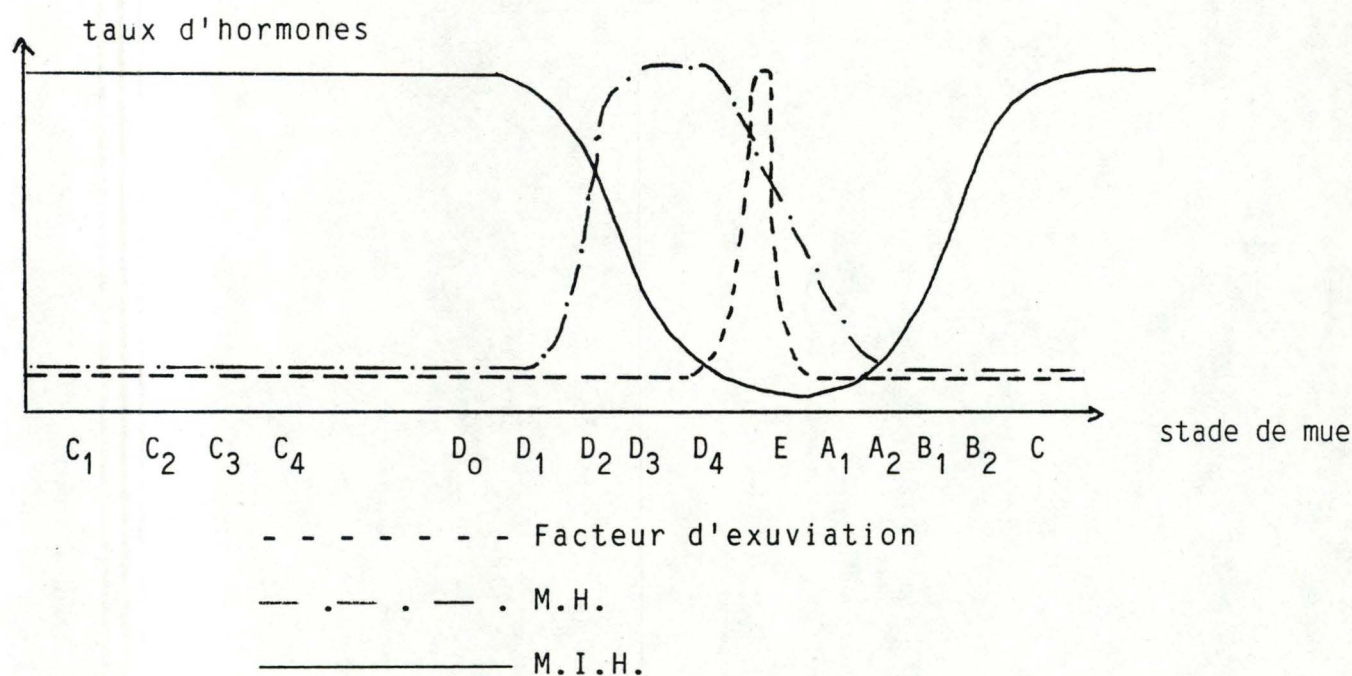


Figure 4

En conclusion, nous pouvons dire que la mue est un phénomène complexe contrôlé en premier lieu par le système nerveux central (protocérébron dans les pédoncules oculaires) via la production de la M.I.H. et ensuite par les organes Y via la production de l' α -ecdysone et du facteur d'exuviation aux derniers stades de mue (stade D à E).

2.2 Principaux organes impliqués dans la mue

Un certain nombre de structures nous intéressent directement dans le processus de la mue :

- soit qu'elles soient le siège de réserves importantes de substances fournissant de l'énergie ou étant à la base de la formation d'une nouvelle cuticule (muscles, hépatopancréas) ;
- soit qu'elles représentent un site de transformation de substances intervenant dans la mue (hépatopancréas);
- soit qu'elles représentent un "moyen de transport" de ces mêmes substances (tissus sanguin).

2.2.1 L'hépatopancréas

L'hépatopancréas - ou glande digestive - est un organe responsable de la synthèse et de la sécrétion d'enzymes digestives ainsi que de l'absorption de matériel alimentaire. Il est aussi impliqué dans le cycle de mue via l'accumulation de réserves inorganiques, de lipides et des sucres. Une partie de ces fonctions est contrôlée par des facteurs hormonaux tels que la M.H.

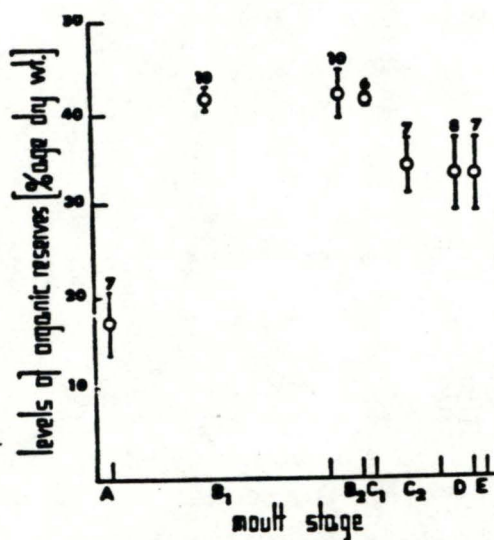


Figure 5

—Relationship between the hepatopancreas organic reserves and moult-stage. Figures over bars show number of animals per analytical sample.
 ○, total lipids;
 Vertical bars represent S.E.

(ALIKHON, 1972)

Chez les Décapodes, il est composé d'un réseau de canaux dont certains sont aveugles, et qui peuvent occuper jusqu'à un dixième de la cavité céphalothoracique (GIBSON, 1979). Les canaux sont bordés d'une mince couche de cellules parmi lesquelles on trouve les cellules E ou embryonnaires, les cellules F ou fibrillaires, les cellules R ou résorbantes et, finalement, les cellules B sécrétant des enzymes. La cellule E, non différenciée, permet un renouvellement continu des autres types de cellules. La cellule B est une grande cellule (15-20 μm), avec un noyau basal comprimé par une grande vacuole occupant 80 à 90 % du volume cellulaire. Les structures intranucléaires sont peu visibles. Elles ne contiennent pas de réserve de lipides, glycogène ou phosphate de calcium. Cette cellule est responsable de la synthèse d'enzymes digestives qui seront exocytées dans la lumière du tube digestif. La cellule R qui représente environ 70 % des cellules épithéliales, est le site d'absorption et de stockage de lipides, glucides et de phosphate de calcium. La cellule F ou fibrillaire est appelée ainsi car elle montre un réseau de RER très important, ainsi qu'un appareil de Golgi très développé. Son rôle est sans conteste celui de modifier et de synthétiser des protéines. On n'y trouve pas d'inclusions lipidiques ni réserves de phosphate de calcium (BUNT, 1967 - BARKER, 1977).

L'activité de l'hépatopancréas est soumise à un cycle qui semble correspondre à celui de la mue (VITZOU et BERNARD, 1890). Ainsi, le phosphate de calcium s'accumule pendant la fin de la prémue et disparaît en postmue (BARKER, 1977). De même, la quantité de lipides est deux fois plus élevée en intermue qu'en postmue (ALIKHON, 1972) (figure 5).

PAVATHY (1972) montre que la vitesse de synthèse et de dégradation du glycogène est sous le contrôle direct de

facteurs endocriniens variant eux-mêmes suivant le cycle de mue.

Par ailleurs, BARKER (1979) a montré que la synthèse d'enzymes digestives dans l'hépatopancréas, ainsi que la capture du matériel alimentaire, sont sous le contrôle de facteurs endocriniens émis par le complexe organe X - glande du sinus.

Il semble donc que l'hépatopancréas soit un organe directement impliqué dans la mue. La quantité de métabolites, la vitesse de synthèse et de dégradation du glycogène, la synthèse d'enzymes digestives, varient suivant ce cycle. Les réserves de l'hépatopancréas, libérées dans le tissu sanguin, peuvent être utilisées pour l'élaboration du nouvel exosquelette. C'est le cas du glucose, précurseur de la chitine, et du calcium jouant un rôle dans la solidification de la cuticule.

2.2.2 Le tissu musculaire

Les muscles situés en-dessous du tissu conjonctif sous-épidermique sont bien individualisés en faisceaux. Ils sont tous striés et s'attachent aux parties dures de l'exosquelette (apodèmes). On distingue :

- les muscles des membres dont les plus développés sont les deux muscles des pinces (adducteur puissant qui ferme la pince et abducteur qui l'ouvre) ;
- les muscles des organes, plus développés dans la région de l'estomac ;
- deux paires de muscles abdominaux (description d'après M.L. HUBIN, 1985).

Ce tissu joue un rôle dans la mise en réserve du glucose. Bien que la concentration en glycogène y soit plus basse que dans l'hépatopancréas (HUBIN, 1985), la masse de tissu musculaire est telle qu'ils sont considérés comme un réservoir important de glucose. La synthèse de glycogène y est sous la dépendance de facteurs tels que l'insuline, issue probablement de la paroi gastrique et l'hormone hyperglycémiant issue des pédoncules oculaires (APPLEMAN, BIRNBOUWER et TORRES, 1966). Ces résultats ont été confirmés par HOCHACHKLI, FREED, SOMERO et PROSSER (1971). La plupart des sécrétions issues des pédoncules oculaires sont soumises à des variations résultant de différents cycles tels que celui de la mue et de la photopériode. Il est possible que le glucose des muscles joue un rôle dans l'élaboration de la chitine lors de la mue et fournisse aussi un apport énergétique nécessaire lors de l'exuviation, mais cela n'a pas encore été démontré.

2.2.3 Le tissu sanguin

Il est composé de l'hémolymphe au sein duquel se trouvent les cellules sanguines ou hémocytes. La composition de l'hémolymphe varie beaucoup chez un même individu. Cette variation est entre autre sous l'influence de l'absorption de nourriture et du rythme nycthéral.

Les hémocytes sont issus d'un organe hématopoïétique découvert par CUENOT en 1893. Chez Carcinus maenas, il revêt toute la paroi dorsale et les parois latérales de l'estomac broyeur, jusqu'à la région pylorique et se montre constitué d'une accumulation de nodules lymphatiques séparés par du tissu conjonctif (MARREC, 1944).

MARREC a aussi montré des variations dans l'activité de cet organe au cours de la mue: pendant toute la période précédant la mue, les lymphocytes s'accumulent dans l'organe et ils seront libérés lors de l'exuviation. Ces résultats ont été confirmés par CHARMANTIER en 1971, et ensuite, par BAUCHAU et PLAQUET en 1973. Les travaux de BAUCHAU et PLAQUET plaident en faveur d'une intervention des granulocytes dans la préparation de l'exuviation et dans l'édification de la cuticule. Cette interprétation serait renforcée s'il se confirmait que le tissu conjonctif sous-épidermique retenait les hémocytes comme le suggérait DRACH (1939).

Trois ou quatre types d'hémocytes ont été décrits selon les espèces étudiées. Leur classification est rendue difficile par l'existence de nombreux intermédiaires entre les cellules hyalines (sans granules) et les granulocytes (à gros granules). Les trois types d'hémocytes décrits habituellement sont les hémocytes hyalins, semi-granuleux et les granulocytes. Ils n'ont pas de rôles bien différenciés et participent tous aux mécanismes de la coagulation. Cette dernière étant le fait qu'un corps étranger puisse se voir séquestré dans un épais manchon membranaire (BAUCHAU et de BROUWER).

Il apparaît actuellement de plus en plus clairement que l'hémolymphe joue un rôle non négligeable dans la mise en réserve et le métabolisme des polysaccharides. JOHNSTON et DAVIS (1971) constatent que les proportions de polysaccharides sont plus élevés dans l'hémolymphe que dans l'hématopancreas. Ils observent aussi que les hémocytes ont des quantités de glycogène dépassant celles nécessaires à leur métabolisme propre. Ils estiment donc qu'une partie de leur charge polysaccharidique pourrait servir à la synthèse de la chitine au cours de la mue.

WILLIAMS et LUTZ (1975) voient dans ce surplus de glycogène un réservoir de glucose facilement mobilisable en cas de besoin.

2.2.4 L'épiderme et le tissu conjonctif sous-épidermique (mésenchyme)

Ces tissus ont été étudiés surtout en microscopie photonique et électronique. Leur importance est double car, comme déjà mentionné, ils sont d'une part à la base de la digestion et de la résorption de l'ancienne cuticule, et, d'autre part, secrètent le nouvel exosquelette. De plus, ils constituent un lieu de réserve important.

Le fait que ces tissus constituent l'objet d'étude de ce mémoire, nous a poussé à les décrire plus en détail dans le chapitre suivant.

o

o o

TROISIEME PARTIE : LE TEGUMENT - DESCRIPTION HISTOLOGIQUE ET DYNAMIQUE

- 3.1 Description générale
- 3.2 L'épiderme
 - 3.2.1 Aspects généraux
 - 3.2.2 Morphologie des cellules composant l'épiderme
 - 3.2.2.1 Cellules principales
 - 3.2.2.2 Cellules pigmentaires
 - 3.2.3 Organes sensoriels
 - 3.2.3.1 Mécanorécepteurs
 - 3.2.3.2 Chémorécepteurs
 - 3.2.3.3 Photo- et thermorécepteurs
- 3.3 La cuticule
 - 3.3.1 Histologie de la cuticule
 - 3.3.1.1 L'épicuticule
 - 3.3.1.2 La procuticule
 - 3.3.2 La chitine
 - 3.3.2.1 Structures moléculaires
 - 3.3.2.2 Synthèse et régulation
 - 3.3.3 Les protéines
 - 3.3.3.1 Diversité des protéines cuticulaires
 - 3.3.3.2 Sclérotisation ou tannage quinonique
 - 3.3.4 Le calcium
 - 3.3.4.1 Calcification
 - 3.3.4.2 Mise en réserve et mobilisation
 - 3.3.5 Lipides
 - 3.3.6 La cuticule comme réservoir de nourriture
- 3.4 La mésenchyme sous-épidermique
 - 3.4.1 Aspects généraux
 - 3.4.2 Description du tissu conjonctif lâche
 - 3.4.2.1 Eléments cellulaires intrinsèques
 - 3.4.2.2 Substance fondamentale
 - 3.4.2.3 Eléments cellulaires extrinsèques
 - 3.4.3 Glandes tégumentaires du mésenchyme
 - 3.4.4 Les réserves d'inclusion

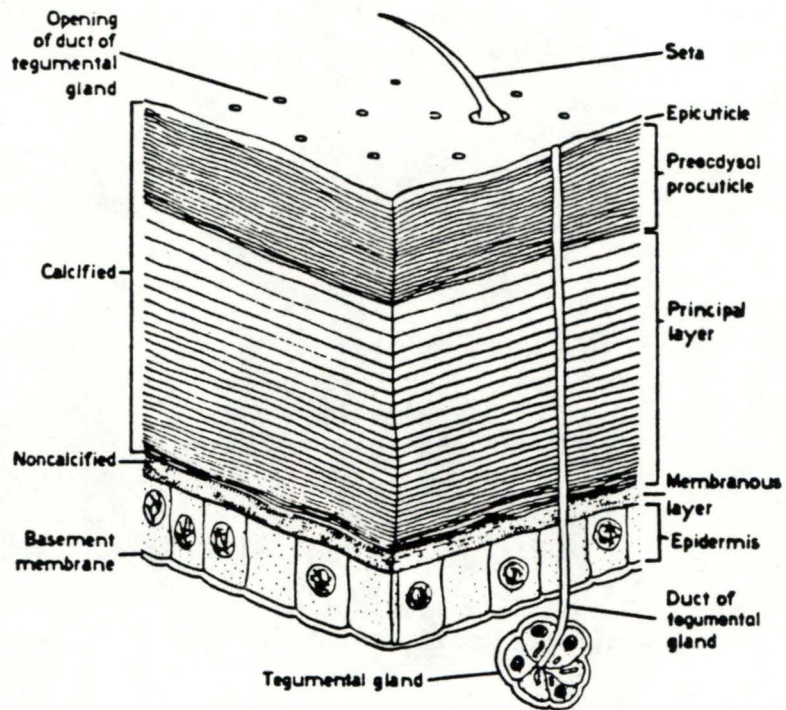


Figure 6 (SKINNER, 1962)

3.1 Description générale

L'épiderme, appelé aussi hypoderme, est constitué d'une fine couche de cellules qui peuvent montrer une intense activité sécrétoire (HUBERT et CHASSARD-BOUCHAUD, 1978). Il repose sur une membrane basale. Des cellules pigmentaires ou des cellules du tissu sous-épidermique peuvent s'insérer dans cet épiderme (TRAVIS, 1955 ; SKINNER, 1962 ; GREEN et NEFF, 1972). Certaines cellules épidermiques se différencient en cellules sensorielles.

La couche cuticulaire est subdivisée en plusieurs sous-couches. La fine couche externe, l'épicuticule, est caractérisée par l'absence de chitine. En-dessous, on trouve la procuticule qui contient de la chitine. Elle est divisée en couches préexuviale et postexuviale sécrétées respectivement avant et après l'exuviation. La procuticule postexuviale est subdivisée en couche principale et couche membraneuse (figure 6).

3.2 L'épiderme

3.2.1 Aspects généraux

Le tissu épidermique est constitué de cellules cubiques ou cylindriques accolées les unes aux autres. Elles reposent sur une membrane basale. La morphologie variable des cellules épidermiques est liée aux étapes du cycle de mue, de sorte que lors de la description de ce tissu, il est nécessaire de mentionner le stade atteint par l'animal.

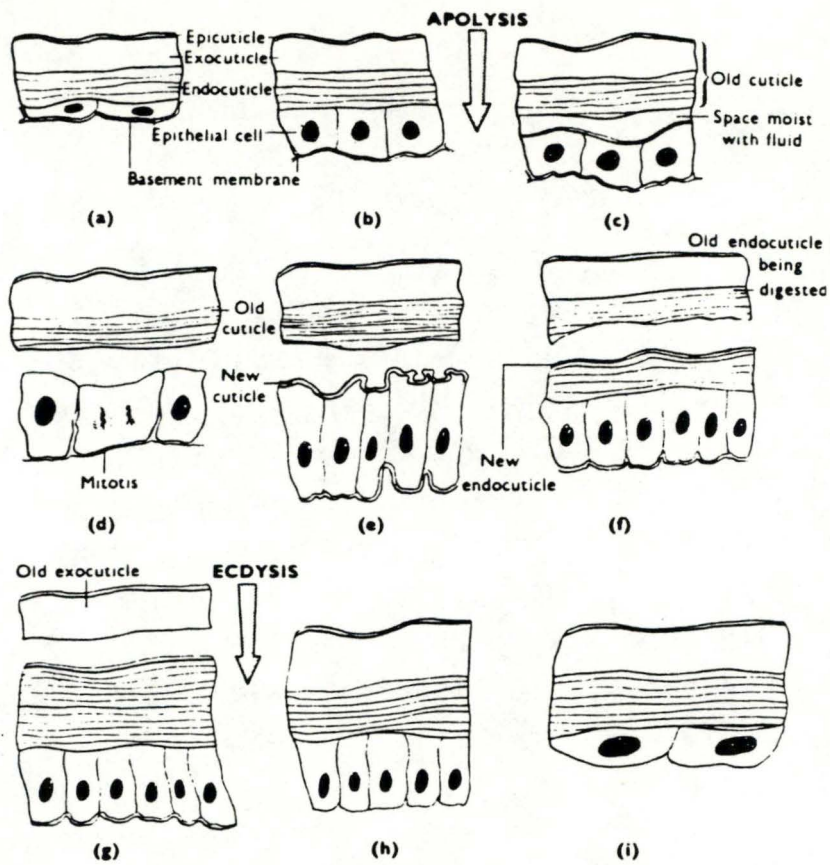


Figure 7

Diagram of the sequence of epidermis and cuticle changes throughout a moulting cycle. (a) Resting epidermis. (b) Cells enlarging and becoming active. (c) Apolysis, separation of cells from the old cuticle. (d) Mitosis. (e) Commencement of formation of the new cuticle, secretion of the epicuticle. (f) Digestion and absorption of the old endocuticle and secretion of the new procuticle. (g) Old endocuticle completely digested away, new procuticle increased in thickness. (h) The old cuticle has been shed by ecdysis. (i) The epidermal cells have returned to a resting state.

(BLISS, 1983)

Voici, brièvement, les étapes visualisables au microscope photonique : les cellules de l'épiderme s'activent et se séparent de l'ancienne cuticule (apolyse); cet épiderme grandit ensuite par multiplication cellulaire. Une nouvelle cuticule est sécrétée, qui recouvre la surface épithéliale. Ensuite, lors de l'exuviation, l'ancienne cuticule est rejetée, l'épiderme et la nouvelle cuticule se déplissent et atteignent leur taille maximale. Finalement, les cellules épidermiques perdent leur aspect cylindrique, s'aplatissent et la nouvelle cuticule durcit (figure 7).

3.2.2 Morphologie des cellules composant l'épiderme

3.2.2.1 cellules principales :

ce sont des cellules qui sécrètent la cuticule. Elles sécrètent également des enzymes et d'autres substances, par leur pôle apical. Elles peuvent aussi se différencier en cellules sensorielles primaires. En intermue, la cellule épidermique principale est aplatie, les composants subcellulaires sont difficiles à distinguer. La surface apicale est accolée étroitement à la cuticule et il y a de nombreux fins filaments cytoplasmiques qui y pénètrent profondément (figure 8).

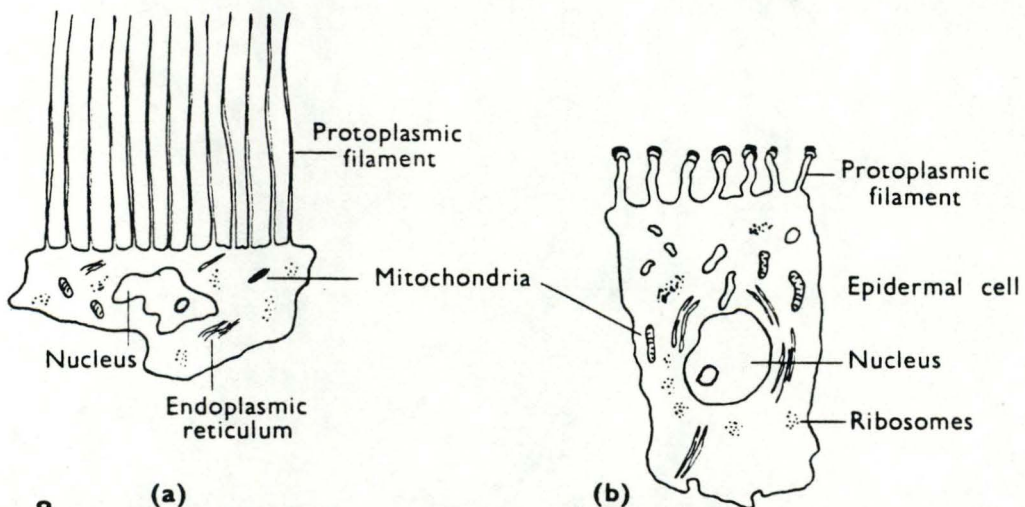


Figure. 8 (a) Diagram of a resting and active epidermal cell. (a) Resting cell separated from the cuticle. (b) Active cell in the early stages of cuticle formation.

Sous le pôle basal de la cellule, on trouve la membrane basale qui sépare l'épiderme de la cavité hémocoelienne. Le noyau de la cellule contient un grand nucléole. Il y a peu de mitochondries visibles et celles-ci possèdent des crêtes peu développées. Durant les stades autres que l'intermue, la cellule devient cubique et même cylindrique, avec les composants subcellulaires bien visibles (figure 8). Le noyau est important et les mitochondries ont des crêtes plus développées.

3.2.2.2 cellules pigmentaires :

Sous l'épiderme, mais avec des prolongements s'insérant entre les cellules épidermiques, on trouve les cellules pigmentaires ou chromatophores. Ces cellules montrent des expansions nombreuses et ramifiées. Un chromatophore peut donner une couleur rouge, jaune, noire ou blanche, suivant qu'il contient des erythrophores, des xanthophores, des mélanophores ou des leucophores (figure 9).

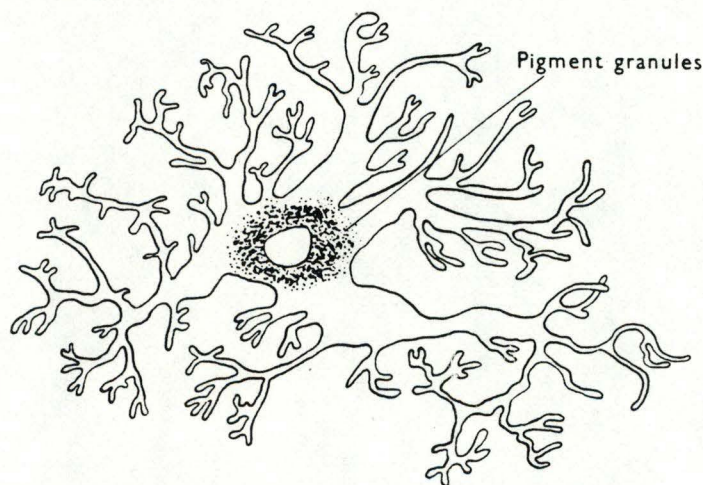


Figure 9 : (R.U. CLARKE, 1973)

chromatophore

Les pigments sont capables de migrer dans la cellule. HOGBEN a établi une classification de l'état de dispersion des pigments :

- 1er stade : les pigments sont concentrés au milieu de la cellule
- 2me stade : la tache pigmentaire montre de petites expansions
- 3me stade : les expansions se développent
- 4me stade : les pigments sont dispersés dans la cellule, mais on voit encore le corps central
- 5me stade : le corps central a disparu

MEGUSAR (1912) et ABRAMOWITCH (1932) ont montré que la dispersion des pigments était maximale le jour et à marée basse. Ces résultats ont été confirmés par BROWN (1952), JESEFSON et FERNLUND (1962 et 1982). Ces derniers ont montré que ces changements dépendaient de chromatophorotropines issues des pédoncules oculaires.

3.2.3 Organes sensoriels

Les cellules sensorielles primaires sont des cellules modifiées pour répondre à une forme d'énergie, en générant une série d'impulsions nerveuses qui seront transmises au système nerveux central. Ainsi des photons, des variations de pressions, ou des produits chimiques peuvent être à la base de ces impulsions.

La cellule sensorielle est aussi un amplificateur. Son seuil de sensibilité peut être tel que dans certains cas, un seul photon peut initier un message. La cellule

sensorielle primaire est presque toujours associée à d'autres cellules pour former un organe sensoriel. Les propriétés principales de la cellule sensorielle permettent de grouper les organes en mécanorécepteurs, chémorécepteurs, photorécepteurs et thermorécepteurs.

3.2.3.1 Mécanorécepteurs :

les mécanorécepteurs les plus simples sont formés d'une soie souple réagissant au toucher, aux mouvements de l'air ou aux changements de pression. En fait, chaque mécanorécepteur consiste en une cellule (la cellule trichogène) qui montre un fin filament cytoplasmique recouvert de cuticule. Le corps de cette cellule ainsi que la base du filament non cuticularisé sont emmanchés par une autre cellule (la cellule tormogène) qui, elle, est recouverte d'une très fine couche cuticulaire (figure 10).

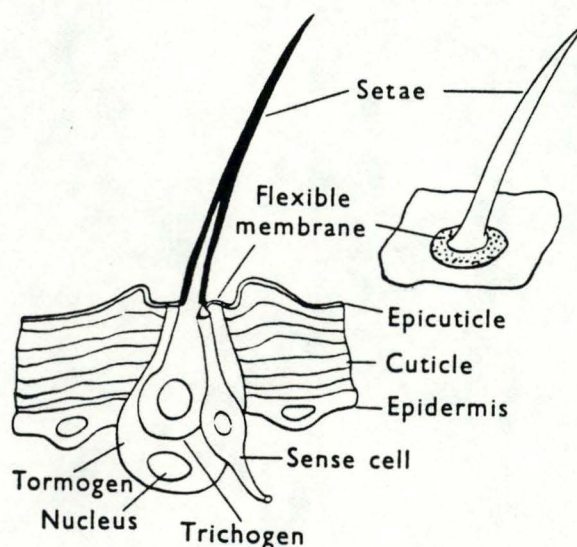


Figure 10 : (R.U. CLARKE, 1973)
Sensilla trichodea

La soie peut bouger dans toutes les directions. Ses mouvements sont détectés par une cellule sensorielle primaire dont la terminaison distale est insérée à la base de la soie. Une quatrième cellule, non représentée sur la figure, ensère la partie proximale des cellules trichogène, tormogène et sensorielle, les isolant des autres cellules. On appelle cet organe le sensilla trichodea.

Il existe d'autres types de mécanorécepteurs, les barorécepteurs particulièrement sensibles aux modifications que subit l'exosquelette lors des déplacements de l'individu. Ceux-ci engendrent des modifications de pression qui causent la déformation de la surface d'une cellule sensible. Cette déformation engendre une dépolarisation au niveau de l'extrémité d'une cellule sensorielle primaire, placée au niveau de la surface de la cellule sensible (figure 11).

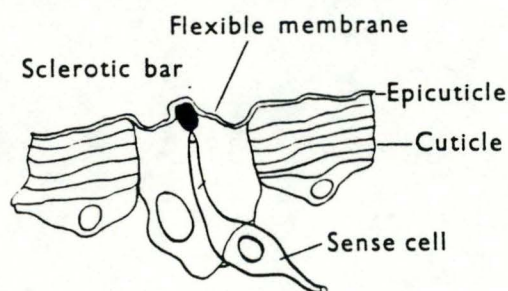


Figure 11 :
Barorécepteur

Un dernier type de mécanorécepteur est le statocyste. Celui-ci est constitué d'une invagination du tégument formant ainsi un sac sphérique en contact avec l'environnement par le site d'invagination. Ce sac contient un fluide ainsi qu'un ou plusieurs corps inertes : souvent des grains de sable cimentés ensemble (les statolithes). La partie sensori-

elle est formée d'un ensemble de sensilla trichodea. Le mouvement de l'animal n'est pas transmis immédiatement aux statolithes ou au fluide dans le statocyste. L'inertie fait d'eux, pour un moment, un point stationnaire de référence pour la vitesse, la durée et la direction du mouvement. Ces renseignements sont transmis au système nerveux central. En plus, les statolithes, soumis au champ gravitationnel, donnent une information quant à la position relative de l'individu par rapport à ce champ (figure 12).

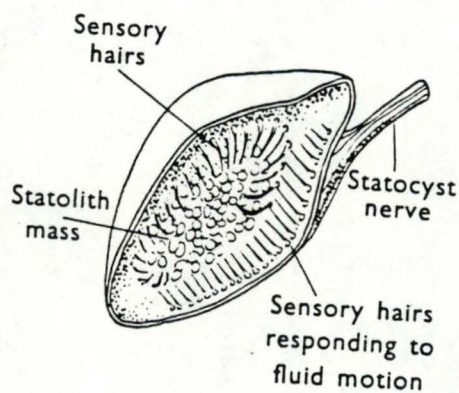


Figure 12 : (R.U. CLARKE, 1973)
Statocyste

3.2.3.2 chémorécepteurs :

les cellules primaires sensorielles de ces organes peuvent faire la discrimination entre différents produits chimiques. L'amplitude de la réponse est proportionnelle à la concentration du produit stimulant. Le mécanisme de discrimination des produits stimulants n'est pas encore connu; il semble clair cependant que différentes cellules sensorielles ont différents pouvoirs discriminatoires. Par exemple, certaines sont sensibles aux

sucres, d'autres aux sels monovalents (figure 13).

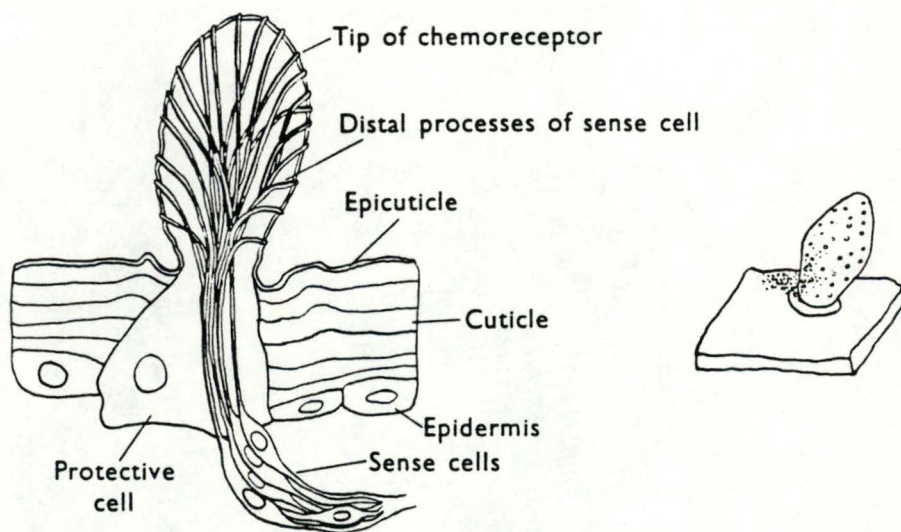


Figure 13 : (R.U. CLARKE, 1973)

Chémorécepteur

Généralement, un organe chémorécepteur est composé de plusieurs cellules sensorielles. Une cellule épidermique est modifiée et forme une couche cuticulaire montrant de nombreux pores exposant ainsi l'extrémité des cellules sensorielles à l'environnement extérieur. Les corps des cellules sensorielles sont tassés les uns contre les autres, à la base de la cellule modifiée et l'ensemble des prolongements forme un gros filament traversant celle-ci.

3.2.3.3 photorécepteurs et thermorécepteurs :

Nous nous limitons à signaler leur existence.

Les premiers, en effet, sont rassemblés, au niveau des pédoncules oculaires et ne font donc pas partie du tissu prélevé et étudié ; les seconds supposés exister dans l'épiderme des crustacés n'ont fait, à ma connaissance, l'objet d'aucune description détaillée.

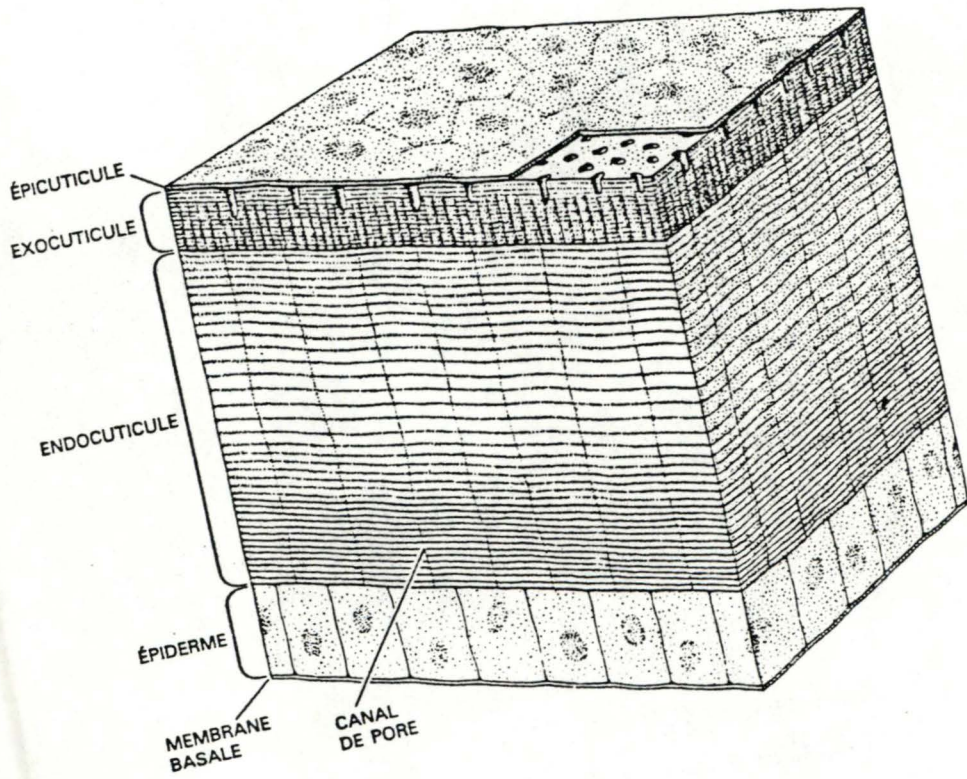


Figure 14 (CAMERON, 1985)

Coupe transversale dans le tégument d'un Crustacé Brachyoure

3.3 La cuticule

3.3.1 Histologie de la cuticule

3.3.1.1 L'épicuticule :

L'épicuticule est composée de deux couches: une fine membrane externe et une couche interne plus épaisse qui peut être tannée (DENNEL 1947). Elle est principalement constituée de protéines, de lipides, et de sels de calcium mais pas de chitine. La surface peut montrer des reliefs semblables à des "cratères", des microvillosités, etc. (CHARAGOZLAU, VAN GINNEKEN et BOULIGAND, 1957).

3.3.1.2 La procuticule :

Elle apparaît constituée de lames fibreuses parallèles à la surface. Les fibrilles qui les constituent sont elles-mêmes pour la plupart parallèles entre elles. Certaines, cependant, semblent décrire des arcs paraboliques entre les lames fibreuses. Ces fibrilles sont constituées de chitine entourée d'une matrice protéique (RUDALL, 1969 ; NEVILLE, 1970 ; WEIS-FOGH, 1970). Elles se répartissent en microfibrilles de 0,28 μ m de diamètre et en macrofibrilles qui sont en fait des ensembles plus ou moins importants de microfibrilles. Des cristaux de calcite occupent l'espace existant entre les microfibrilles. On ne trouve de sels de calcium ni dans la couche membraneuse ni dans les membranes intersegmentaires.

La procuticule est divisée en couche préexuviale et postexuviale. La procuticule préexuviale ou procuticule primaire, est la portion sécrétée avant l'exuviation. Les espaces entre les lames fibreuses paraissent plus grands que dans la procuticule postexuviale. Beaucoup d'auteurs utilisent le terme d'exocuticule pour désigner cette couche.

Elle peut être légèrement tannée et résiste à la digestion par le fluide exuvial durant la prémue. La procuticule postexuviale ou procuticule secondaire, est constituée de deux couches : la couche principale, calcifiée, et la couche interne membraneuse non calcifiée (DRACH, 1939) (figure 14). Dans la couche principale, les cristaux de calcium sont arrangés parallèlement aux microfibrilles (HEGDOLL et alii, 1977 a).

3.3.2 La chitine

3.3.2.1 Structure moléculaire :

La chitine est un polymère de 80 à 90 % de N acétylglucosamine et de 20 à 10 % de glucosamine (HACKMANN et GOLDBERG, 1974).

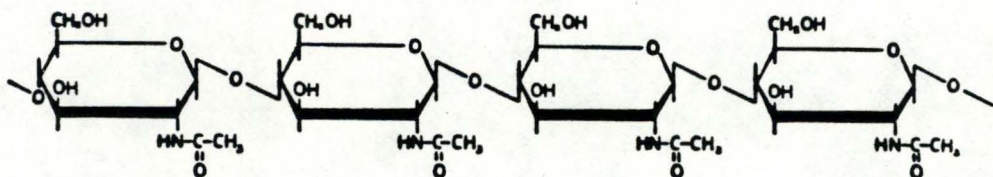


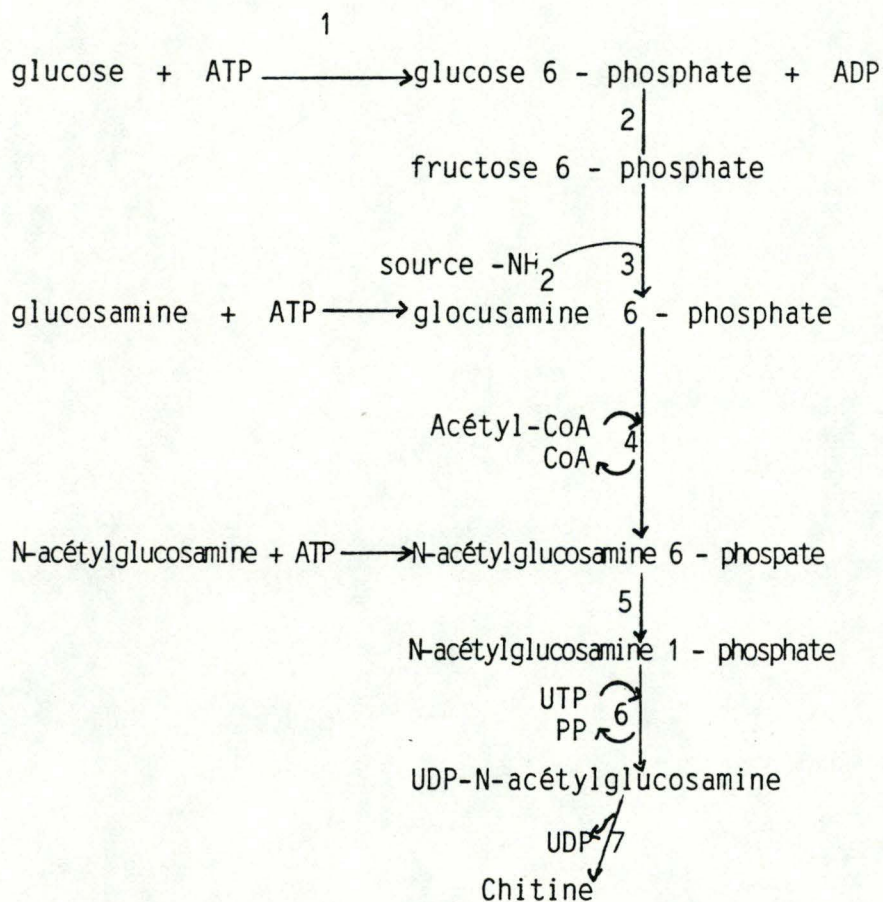
Figure 15 :

Structure moléculaire de la chitine

On la trouve sous trois formes suivant l'orientation des molécules. Dans la forme β , les chaînes de chitine sont parallèles entre elles. Dans la α , ces chaînes ont des directions antiparallèles et dans la forme γ , les chaînes sont groupées par trois : deux dans une direction, la troisième dans une autre. Ces trois formes peuvent être différenciées par diffraction aux rayons X. On ne trouve que la forme α chez les crustacés ; c'est la forme la plus stable car elle permet des ponts hydrogènes entre les différentes chaînes.

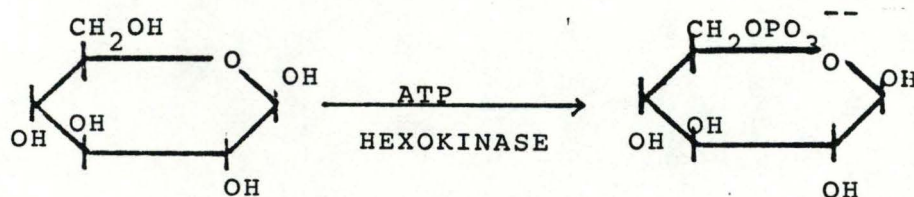
3.3.2.2 Synthèse et régulation de la chitine :

Le schéma probable de la synthèse de la chitine chez les crustacés est le suivant:



Les enzymes intervenant dans les étapes 1 et 6 ont été identifiées chez Locusta migratoria (CAND et KILBY, 1962). Les enzymes des étapes 2 et 3 ainsi que 5, 7 et 9 l'ont été chez Orconectes (LANG, 1971 ; SPECK et alii, 1972 ; GUINET STEVENSON, 1973 ; PAHLIC et STEVENSON, 1978).

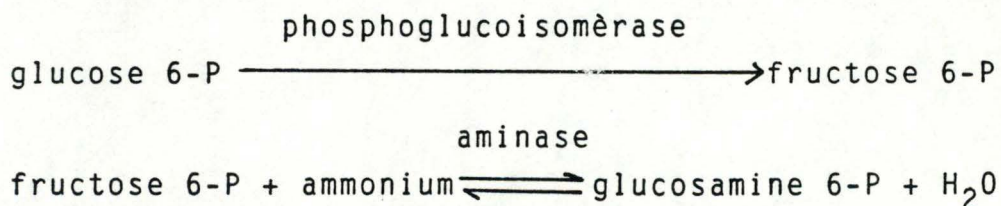
1ère réaction : formation du glucose 6-phosphate



L'hexokinase catalyse le transfert du groupement phosphate de l'adénosine diphosphate au glucose ; Il en résulte de l'adénosine diphosphate et du glucose 6-phosphate, dérivé presque universellement rencontré dans les étapes initiales des voies métaboliques des glucides. Le glucose 6-phosphate peut être aussi formé à partir du glucose 1-phosphate ; cette réaction est catalysée par une phosphoglucomutase.

2me et 3me réactions : formation de la glucosamine 6-phosphate

Le précurseur immédiat du Ga 6-P (glucosamine 6-phosphate) est le fructose 6-phosphate ; il y aura donc d'abord transformation du glucose 6-P en fructose 6-P par l'action d'une phosphoglucoisomérase. Ensuite, il y a formation du dérivé aminé par fixation d'ammonium catalysée par une aminase.

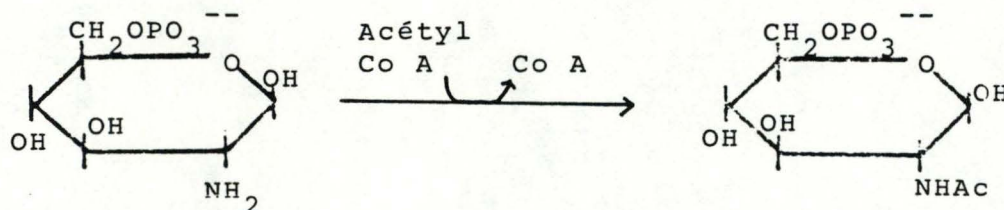


Une deuxième voie de formation de Ga 6-P peut se faire par une transamination, la glutamine jouant le rôle de donneur et se transformant en glutamate.

Une troisième voie de formation de la Ga 6-P se réalise par adjonction d'un groupement phosphate à de la glucosamine déjà présente dans la cellule épidermique.

4me réaction : formation d'acétylglucosamine 6-P

L'acétylation apparaît en présence de l'acétate activé, lié au Coenzyme A. Le transfert des résidus acétyl de l'acétyl-CoA au groupement aminé de l'hexosamine 6-P est catalysé par une transacétylase et s'effectue selon l'équation suivante :

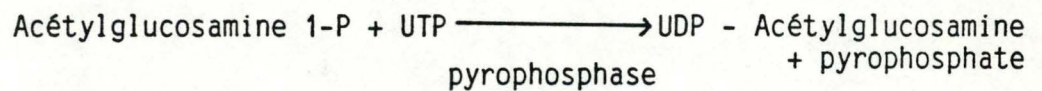


L'acétylglucosamine 6-P peut provenir de la phosphorylation d'acétylglucosamine présent dans la cellule.

5me et 6me réactions : formation d'uridine -
diphosphate-acétylglucosamine

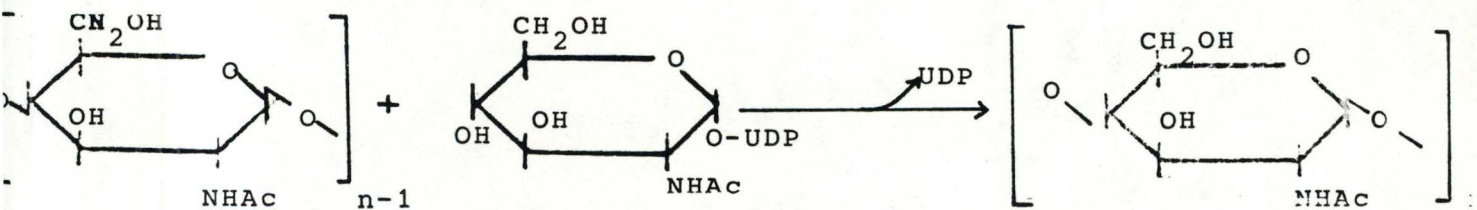
Une phosphoglucomutase fait passer le groupement phosphate de la position 6 à la position 1 avec formation d'acétylglucosamine 1-P. Les sucres simples ne participent pas à la formation de polymères.

La découverte des uridine-nucléotides comme molécules possédant des liaisons riches en énergie, leur identification dans les tissus où s'accomplit la synthèse des constituants glucidiques prouvent leur importance biologique. La formation de la chitine plus particulièrement exige constamment "l'activation" des molécules qui doivent participer à la constitution des liaisons. Cette activation résulte d'un couplage avec un nucléotide qui, en général, est représenté par l'uridine-triphosphate (UTP).



7me réaction : formation de chitine

Pour participer au processus de polymérisation, les sucres simples sont libérés de leur complexe nucléotidique grâce à l'activité d'une pyrophosphatase. L'énergie libérée lors de la réaction permet au monosaccharide de se rattacher au résidu terminal des accepteurs (carbone en position 4 des autres molécules d'acétylglucosamine).



Parmi les étapes décrites, il y en a trois où la synthèse de la chitine semble particulièrement contrôlée : la troisième étape, probablement parce que le fructose 6-P constitue en même temps le point de départ de la glycolyse; la sixième, car elle demande beaucoup d'énergie ; la septième, parce qu'elle est celle qui donnera le produit final dont la vitesse de synthèse doit être en accord avec les besoins de l'animal. Les enzymes intervenant dans ces trois réactions ont une activité qui dépend directement du cycle de mue (CAREY, 1965 ; HAHNKE, 1971 ; RICHARDS et RICHARDS, 1977).

3.3.3 Les protéines

3.3.3.1 Diversité des protéines cuticulaires :

La cuticule semble contenir une grande variété de protéines. STEVENSON (1969) en utilisant une série de réactifs dégradant progressivement l'exuvie de Orconectes samborni, a trouvé 21 % de protéines non liées à la chitine ou à d'autres protéines, 22 % sont liées par des forces VAN der WAALS, 2 % par des ponts hydrogène, 2 % par des ponts disulfures et 53 % par d'autres types de liaison. Différentes réactions histochimiques ont permis de mettre en évidence la grande diversité des protéines (MARGET et KRISHNAM, 1974 ; KAMUPANDI, 1976c).

3.3.3.2 Sclérotisation ou tannage quinonique :

Dans le processus de sclérotisation, une phénoloxydase oxyde les phénols en quinones formant des liaisons avec certains groupes des chaînes protéiques adjacentes. Ces phénoloxydases ont été trouvées chez beaucoup de crustacés, notamment au niveau de l'épicuticule du Carcinus maenas. La sclérotisation est initiée par la sécrétion dans la cuticule de groupes phénol qui servent de précurseurs au tannage quinonique. Le N-acétyldopamine a été trouvé chez le crabe Ucca pugnax (SUMMERS, 1967) et plus récemment le N-acétylnoradrénaline (VACCA et FINGERMAN, 1975). Le transport de ces précurseurs dans la cuticule se fait probablement via des protéines.

Une réaction bien connue est le prélèvement de la thyrosine de l'hémolymphe par les cellules épidermiques. Celles-ci la transforment en dopamine puis en acétyldopamine qui est exocytée au pôle apical et transportée dans la cuticule. Là, elle est oxydée par l'oxygène de l'air via la phénoloxydase en phénols puis en quinones. Celles-ci réagissent avec le groupement sulfhydryque des protéines cuticulaires.

3.3.4 Le calcium

3.3.4.1 Calficitation :

Le carbonate de calcium, principal sel minéral de la cuticule, est en équilibre avec le Ca^{++} et l' HCO_3^- dans l'eau de mer ou les fluides corporels du crabe, mais cet équilibre est facilement modifié par des fluctuations de pH. Une légère baisse du pH provoque la dissociation du carbonate de calcium en ion calcium (Ca^{++}) et ions carbonates (CO_3^{--}). Une élévation du pH sus-

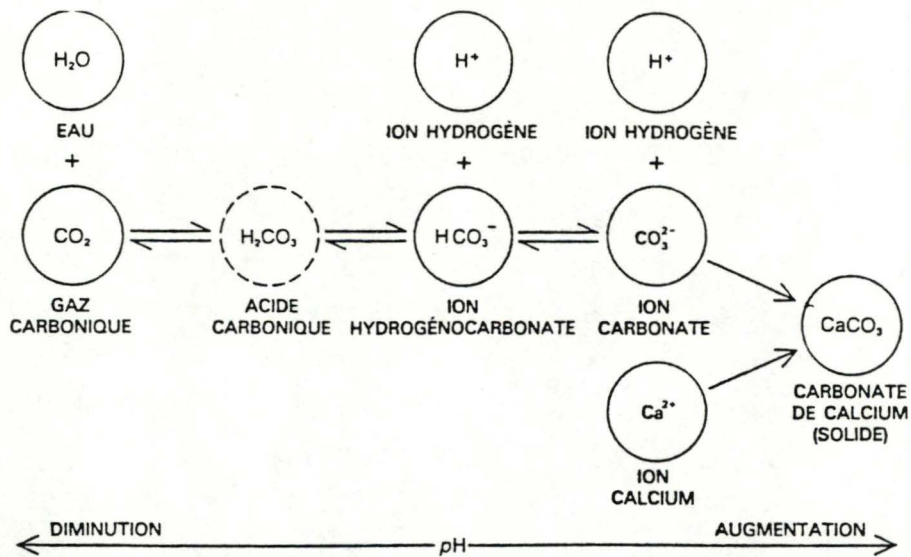


Figure 16 (CAMERON, 1985)

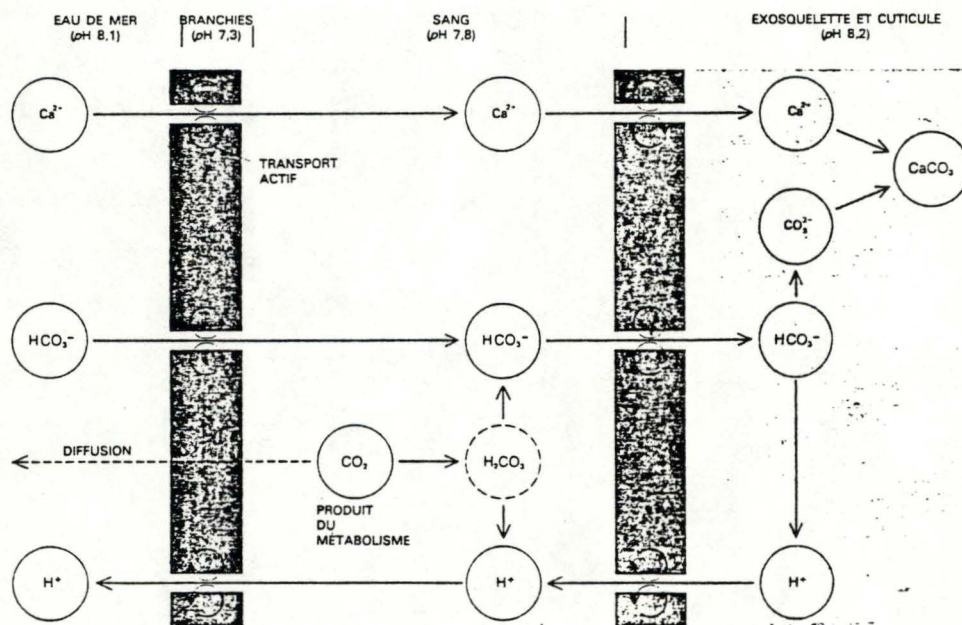


Figure 17 (CAMERON, 1985)

cite en revanche une formation supplémentaire de CaCO_3 : des ions hydrogénocarbonatés (HCO_3^-) se dissocient en ion carbonate (CO_3^{--}) et hydrogène (H^+), et chaque ion carbonaté s'associe à un ion calcium pour former un précipité de carbonate de calcium. Par conséquent, l'alcalinité de l'exosquelette favorise la précipitation de carbonate de calcium (figure 16).

Un système de transport amène les ions nécessaires à la formation de la nouvelle carapace. Un mécanisme de pompe déverse des ions hydrogène de la cuticule dans l'eau de mer. La diminution du nombre d'ions hydrogène entraîne une augmentation du pH de l'exosquelette et permet au carbonate de s'y déposer. Des mécanismes de transport spécifiques aux ions Ca^{++} et HCO_3^- permettent leur apport à partir du corps de l'animal ou de l'eau de mer.

3.3.4.2 Mise en réserve du calcium et mobilisation:

Au moment où les couches internes de l'ancienne cuticule sont digérées et réabsorbées, le calcium récupéré sous forme de phosphate et de carbonate de calcium, sera mis en réserve dans des organes tels que l'hépatopancréas, les muscles, et dans l'hémolymphe (GFRAF, 1978). Certaines structures jouent aussi un rôle dans la mise en réserve du calcium. C'est le cas des gastrolithes qui sont des structures calcifiées situées entre autre dans la paroi antérieure de l'estomac. Durant la prémue et l'intermue, un repli épithélial forme deux régions de l'estomac, appelées disques gastrolithiques, où sont stockés les gastrolithes. A la mue, ceux-ci sont relâchés dans le tube digestif où ils sont hydrolysés ; le calcium est récupéré pour la calcification de la nouvelle cuticule. Un apport de calcium peut être fourni via l'absorption d'eau environnante.

3.3.5 Les lipides

Peu d'études ont été effectuées sur les lipides cuticulaires, et la plupart se sont portées sur le cholestérol. Une des fonctions de ces lipides est de rendre la cuticule imperméable (DURSELL, 1955). Les lipides peuvent aussi intervenir dans la composition même de la cuticule et il a été suggéré qu'ils peuvent la rendre plus résistante à une dégradation chimique. Ainsi, chez la blatte, les lipides imprégnant la couche externe confèrent une résistance plus grande à l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique concentré (DENNELL et MALEK, 1956).

3.3.6 La cuticule comme réservoir de nourriture

La présence de chitinase et de protéases tout au long du cycle de mue rend possible le turn-over de cuticule. Durant les périodes de mise en réserve de nourriture, la cuticule peut devenir beaucoup plus épaisse, laissant entendre qu'elle est utilisée comme réserve métabolique (FOSTER et WEBER, 1960 ; LOCKE, 1964). Chez l'écrevisse, la plupart des constituants de la cuticule atteignent un pic de concentration en automne et chutent durant l'hiver quand l'animal se nourrit moins (SPECK, 1972).

Plusieurs études ont été faites sur le sort des molécules issues de la digestion de l'ancienne cuticule. SPECK et URICH (1971), ont travaillé sur les lipides, les sucres, les protéines et les acides aminés : d'après leurs résultats, il semble qu'en 48 heures, tous ces constituants sont recyclés pour la synthèse de la nouvelle cuticule.

3.4 Description du mésenchyme sous-épidermique

3.4.1 Aspect général

Le mésenchyme sous-épidermique est en fait un réseau de fibres conjonctives lâche, formant un très grand nombre de lacunes dans lesquelles circule l'hémolymphe. Ce type de conjonctif est le plus courant chez les crustacés. Il contient beaucoup de fibroblastes. Des fibres collagènes, réticulées, (peu abondantes) et élastiques forment de fins faisceaux entrelacés. La substance fondamentale est surtout représentée par l'acide hyaluronique. Ce tissu peut être largement infiltré par des éléments cellulaires extrinsèques.

3.4.2 Description du tissu conjonctif lâche

3.4.2.1 Éléments cellulaires intrinsèques principaux :

Les cellules mésenchymateuses indifférenciées proviennent du mésoblaste embryonnaire. Leur aspect est comparable à celui du fibroblaste : ce sont de petites cellules allongées à noyau ovoïde qui présentent des prolongements grêles. En microscopie optique, elles ne peuvent être distinguées des fibroblastes. Dans l'organisme adulte, elles sont relativement peu nombreuses et généralement localisées près des espaces contenant l'hémolymphe. Ces cellules donnent naissance aux fibroblastes et aux adipocytes.

Les fibroblastes sont les cellules les plus abondantes du tissu conjonctif. Ce sont des cellules fusiformes ou étoilées. Elles présentent de longs prolongement effilés. Dans leur noyau ovoïde, la chromatine est éparse. L'aspect du cytoplasme dépend de son état fonctionnel : au repos, les cellules sont acidophiles ; en phase d'activité, elles sont basophiles. Cette phase est caractérisée par la dilatation du réticulum endoplasmique rugueux et de l'appareil de Golgi, ainsi que par l'augmentation du nombre de granules de sécrétion. Les autres organites cellulaires ne paraissent pas modifiés.

3.4.2.2 Substance fondamentale :

Elle est produite par les fibroblastes. C'est une substance homogène visqueuse optiquement transparente. Elle contient de l'eau, des sels, différents peptides de masse moléculaire faible et des protéines en faible concentration.

Ses principaux composants sont des glucosaminoglycans (mucopolysaccharides acides) et des glycoprotéines. Les glucosaminoglycans sont des polyanions acides, riches en radicaux carboxyles et sulfates. Les principaux glycosaminoglycans sont l'acide hyaluronique et les chondroïtines sulfates. Parmi les glycoprotéines, l'acide sialique est le plus représenté.

3.4.2.3. Eléments cellulaires extrinsèques :

Les éléments extrinsèques retrouvés dans ce tissu sont les hémocytes capables de quitter la réserve circulatoire. Ils sont décrits au chapitre 2.2.3.

3.4.3 Glandes tégumentaires du mésenchyme

Diverses glandes sont dispersées sous l'épiderme des crustacés. L'activité cellulaire de ces glandes a été souvent corrélée avec le cycle de mue.

Les glandes dermiques des insectes secrètent le ciment de l'épicuticule et RIEDER (1977) suggère une fonction analogue chez les crustacés. Leur distribution chez les crustacés est cependant trop peu abondante pour qu'elles puissent jouer un rôle dans la formation de l'épicuticule qui est d'ailleurs sécrétée par l'épiderme comme le montrent les études en microscopie électronique de NEVILLE (1975).

Certaines glandes contiennent des phénoloxydases (STEVENSON, 1961 ; STEVENSON et SCHNEIDER, 1962), d'autres contiennent des phénols (PATANE, 1959). Le produit de ces glandes est véhiculé dans la cuticule. Elles peuvent aussi sécréter un ciment pour

agglomérer les oeufs pondus (JONGE, 1938), pour attacher, par exemple, les balannes à leur substrat. D'autres glandes tégumentaires secrètent des mucopolysaccharides (SHYAMASUDARI et HAMUWANTHA RAO, 1978).

3.4.4 Les réserves d'inclusions

L'observation de ces réserves est malaisée car la plupart des méthodes de fixations ne préservent pas le contenu cytoplasmique des cellules de ce tissu. Ces réserves sont incluses dans des cellules dont l'origine est fort discutée. Elles présentent un aspect rond à oval, parfois plus irrégulier, avec un diamètre pouvant aller jusqu'à 45 micromètres. Le nombre fluctue à l'approche de la mue, lors de la prise de nourriture ou lors de la ponte.

Ces réserves sont faites de glycoprotéines (hémocyanine,...) et peut-être des lipo- et mucoprotéines, mais pas de lipides neutres. Elles contiennent aussi du calcium, du fer et du glycogène.

Les cellules montrant ces réserves d'inclusions pourraient provenir d'hémocytes, mais cela reste discuté et leur origine n'a pas encore été définitivement élucidée. On observe un cycle dans l'abondance de ces réserves, en relation avec les étapes de la mue.

- . au stade A : certaines cellules (pas toutes) ont des inclusions cytoplasmiques visibles.
- . au stade B : en B₁, la plupart des cellules montrent de multiples inclusions, dont certaines sont P.A.S. positives
en E₂, de plus en plus d'inclusions deviennent P.A.S. positives, et certaines fusionnent entre elles.

- . au stade C : l'augmentation de volume des inclusions continue. Eventuellement, il peut y avoir une seule grosse inclusion refoulant le noyau latéralement. Elle alors entourée d'une mince couche cytoplasmique.
- . au stade D : les inclusions sont déversées dans l'espace hémal ou lysées in situ. Il semble que chez Carcinus moenas la cellule soit entièrement lysée (GHINELLE et MAGALDI, 1977).

Ces études semblent donc montrer que des réserves situées sous l'épiderme disparaissent au stade D et lors de l'exuviation, et réapparaissent en postmue et en intermue. Cela confirme l'idée déjà suggérée à la suite de certains travaux, d'une utilisation de ces réserves lors de la digestion de l'ancienne cuticule et lors de la formation des nouvelles couches (MEENAKSHI, 1960 ; PALHIC et STEVENSON, 1978 ; SKINNER, 1962).

o

o c

CHAPITRE II - LES GLUCIDES DU TEGUMENT

Première partie :

Les cycles

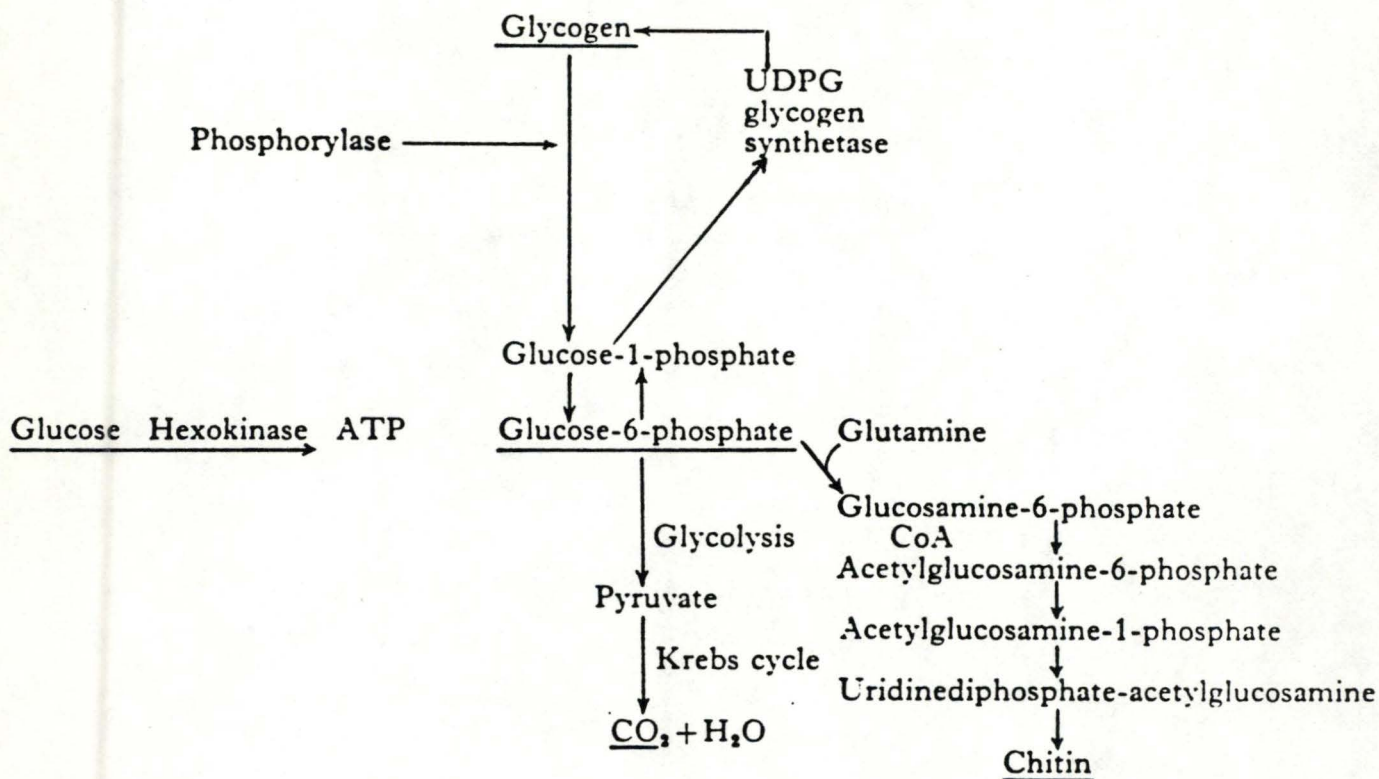
Deuxième partie :

Résultats

PREMIERE PARTIE : LES CYCLES

1. Synthèse et ~~dégradation~~ de la chitine

2. Synthèse et dégradation du glycogène
 - 2.1 Le glycogène
 - 2.2 Enzymes clefs du métabolisme du glycogène
 - a) la glycogène-synthase
 - b) la glycogène-phosphorylase
 - c) les enzymes interconcertants
 - 2.3 Conclusion sur la régulation du métabolisme du glycogène



Probable pathways of glucose metabolism in crustaceans. ATP = adenosine-triphosphate; CoA = Coenzyme A; UTP = uridinetriphosphate; UDPG = Uridine-diphosphoglucose. Underlined substances are labeled after administration of ^{14}C labeled glucose.

Schéma 2 (MEENAKSHI and SCHEER, 1960)

PREMIERE PARTIE : LES CYCLES

Les cycles de la synthèse et la dégradation qui nous intéressent sont ceux de la chitine et du glycogène. Le schéma (2) montre qu'ils sont en relation l'un avec l'autre par l'intermédiaire du glucose 6-phosphate (G 6-P).

1. Synthèse et dégradation de la chitine

Les étapes de la synthèse de la chitine sont présentées dans le paragraphe 3.3.2.2. Le glucose, la glucosamine et l'acétylglucosamine y apparaissent comme trois précurseurs possibles de la chitine. Chacun est préférentiellement utilisé dans des circonstances particulières :

- pendant la prémue, lors de la résorption de l'ancienne cuticule, il y a une réutilisation de l'acétylglucosamine issue de la digestion de la chitine. C'est pendant ce temps qu'elle devient le précurseur principal, comme le suggère une étude qui a été réalisée sur Orconectes sanborni par PHALIC et STEVENSON (1978). Ceux-ci nous montrent qu'il y a une variation de la quantité d'hexosamine au niveau de l'épiderme au cours d'un cycle de mue (figure 18).
- après la mue, quand la source cuticulaire d'acétylglucosamine a disparu, le glucose prend le relais comme précurseur principal. MEENAKSHI et SCHEER (1961) ont, en effet, remarqué que sa vitesse d'incorporation dans la chitine augmente pour les stades A et B (figure 19).

En ce qui concerne la glucosamine, PHALIC et STEVENSON (1978) ont réalisé des dosages enzymatiques qui suggèrent une variation dans la quantité de glucosamine dans l'épiderme au cours du cycle de mue.

Molt stage	Number of animals	¹⁴ C-acetyl hexosamines (ug/mg tissue)
Epidermis		
D ₀	7	1.9
D ₃	12	6.9
B	12	0.7
Midgut gland		
D ₀	7	5.2
D ₃	12	11.1
B	10	0.6

Figure 18 (PAHLIC and STEVENSON, 1978)

Variation de la concentration de N-acetyl hexosamine à différents moments de la mue.

RADIOACTIVITY IN CHITIN AFTER INJECTION OF ¹⁴C GLUCOSE INTO *Hemigrapsus nudus*

Stage	Time after injection (hr)	Specific activity of chitin (c.p.m./mg)	% of total injected radio activity recovered in chitin
A	24	21	7.8
A	48	27.5	14.83
B ₁	48	19.2	15.28
B ₂	48	14	10.72
C ₁	48	1.5	0.71
C ₂	48	—	—
C ₃	48	—	—
C ₄	48	—	—
D ₁	48	—	—
D ₂	48	—	—
D ₃	24	—	Trace
D ₄	24	—	4.3

Figure 19 (MEENAKSHI and SCHEER, 1961)

Variation de l'incorporation du glucose dans la chitine à différents moment de la mue

2. Synthèse et dégradation du glycogène

2.1 Le glycogène

Principal polysaccharide de réserve des cellules animales, il peut se présenter sous forme de granules de diamètre variable que l'on appelle particules α . Celles-ci sont constituées de sous-unités plus petites et de diamètre identique ; les particules β . Dans certains tissus, on trouve le glycogène sous forme de particules α (le foie, le cerveau,...) ; dans d'autres, comme le muscle, on ne le trouve que sous la forme de particules β . Le poids moléculaire du glycogène varie en fonction du nombre d'unités dont il se compose (de $5 \cdot 10^6$ à plusieurs centaines de millions). Comme le montre la figure 20, le glycogène est un polymère composé d'unités glucosyles unies entre elles par des liaisons α - 1,4 - glucosidiques, ce qui forme des chaînes linéaires. Ces chaînes peuvent se greffer les unes aux autres par des liaisons α - 1,6 - glucosidiques, ce qui confère à la molécule une structure arborescente.

2.2 Enzymes clefs du métabolisme du glycogène

La synthèse et la dégradation du glycogène sont le résultat de l'action de différents enzymes. Parmi eux, la glycogène-synthase contrôlant la synthèse du glycogène et la glycogène phosphorylase dont l'activité contrôle sa dégradation, ont retenu notre attention. La glycogène-synthase catalyse le transfert du glycosyle de l'UDPG sur les extrémités réductrices du glycogène :

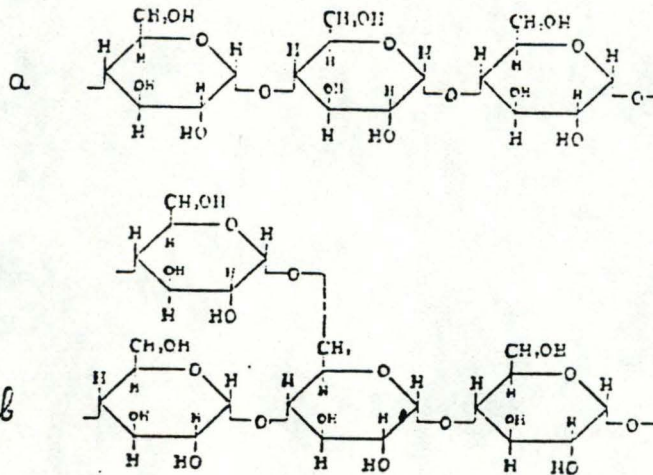
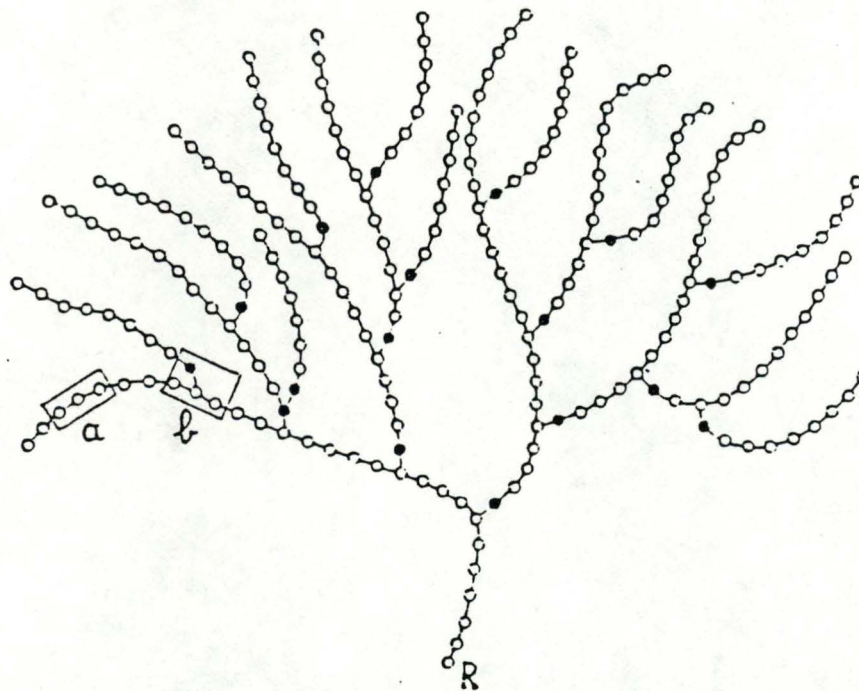
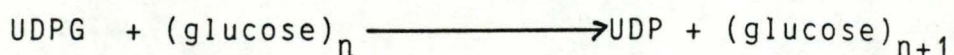
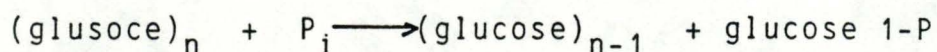


Figure 20

Structure du glycogène (schéma selon Cori, 1953). Les unités glucosyles rattachées par des liaisons α -1,4-glycosidiques sont représentées par les cercles clairs; les unités glucosyles rattachées par une liaison α -1,6-glycosidique sont représentées par les cercles noirs. R représente l'extrémité réductrice du glycogène. La structure des fragments a et b est donnée plus en détail.



Le glycogène-phosphorylase catalyse la phosphorylase des extrémités non réductrices du glycogène :



Nous décrivons les principales caractéristiques de la glycogène-synthase, de la glycogène-phosphorylase ainsi que des enzymes responsables de leur interconversion, soit les phosphorylase-phosphatase, synthase-phosphatase, phosphorylase-kinase et protéines - kinases.

a) La glycogène-synthase

Elle peut se trouver sous deux formes interconvertibles. Cette interconversion dépend d'un processus de phosphorylation et de déphosphorylation. La phosphorylation est catalysée par une synthase-kinase qui requiert de l'ATP et du Mg . L'enzyme phosphorylée est alors quasiment inactive in vivo. On sait cependant la stimuler in vitro en présence de G 6-P (DE WULF et HERS, 1968). Cette forme inactive fut appelée forme D en raison de sa dépendance vis-à-vis de l'hexose P. La forme déphosphorylée est, elle, active indépendamment du G 6-P, d'où le nom de forme I. Par la suite, suite à l'observation que le régulateur in vivo n'était pas le G 6-P et que la concentration de phosphate inorganique existant in vivo (P_i) inhibe complètement son effet stimulateur, la forme active fut appelée synthase a et la forme inactive synthase b.

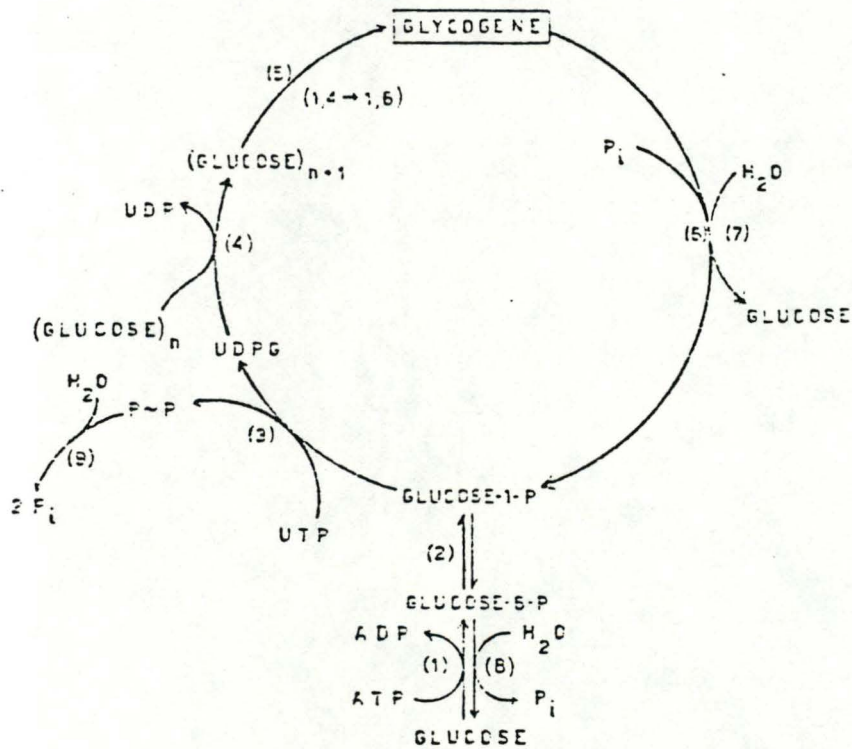


Figure 21

- Voies métaboliques de la synthèse et de la dégradation du glycogène.

- (1) glucokinase ou hexokinase
- (2) phosphoglucmutase
- (3) UDPG-pyrophosphorylase
- (4) glycogène-synthase
- (5) enzyme ramifiante
- (6) glycogène-phosphorylase
- (7) amylo-1,6-glucosidase
- (8) glucose-6-phosphatase
- (9) pyrophosphatase inorganique

Le P_i est un ion qui semble stimuler la forme a et être sans effet sur la forme b. Chez les vertébrés, sa présence, en plus d'annuler la stimulation de la synthase b par le G 6-P, permet de lever l'inhibition qu'exerce l'ATP sur la forme active (DE WULF et HERS, 1968).

Le M_g^{++} semble avoir le même effet que le G 6-P, ce qui expliquerait que l'ATP- M_g est moins inhibiteur que l'ATP (DE WULF et HERS, 1968).

Le sulfate a un effet comparable à celui du P_i (DE WULF et HERS, 1968). Ceci est intéressant pour le dosage de l'enzyme. En effet, la forme active peut se mesurer spécifiquement en présence de P_i . Mais celui-ci est susceptible aussi de favoriser la phosphorolyse du glycogène, ce qui risque d'entraîner une sous-estimation de l'activité de synthase. On utilise dès lors préférentiellement du sulfate plutôt que du P_i .

b) La_glycogène-phosphorylase

Tout comme la synthase, la glycogène-phosphorylase existe sous deux formes convertibles : la forme a (active) et la forme b (inactive). La forme inactive est cette fois déphosphorylée. Cette déphosphorylation est catalysée par la phosphorylase-phosphatase. L'activation de la forme b est catalysée, elle, par une phosphorylase-kinase, en présence d'ATP et de M_g^{++} (WIENS, STALMANS, 1970).

In vitro, en présence d'un excès de G 1-P par rapport au P_i , la phosphorylase peut catalyser la synthèse du glycogène. In vivo, étant donné l'important excès de P_i par rapport au G 1-P, existant dans la cellule, elle opère exclusivement dans le sens dégradatif.

In vitro, le glucose a pour effet de diminuer l'affinité de la phosphorylase a pour le G 1-P, ce qui a pour conséquence une réduction de son activité (STALMANS, 1970). Le 5' AMP a l'effet contraire : il stimule donc l'activité de la forme a. (BUSBY, 1976). Une compétition entre le glucose et le 5' AMP pour l'enzyme a été montrée chez les vertébrés (STALMANS, 1970). La caféine et la théophylline ont le même effet que le glucose ; cet effet est également contrecarré par le 5' AMP (STALMANS, 1970; BUSBY et RADDI, 1978).

Des études cristallographiques réalisées par BUSBY et RADDI (1976) puis par DOMBARDI (1980) indiquent la présence de trois sites importants : le "site actif" auquel se lie le substrat (G-1P) ou ses inhibiteurs (glucose ou G 6-P), le "site nucléotidique" auquel se fixe le 5' AMP et le "site nucléosidique" auquel se lient des inhibiteurs tels que la caféine et la théophylline.

Chez les vertébrés, la phosphorylase b est stimulée en présence de 5' AMP ou d'anions tels que des sulfates et des fluorures. Elle est par contre inhibée par la caféine.

Ces propriétés nous permettent de mesurer spécifiquement la forme active en présence de caféine, et la forme totale (a + b) en présence de 5' AMP et d'anions qui rendent active la forme b autant que la forme a.

c) Les enzymes interconvertants

c.1 La phosphorylase-phosphatase

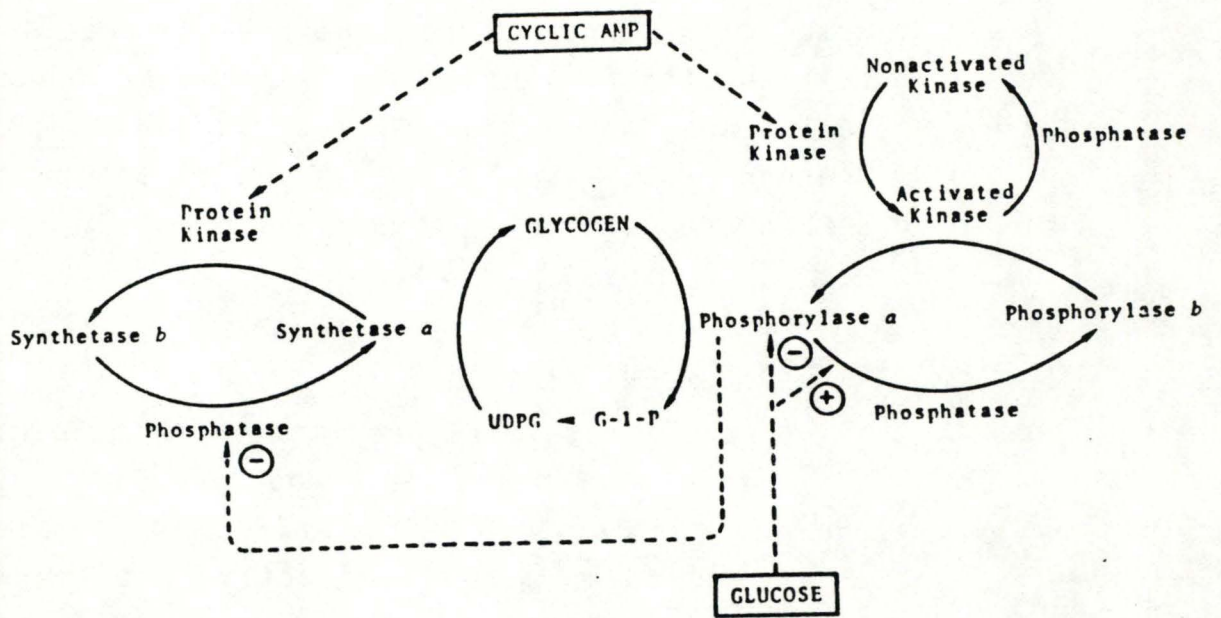
Chez les vertébrés, elle est inhibée par le NaF, l'AMP et l'IMP et est stimulée par le glucose et la caféine (STALMANS, 1975). Le glucose et le 5' AMP se lient à la phosphorylase a ce qui a pour conséquence d'en faire respectivement un meilleur et un moins bon substrat pour la phosphorylase-phosphatase (STALMANS, 1975). En fait le 5' AMP, le glucose ainsi que la caféine agissant sur la conformation de la phosphorylase a, rendent le groupement phosphate plus ou moins accessible à la phosphorylase-phosphatase.

c.2 La synthèse-phosphatase

Les résultats obtenus par DE WULF et HERS (1968) sur les vertébrés ont permis de postuler l'existence d'une synthase-phosphatase catalysant l'activation de la synthase b. Une caractéristique importante est son inhibition par la phosphorylase a (STALMANS, 1971). La phosphorylase b n'est quant à elle que faiblement inhibitrice.

c.2 La phosphorylase-kinase

Celle-ci catalyse l'activation de la phosphorylase b (forme déphosphorylée) en forme a (forme phosphorylée). Cet enzyme est également interconvertible : sa forme active est le résultat d'une phosphorylation par une protéine-kinase dépendant de l'AMP cyclique (AMPc), et sa forme inactive résulte d'une déphosphorylation par une phosphatase.



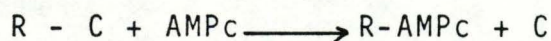
The control of glycogen metabolism

Figure 23 (Pahlic et Ross-Stevenson, 1978)

L'ion Ca^{++} peut activer la phosphorylase-kinase (BUSBY, 1976) ; l'EDTA, qui complexe ce Ca^{++} , empêche cette activation (MAMMIT, 1976).

2.4 Les protéines-kinases

Chez les vertébrés, les protéines-kinases qui phosphorylent la phosphorylase-kinase agissent aussi sur la synthase. Une caractéristique importante de cet enzyme est sa dépendance vis-à-vis de l'AMPc. En effet, elles sont composées de deux sous-unités : l'une, appelée C, est la composante catalytique, et l'autre, appelée R, est l'unité régulatrice. Quand ces deux sous-unités sont associées, la protéine-kinase est inactive. L'AMPc a pour effet de libérer l'unité C en se liant à l'unité R. Dès lors, l'unité C pourra manifester son activité.



2.3 Conclusion sur la régulation du métabolisme du glucose

L'activité de la phosphorylase et de la synthase sont le résultat d'un équilibre entre les phosphatases et les kinases. La glycogénolyse et la glycogénosynthèse ne se font pas en même temps car il y a, d'une part, l'existence de protéines kinases qui entraînent simultanément l'inactivation de la synthase et l'activation de la phosphorylase, et, d'autre part, une inhibition de la synthase-phosphatase par la phosphorylase a empêchant la synthase de s'activer tant qu'il reste suffisamment de phosphorylase active.

o

o o

II

DEUXIEME PARTIE : RESULTATS

- 2.1 Remarque préliminaire
- 2.2 Les métabolites
- 2.3 Les enzymes

DEUXIEME PARTIE : RESULTATS

2.1 Remarque préliminaire

Le Carcinus maenas ne commence généralement à muer qu'à la fin du printemps. Etant donné que notre période de travail n'allait que de l'automne au début de l'été, nous avons induit artificiellement la mue en hiver. Cela nous a permis d'avoir des crabes au stade de prémue (D), stade naturellement peu fréquent à cette période.

Les traitements effectués en automne ont été repris à la fin du printemps, ce qui permettait d'observer un effet éventuel de la saison. A la même époque, nous avons collecté des crabes à différents stade de mue dans leur milieu naturel. Cela nous a permis de comparer les conditions artificielles aux conditions naturelles.

a. Effet de la saison

Nous avons comparé nos résultats pour des crabes qui avaient été soumis aux mêmes conditions en hiver et en été. En comparant les moyennes en ce qui concerne le glucose, le glycogène, la synthase, la phosphorylase et les protéines (ANOVA₁), nous avons essayé de voir s'il y avait, ou non, une différence significative entre la quantité moyenne d'un métabolite dans un lot, et celle, de celui-ci, dans l'autre lot. Une différence significative indiquerait un effet saison, ce qui nous empêcherait de rassembler les résultats obtenus au cours des deux saisons. Dans le cas contraire, il n'y aurait pas de preuves de l'existence d'un effet saison, ce qui permettrait de traiter ensemble les résultats.

b) Effet du traitement

Une étude comparable à celle décrite ci-dessus a été appliquée pour les traitements. La comparaison a été faite entre les individus arrivés naturellement à un stade et ceux qui y sont arrivés après traitement. Si les moyennes pour un même métabolite sont significativement différentes, c'est que le traitement provoque des variations que ne subissent pas les individus non traités. Dans ce cas, nous ne pourrions pas rassembler les résultats des lots comparés. Dans le cas contraire, où un effet traitement n'a pas été décelé, il nous est permis de rassembler les crabes arrivés au même stade, quelle que soit la manière dont ils y sont parvenus.

Stade A

La moyenne représentée a été calculée à partir d'individus ayant atteint ce stade; ils ont été capturés en été et n'ont subi aucun traitement.

Stade B

Il en va de même pour la moyenne m_2 , sinon qu'elle représente des crabes ayant atteint le stade B.

Stade C

Deux moyennes sont représentées pour ce stade: m_1 et m_2 , en effet, comme nous le voyons au tableau: nous avons obtenu des résultats différents en été et en hiver.

D'autre part, ces moyennes rassemblent les résultats obtenus pour des crabes ayant atteint ce stade naturellement ou après traitement; le tableau 4 nous montre que la façon dont le stade a été obtenu n'a aucune influence.

Stade D

De même, en raison de "l'effet saison", deux moyennes sont présentées: m_3 et m_4 .

Chacune d'elle représente des crabes ayant atteint ce stade après différents traitements (tableau 5).

2.2 Les métabolites2.2.1 Le glucose

Variation de la concentration de glucose suivant le stade de mue
--

Tableau 1

	A	B	C	D
été mgr par gr de tissu	$m_1 =$ 0,92 _± 0,21 (n = 7)	$m_2 =$ 0,80 _± 0,14 (n = 5)	$m_3 =$ 0,84 _± 0,24 (n = 19)	$m_4 =$ 1,18 _± 0,34 (n = 4)
hiver mgr par gr de tissu			$m_5 =$ 3,60 _± 1,40 (n = 8)	$m_6 =$ 6,08 _± 2,76 (n = 12)

ETE $F_{obs} = 0,44$; D.R. = 31 ; D.F = 3
 $P(F < F_{obs}) = 0,270$

HIVER $F_{obs} = 4,65$; D.R. = 18 ; D.F = 1
 $P(F < F_{obs}) = 0,957$

En été, il n'y a pas de différence significative entre les moyennes obtenues pour chaque stade, bien qu'une tendance à l'augmentation apparaisse au stade D.

Cette augmentation se marque davantage en hiver.

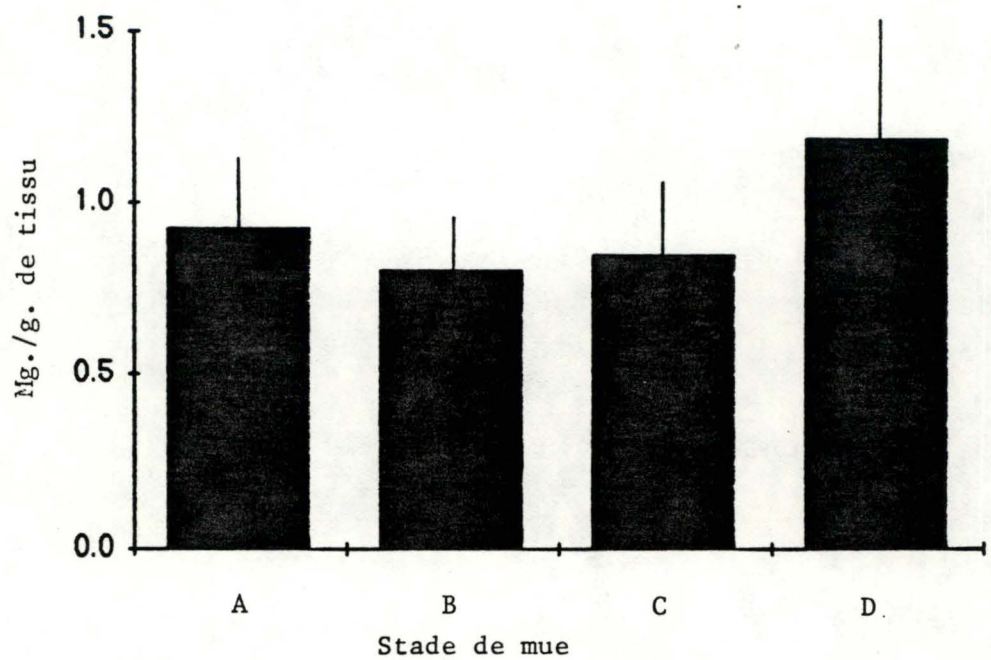


Figure 24

Variation en été et suivant le stade de mue de la concentration du glucose dans l'épiderme et le tissu conjonctif sous-épidermique du crabe *Carcinus maenas*. Chaque colonne représente une moyenne affectée de son écart-type.

Comparaison entre la concentration de glucose observée en été et en hiver

a) Crabes en intermue (C.)

Tableau 2

	moyenne \pm l'écart type en mgr de glucose par gr de tissu
été	$m_1 = 0,84 \pm 0,24$ (n = 19)
hiver	$m_2 = 3,55 \pm 1,40$ (n = 8)

Fobs = 70,8

DF = 1

DR = 25

P (F < Fobs) = 0,999

Les moyennes m_1 et m_2 sont significativement différentes. En affirmant cela, le risque de se tromper est de 0,1 %. Nous avons dès lors décidé de traiter les résultats séparément.

b) Crabes en prémue (D.)

Tableau 3

	moyenne \pm écart type en mgr de glucose par gr de tissu
été	$m_1 = 1,17 \pm 0,33$ (n = 4)
hiver	$m_2 = 6,08 \pm 2,76$ (n = 12)

Fobs = 62

DF = 1

DR = 14

P (F < Fobs) = 0,999

m_1 est différent de m_2 (erreur possible de 0,1 %) ; nous traiterons donc séparément les résultats été-hiver.

Légende :

- C.P. + F = Courte photopériode et maintenance à 15 ° C
- L.P. = Longue photopériode
- L.P. + ECD = Longue photopériode + injection de
 β -ecdysone (100 μ gr)
- E.C.D. = injection de β -ecdysone (100 μ gr)
- E.C.D. + E.P. = injection de β -ecdysone (100 gr) +
épédonculation
- E.P. = épédonculation
- Contrôle = individus non traités

Variation de la concentration de glucose pour un stade donné
suite à l'application du traitement

a) Crabes en intermue (C)

Tableau 4

	∴ C.P.+F. ∴	∴ L.P. ∴	∴ L.P.+ECD ∴	∴ ECD ∴	∴ ECD-EP ∴	∴ EP ∴	∴ contrôle ∴
été	$m_1 =$		$m_2 =$		$m_3 =$	$m_4 =$	$m_5 =$
mgr/	0,94±0,23		0,94±0,22		0,60±0,16	0,80±0,35	0,75±0,19
gr	(n = 7)		(n = 4)		(n = 2)	(n = 4)	(n = 5)
tissu							
hiver		$m_6 =$					$m_7 =$
mgr/		3,77±1,18					3,24±1,39
gr		(n = 3)					(n = 5)
tissu							

ETE Fobs = 0,735 ; D.F. = 3 ; D.R. = 18
P (F<Fobs) = 0,453

HIVER Fobs = 0,20 ; D.F. = 1 ; D.R. = 18
P (F<Fobs) = 0,394

Ni en hiver, ni en été, on ne voit pas de différences significatives entre d'une part m_1 , m_2 , m_3 , m_4 et m_5 , et d'autre part m_6 et m_7 .

Nous estimons dès lors pouvoir rassembler les résultats des crabes se trouvant au même stade.

b) Crabes en prémue (D)

Tableau 5

	∴ C.P.+F. ∴	∴ L.P. ∴	∴ L.P.+ECD ∴	∴ ECD ∴	∴ ECD+EP ∴	∴ E.P. ∴	∴ contrôle ∴
été				$m_1 =$		$m_2 =$	
mgr/				1,44±0,48		1,01±0,36	
gr				(n = 2)		(n = 3)	
tissu							
hiver			$m_3 =$			$m_4 =$	
mgr/			5,16±1,44			6,0±1,56	
gr			(n = 6)			(n = 6)	
tissu							

ETE Fobs = 0,30 ; D.F. = 1 ; D.R. = 7
P (F<Fobs) = 0,394

HIVER Fobs = 0,5 ; D.F. = 1 ; D.R. = 12
P (F<Fobs) = 0,377

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence entre m_1 et m_2 ainsi qu'entre m_3 et m_4 . Nous rassemblerons dès lors les résultats respectivement pour l'été et l'hiver.

L'analyse des résultats concernant la concentration de glucose contenue dans l'épiderme et le tissu sous-épidermique montre qu'il y a une différence saisonnière. L'augmentation de cette quantité à l'approche de la mue se marque davantage en hiver. Par ailleurs, la manière dont un stade a été obtenu est sans influence apparente sur la quantité mesurée à ce stade. D'après PAHLIC et STEVENSON (1977) ainsi que JOHNSON et al (1972), le glucose représente un substrat nécessaire à l'élaboration de la chitine. Meenakshi et Scheer (1968), avaient montré précédemment que le glucose y était incorporé durant les stades A et B (Figure 19), ce qui explique que la quantité de ce dernier diminue alors dans l'épiderme et le tissu conjonctif sous-épidermique. La quantité plus élevée observée au stade D se justifie en tant que substrat pour l'élaboration de la nouvelle cuticule et comme matériel susceptible de fournir de l'énergie pour la digestion de l'ancienne cuticule.

L'augmentation plus prononcée en hiver n'est pas suivie d'une augmentation de la quantité de glycogène. Il semble donc que ce surplus de glucose ne soit pas mis en réserve, en tout cas sous cette forme. Contrairement à ce qui se passe pour l'épiderme et le tissu sous-épidermique, les résultats obtenus par LORET (1982) montrent une augmentation de la glycémie en été et non en hiver. Ils expliquent qu'en fait le crabe est plus actif ce qui entraîne une demande plus grande d'énergie. Nous nous attendions à obtenir des résultats semblables pour l'épiderme et le tissu sous-épidermique. La source du surplus de glucose tissulaire en hiver n'est pas nécessairement l'hémolymphe comme on serait tenté de le croire à priori. Elle pourrait être la carapace comme le suggèrent FOSTER et WEBER (1960) ainsi que SPECK (1972) qui ont observé que celle-ci devient plus mince en hiver. Ils ont émis l'hypothèse selon laquelle elle servirait de réserve de nourriture pendant les périodes de disette. L'injection de glucose marqué dans l'hémolymphe de crabes en hiver et en été permettrait de savoir si le surplus de glucose tissulaire observé en hiver provient de l'hémolymphe ou du tégument.

Stades A et B

Tout comme pour le glucose, chacune des moyennes représentée a été calculée à partir d'individus ayant atteint respectivement le stade A et le stade B. Ces individus pêchés en été n'ont subi aucun traitement particulier.

Stade C

La moyenne m_3 rassemble les individus en intermue qu'ils soient arrivés à ce stade avec ou sans traitement (tableau 9).

Cette moyenne rassemble aussi les résultats obtenus en été et en hiver car, dans notre cas, il n'y a pas d'"effet saison".

Stade D

La moyenne représente les résultats pour les crabes arrivés en prémue après traitement, en hiver et en été (tableaux 8 et 10)

2.2.2 Le glycogène

Variation de la concentration de glycogène suivant le stade de mue
--

Tableau 6

	A	B	C	D
été et	$m_1 =$	$m_2 =$	$m_3 =$	$m_4 =$
hiver	$21,2 \pm 7,8$	$14,7 \pm 5,11$	$21,0 \pm 14,7$	$27,0 \pm 15,9$
	$(n = 7)$	$(n = 5)$	$(n = 27)$	$(n = 16)$

$$F_{obs} = 7,57$$

$$D.F. = 3 \quad P(F < F_{OBS}) = 0,834$$

$$Q.R. = 51$$

Bien que la quantité de glycogène attendance à augmenter en prémue (D) et à diminuer à la fin de la postmue (B), la grande variabilité à l'intérieur de chacun des groupes ne permet pas d'observer une différence significative.

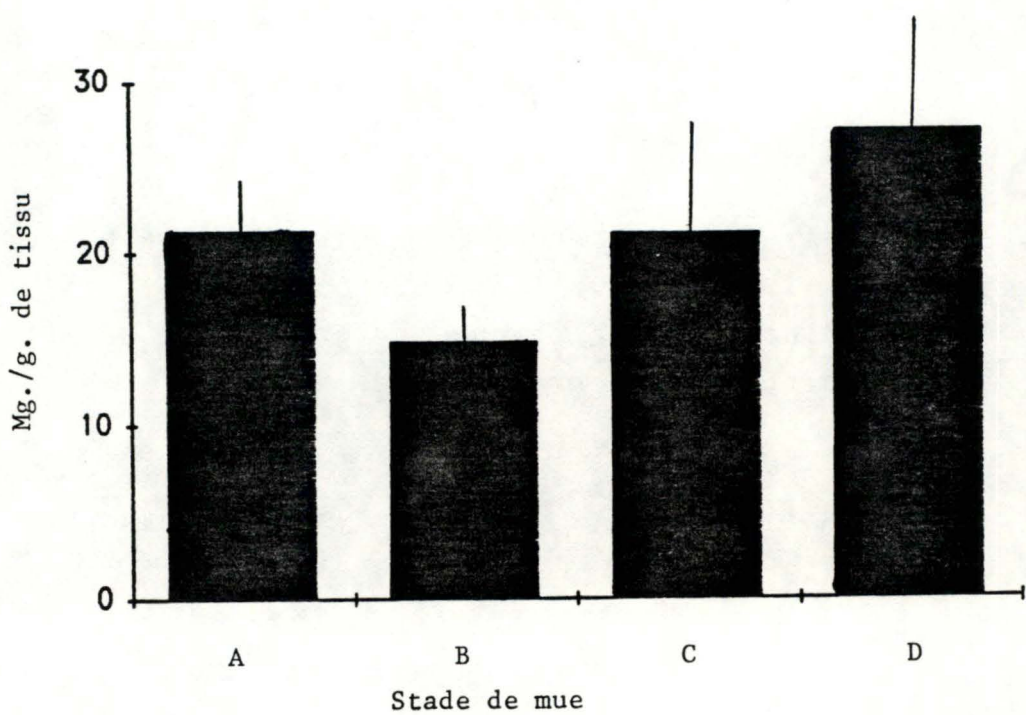


Figure 25

Variation en été et suivant le stade de mue de la concentration du glycogène dans l'épiderme et le tissu conjonctif sous-épidermique du crabe *Carcinus maenas*. Chaque colonne représente une moyenne affectée de son écart-type.

Comparaison entre la concentration de glycogène observée en été et en hiver

a) Crabes en intermue (C)

Tableau 7

	Moyenne \pm écart type en mgr de glycogène par gr de tissu
été	$m_1 = 19,71 \pm 13,74$ (n = 19)
hiver	$m_2 = 23,41 \pm 11,10$ (n = 8)

Fobs = 0,269

D.F. = 1

D.R. = 53

P(F < Fobs) = 0,387

b) Crabes en prémue (D)

Tableau 8

	Moyenne \pm écart type en mgr de glycogène par gr de tissu
été	$m_1 = 30,0 \pm 10,8$ (n = 4)
hiver	$m_2 = 23,0 \pm 11,7$ (n = 12)

Fobs = 0,953

D.F. = 1

D.R. = 13

P(F < Fobs) = 0,349

Les test effectués ne permettent donc pas de montrer de variation significative entre les quantités observées en hiver et en été, et ce, quel que soit le stade. Dès lors, nous avons pris la décision de rassembler, pour chaque stade, les résultats de l'été et de l'hiver.

Variations de la concentration de glycogène pour un stade donné suite à l'application des traitements

a) Crabes en intermue (C)

Tableau 9

	C.P. + F.	L.P.	L.P.+E.C.D.	E.C.D.	E.C.D.+E.P.	E.P.	contrôle
été mgr/ gr de tissu	$m_1 =$ 17,4+6,0 (n= 7)		$m_1 =$ 7,30+12,60 (n= 4)		$m_3 =$ 14,4+6,0 (n= 2)	$m_4 =$ 17,5+1,20 (n = 4)	$m_5 =$ 18,5+12,0 (n = 5)
hiver mgr/ gr de tissu		$m_6 =$ 36,0+26,7 (n = 3)					$m_7 =$ 22,5+12,0 (n = 5)

ETE Fobs = 18 ; D.F. = 3 ; D.R. = 9
P(F<Fobs) = 0,7832

HIVER Fobs = 2,71 ; D.F. = 1 ; D.R. = 8
P(F<Fobs) = 0,864

b) Crabes en prémue (D)

Tableau 10

	C.P.+ F.	L.P.	L.P.+E.C.D.	E.C.D.	E.C.D.+E.P.	E.P.	contrôle
été mgr/ gr de tissu				$m_1 =$ 11,1+6,0 (n= 2)		$m_2 =$ 7,5+1,5 (n = 2)	
hiver mgr/ gr de tissu			$m_3 =$ 16,1+4,5 (n = 6)			$m_4 =$ 17,1+3,6 (n = 6)	

ETE Fobs = 0,29 ; D.F. = 1 ; D.R. = 2
P(F<Fobs) = 0,359

HIVER Fobs = 0,472 ; D.F. = 1 ; D.R. = 4
P(F<Fobs) = 0,466

Dans aucun cas les moyennes observées ne sont significativement différentes ; dès lors, nous rassemblerons les résultats obtenus pour tous les crabes arrivés au même stade.

Stage	Epidermal cells			
	Size		Glycogen content	
	Height. μ	Width. μ		
Intermolt C ₄	4	10-17	+	
Premolt {	D ₀	4	10-17	+
	D ₁	10	10-17	+
	D ₂ (early)	30	10-17	++
	D ₂ (late)	100	10-17	+++
	D ₃	80	10-17	++
Postmolt {	D ₄	80	10-17	+
	A	20	10	+
	B	10	10	+

Tableau 11

Variation de la quantité de glycogène dans les cellules épidermiques au cours d'un cycle de mue (SKINNER, 1962)

On n'a pas pu montrer de différence saisonnière entre les quantités de glycogène; la manière dont les différents stades de mue sont obtenus n'a apparemment pas d'influence sur le polysaccharide. Bien que la variabilité des quantités observées au sein de chacun des stades masque d'éventuelles différences significatives entre chacun des stades, il apparaît pourtant une tendance à l'augmentation en prémue et à la diminution en postmue. SKINNER (1962) était déjà arrivé à des conclusions semblables par observation aux microscopes optique et électronique (tableau 11). Le glycogène constitue une réserve de glucose destiné à l'élaboration de la chitine et à la production d'énergie. Cela explique donc sa réduction aux stades A et B. Durant le stade C, le crabe qui était à jeûn pendant la mue recommence à se nourrir et accumule donc peu à peu du glycogène dont la quantité sera maximale au stade D.

Les réserves de glycogène accumulées pendant la bonne saison ne semblent pas diminuer en hiver. La crabe a en effet une activité moins grande durant cette période et n'entame dès lors que peu ses réserves.

Stade A

La moyenne présentée a été calculée à partir des individus ayant atteint ce stade; ils ont été capturés en été et n'ont subi aucun traitement particulier.

Stade B

Il en va de même pour la moyenne m_2 , sinon qu'elle représente les individus ayant atteint le stade B.

Stade C

Dans ce cas, deux moyennes ont été présentées: m_3 et m_5 . En effet, nous n'avons pas obtenu les mêmes résultats en été et en hiver (tableau 13).

La moyenne m_3 rassemble les individus traités et non traités: en effet, le tableau nous montre qu'en été la façon dont les crabes sont arrivés à ce stade n'a pas d'influence. Par contre en hiver, le traitement "longue photopériode" semble avoir une influence significative (tableau 15). Dès lors m_5 ne reprend que les individus non traités. Le résultat⁵ de ceux qui ont été soumis à la longue photopériode sera discuté ultérieurement.

Stade D

Suite à "l'effet saison", (tableau 14), nous présentons deux moyennes: m_4 et m_6 . De plus, chacune d'elle rassemble les individus traités⁶ et ceux qui ne l'ont pas été car il ne semble pas que le traitement ait influencé significativement le résultat (tableau 16).

Variation de la concentration de sucres réducteurs pour un stade donné suite à l'application des traitements

a) Crabes en intermue (C)

Tableau 15

	C.P. + F.	L.P.	L.P.+E.C.D.	E.C.D.	E.C.D.+E.P.	E.P.	contrôle
été $\frac{\text{mgr}}{\text{gr de tissu}}$	$m_1 =$ 13,7+9,3 (n = 7)		$m_2 =$ 7,4+3,4 (n = 4)		$m_3 =$ 5,9+3,4 (n = 2)	$m_4 =$ 9,3+4,4 (n = 4)	$m_5 =$ 6,4+1,9 (n = 5)
hiver $\frac{\text{mgr}}{\text{gr de tissu}}$		$m_6 =$ 76,4+46,0 (n = 3)					$m_1 =$ 17,6+14,7 (n = 5)

ETE Fobs = 1,26 ; D.F. = 4 ; D.R. = 8
P(F < Fobs) = 0,639

HIVER Fobs = 12,2 ; D.F. = 1 ; D.R. = 9
P(F < Fobs) = 0,993

En été, il n'apparaît pas de différence significative entre les différents traitements ; nous avons donc décidé de traiter les résultats ensemble. En hiver, une forte différence apparaît entre les individus arrivés naturellement et ceux arrivés artificiellement à ce stade. Les individus traités (longue photopériode) ne seront donc pas repris dans l'étude suivante qui concerne la variation de sucres réducteurs au cours du cycle de mue.

b) Crabes en prémue (D)

Tableau 16

	C.P.+F.	L.P.	L.P.+E.C.D.	E.C.D.	E.C.D.+E.P.	E.P.	contrôle
été $\frac{\text{mgr}}{\text{gr de tissu}}$				$m_1 =$ 48+39 (n = 2)		$m_2 =$ 51+39 (n = 2)	
hiver $\frac{\text{mgr}}{\text{gr de tissu}}$			$m_3 =$ 58+40 (n = 6)			$m_4 =$ 51 + 37 (n = 6)	

ETE Fobs = 0,803 ; D.F. = 1 ; A.R. = 4
P(F < Fobs) = 0,424

HIVER Fobs = 0,910 ; D.F. = 1 ; D.R. = 2
P(F < Fobs) = 0,44

Etant donné qu'il n'y a pas de différences significatives entre les individus qu'ils soient traités ou non, nous avons décidé pour chacun des lots (hiver et été) de rassembler les résultats obtenus.

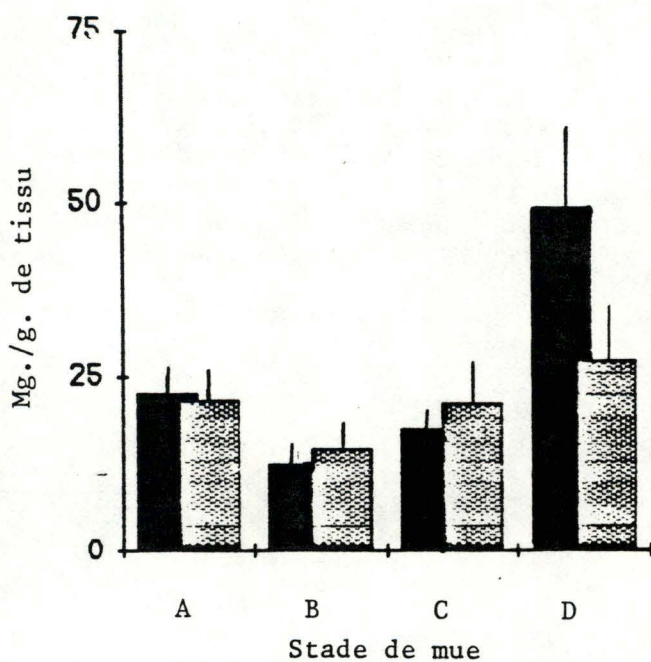


Figure 27

Variation en été et suivant le stade de mue de la concentration des sucres réducteurs ou composés d'unités réductrices (■) et des glycogène + glucose (▨) dans l'épiderme et le tissu conjonctif sous-épidermique du crabe *Carcinus maenas*. Chaque colonne représente une moyenne affectée de son écart-type.

Comparaison entre la concentration de sucres réducteurs observée en été et en hiver

a) Crabes en intermue (C)

Tableau 13

moyenne \pm écart type en mgr de sucres réducteurs par gr de tissu	
ETE	$m_1 = 17,6 \pm 6,4$ (n = 19)
HIVER	$m_2 = 33,3 \pm 15,7$ (n = 8)

$$F_{obs} = 22,4$$

$$d.F. = 1 \quad P(F < F_{obs}) = 0,99$$

$$D.R. = 18$$

Nous pouvons dire que m_1 est différent de m_2 , avec une erreur possible de 1 %. Nous avons alors pris la décision de traiter séparément les résultats obtenus en été et en hiver.

b) Crabes en prémue (D)

Tableau 14

moyenne \pm écart type en mgr de sucres réducteurs par gr de tissu	
ETE	$m_1 = 49,1 \pm 22,1$ (n = 43)
HIVER	$m_2 = 63,4 \pm 24,6$ (n = 12)

$$F_{obs} = 5,97$$

$$D.F. = 1 \quad P(F < F_{obs}) = 0,96$$

$$D.R. = 13$$

De nouveau, avec une erreur possible de 4 % nous pouvons dire qu'il y a une différence entre la quantité observée en été et en hiver. Nous traiterons séparément les résultats obtenus dans chacun des deux lots.

2.2.3 Les sucres réducteurs

Variation de la concentration de sucres réducteurs au cours du cycle de mue

Tableau 12

	A	B	C	D
été mgr par gr de tissu	$m_1 =$ 22,5 \pm 5,4 (n = 7)	$m_2 =$ 12,7 \pm 5,9 (n = 5)	$m_3 =$ 17,6 \pm 6,4 (n = 19)	$m_4 =$ 49,0 \pm 22,1 (n = 4)
hiver mgr par gr de tissu			$m_5 =$ 33,3 \pm 15,7 (n = 8)	$m_6 =$ 63 \pm 25 (n = 12)

ETE Fobs = 7,85 ; D.F. = 3 ; D.R. = 25

$P(F < F_{obs}) = 0,999$

Donc il y a au moins une moyenne significativement différente des autres. Nous allons les comparer deux à deux afin de voir où se situe la différence. Nous avons utilisé la méthode des contrastes de SHEFFE.

A/B : Fobs = 2,16

$P(F < F_{obs}) = 0,883$

B/C : Fobs = 0,27

$P(F < F_{obs}) = 0,152$

C/D : Fobs = 1,50

$P(F < F_{obs}) = 0,762$

D/A : Fobs = 5,53

$P(F < F_{obs}) = 0,995$

A/C : Fobs = 2,72

$P(F < F_{obs}) = 0,934$

B/D : Fobs = 0,83

$P(F < F_{obs}) = 0,498$

Une différence significative n'apparaît qu'entre les stades A et D, bien qu'il y ait aussi une tendance à une augmentation entre A et B, ainsi qu'entre A et C.

HIVER Fobs = 7,07 ; D.F. = 1 ; D.R. = 16

$P(F < F_{obs}) = 0,983$

Il semble y avoir une différence significative entre les stades D et B.

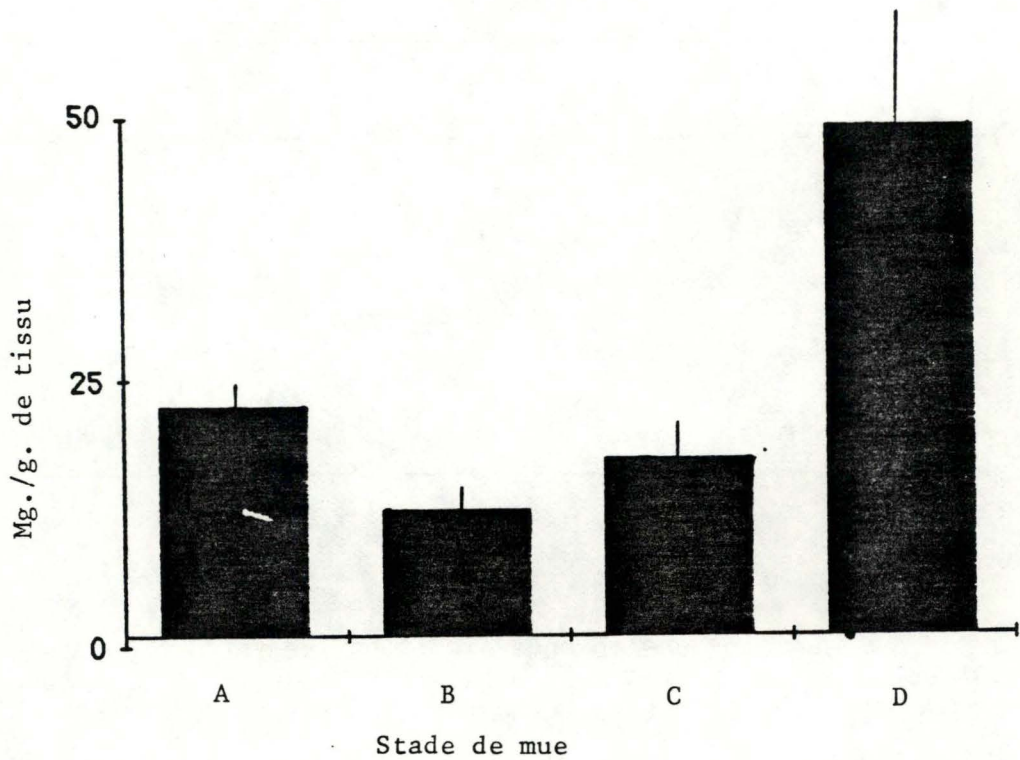


Figure 26

Variation en été et suivant le stade de mue de la concentration des sucres réducteurs ou composés d'unités réductrices dans l'épiderme et le tissu conjonctif sous-épidermique du crabe *Carcinus maenas*.

Chaque colonne représente une moyenne affectée de son écart-type.

La situation est semblable à celle observée pour le glucose, si ce n'est pour un cas particulier de l'effet traitement : la concentration en sucres réducteurs est significativement plus élevée pour le stade C de crabes soumis en hiver à une longue photopériode (tableau 15). Comme cela apparaît à la figure 27 , les sucres réducteurs sont constitués dans leur quasi totalité de glycogène et de glucose durant les stades A, B et C. Au stade D, il y a apparition d'autres sucres réducteurs. Ces derniers sont des aldoses. Le tréhalose, un disaccharide inconnu chez les vertébrés mais important chez les invertébrés et particulièrement chez les insectes (FREEDMAN, 1978) ne constitue pas, comme tel, un sucre réducteur étant donné que les fonctions réductrices de ses deux glucoses constitutifs servent à leur liaison. Il intervient pourtant dans les sucres réducteurs que nous mesurons parce que les deux fonctions réductrices sont libérées lors du dosage à l'antrone. Sa concentration dans l'hémolymphe varie beaucoup d'une espèce d'arthropode à l'autre ; il peut s'accumuler dans divers tissus et servir de source de glucose après hydrolyse par une trehalase (1). Or nous savons qu'au niveau de l'épiderme et du tissu conjonctif sous-épidermique il y aura une demande de glucose à l'approche et pendant la mue. Ceci pourrait expliquer ce que nous observons à partir du stade D. Pour en savoir davantage, il serait utile de doser spécifiquement ce sucre. Il n'est pas exclu que d'autres sucres réducteurs interviennent à ce moment.

-o-o-o-

(1) SCHWOCH (1972)

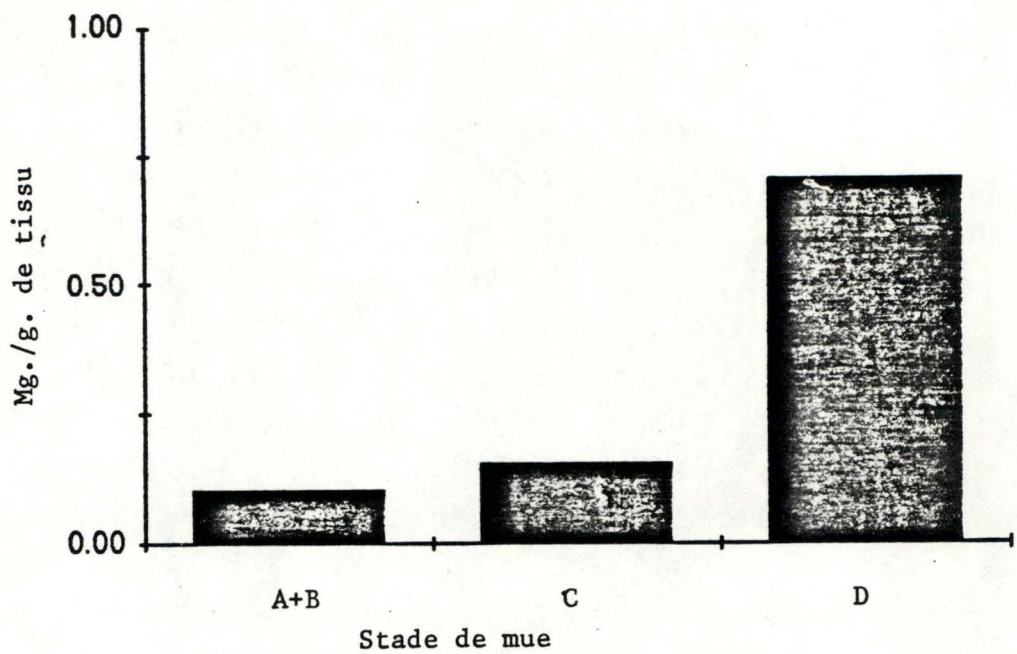


Figure 28

Variation en été et suivant le stade de mue de la concentration de la glucosamine dans l'épiderme et le tissu conjonctif sous-épidermique du crabe *Carcinus maenas*. Chaque colonne représente un dosage effectué sur le matériel correspondant à plusieurs crabes.

2.2.4 La glucosamine

Nous n'avons travaillé, dans ce cas, que sur des individus se trouvant naturellement aux différents stades de mue en été. De plus, les homogénats de tous les crabes se trouvant à un même stade de mue ont été "poolés" afin d'avoir assez de matériel pour le dosage.

Tableau 17

	Intermue (C)	Prémue (D)	Postmue (A et B)
quantité de glucosamine en mgr/gr	0,70	0,15	0,10
T	(3)	(2)	(4)

DISCUSSION

La quantité de glucosamine est plus élevée en intermue qu'en pré- et postmue (tableau 17). Comme ce sucre aminé est un précurseur possible de la chitine (schéma 1), cela expliquerait que pendant la période de formation de la cuticule sa concentration tissulaire diminue. Ceci concorde avec les résultats de PAHLIC et STEVENSON (1978) qui montrent une diminution de la concentration de glucosamine au stade B dans l'épiderme d'Orconectes sanborni.

Nous n'avons pas présenté de résultats pour l'acétyl-glucosamine faute d'une quantité suffisante de matériel suite aux autres dosages à effectuer. Quelques mesures effectuées en été sur crabes en intermue donnent une concentration mM, ce qui est du même ordre que celle de la glucosamine.

2.3. Les enzymes

L'activité de la synthase et de celle de la phosphorylase varient beaucoup d'un crabe à l'autre, et ce, autant pour les formes actives que pour les formes totales (a + b) Il en résulte que la variabilité au sein d'un groupe est élevée. Cette "variabilité intragroupe" est trop grande par rapport à la "variabilité intergroupe"; ce qui nous empêche d'observer l'effet éventuel de la saison, du traitement ou du cycle de mue.

Les valeurs moyennes observées pour chaque groupe sont présentées au tableau **18** pour la synthase totale et au tableau **19** pour la phosphorylase.

Tableau

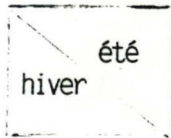
hiver	été
-------	-----

	LP	LP + ECD	ECD	EP + ECD	EP	contrôle	totaux
A	été hiver					140+92 (n=7)	140+92 (n=7)
B						130+120 (n=5)	130+120 (n=5)
C	100+92 (n=3)		141+100 (n=4)	90+80 (n=1)		126+91 (n=3) 153+ 143(n=7)	118+100 (n=8) 158+ 111(n=10)
D		170+ 82 (n=3)	210+200 (n=2)		156+126 (n=3) 100+ 80(n=4)		190+148 (n=5) 135+ 98 (n=7)
to- taux	160+ 92 (n=3)	170+ 82 (n=3)	186+170 (n=6)	90+80 (n=1)	156+26 (n=3) 100+ 80(n=4)	142+130 (n=1) 153+ 163(n=7)	

Tableau 18

Activité de la glycogène synthase totale (a+b) de l'épiderme et du tissu conjonctif sous-épidermique de crabes à différents stades de la mue. Les colonnes qui correspondent à un traitement, et les lignes qui correspondent à un stade de mue ont été sommées pour d'éventuelles comparaisons. Les valeurs représentent des moyennes \pm l'écart-type. Elles sont exprimées en nmôles de glycosyle incorporé au glycogène par minute et par g. de tissu.

Tableau



	LP	LP + ECD	ECO	EP + ECO	EP	contrôle	totaux
A						2,8+2,0 ($\bar{n}=7$)	2,3+2,0 ($\bar{n}=7$)
B						3,5+3,3 ($\bar{n}=4$)	3,5+3,3 ($\bar{n}=4$)
C	5+3,9 ($\bar{n}=5$)		3+1,8 ($\bar{n}=1$)	2,1+1,3 ($\bar{n}=1$)		2,9+2,1 ($\bar{n}=7$)	2,8+2,0 ($\bar{n}=11$)
D		:2+ :1,5($n=6$)	3,5+2,3 ($\bar{n}=3$)		5+2,1 ($\bar{n}=2$)		3,6+2,8 ($\bar{n}=5$)
to- taux	5+ 3,9($n=5$)	:2+ :1,5($n=6$)	3,2+2,1 ($\bar{n}=6$)	2,1+1,3 ($\bar{n}=1$)	5+2,1 ($\bar{n}=2$)	3,0+2,5 ($\bar{n}=8$)	3,2+ 2,7($n=9$)
					:3,9+ :2,6($n=3$)		
						:3,0+ :2,3($n=8$)	

Tableau 19

Activité de la glycogène-phosphorylase ($\underline{a}+\underline{b}$) de l'épiderme et du tissu conjonctif sous-épidermique à différents stades de la mue. Les valeurs représentant des moyennes \pm l'écart-type sont exprimées en μ môles de Pi libérées par minute et par gr de tissu.

Comme les pourcentages de la forme active par rapport à la forme totale peuvent être indicatifs d'une situation de synthèse ou de dégradation et que, de fait, ils présentaient plus d'homogénéité entre eux, nous avons effectué sur eux les mêmes analyses que celles réalisées pour les sucres réducteurs, la glycogène et le glucose.

Stades A et B

Les moyennes m_1 et m_2 représentent les résultats obtenus pour des crabes pêchés en été et soumis à aucun traitement.

Stade C

La moyenne représente les résultats obtenus pour des crabes en intermue

En effet, si nous étudions les groupes traités et non traités, nous voyons qu'en été comme en hiver les individus traités montrent des différences significatives par rapport aux individus non traités (tableau **23**). Dès lors, pour l'été comme pour l'hiver, nous ne reprenons ici que les individus non traités.

Si nous comparons les résultats de ces derniers en été et en hiver, nous voyons qu'ils diffèrent significativement (tableau **23**). Cette différence est cependant masquée dans le cas où nous rassemblons pour chacune des saisons les individus traités ou non (tableau **21**).

Nous présentons la moyenne observée en été et nous discuterons de l'effet de la saison ultérieurement.

Stade D

La moyenne m_4 représente les crabes arrivés en première mue en été et après traitement.

"L'effet saison" est présenté au tableau **22** et discuté ultérieurement.

2.3.1. La synthase

Variation du pourcentage de forme active/forme totale suivant le stade de mue

Tableau 20

A	B	C	D	
$m_1=15,6 \pm 4,5$ (n = 7)	$m_2=17,3 \pm 4$ (n = 5)	$m_3=53 \pm 8$ (n=3)	$m_4=17,3 \pm 4$ (n = 5)	moyenne du rapport forme a/forme b $m + S$

$$F_{obs} = 103 ; D.F. = 16; D.R. = 3$$

$$P(F_{obs}) = 0,999$$

Les moyennes sont comparées deux à deux afin de découvrir l'origine de ce résultat

FA/B obs. = 0,173	$P(F < F_{obs}) = 0,0873$
FA/C obs. = 89,0	$P(F < F_{obs}) = 0,999$
FA/D obs. = 0,17	$P(F < F_{obs}) = 0,0853$
FB/C obs. = 73,6	$P(F < F_{obs}) = 0,999$
FB/D obs. = 0,0113	$P(F < F_{obs}) = 0,0018$
FC/D obs. = 76	$P(F < F_{obs}) = 0,999$

Nous voyons donc que m_3 est différente des autres moyennes. C'est au stade C que nous observons le plus haut pourcentage de forme active.

Variation en été et suivant le stade de mue de la glycogène-synthase a dans l'épiderme et le tissu conjonctif sous-épidermique du crabe *Carcinus maenas*. Chaque colonne représente une moyenne affectée de son écart-type.

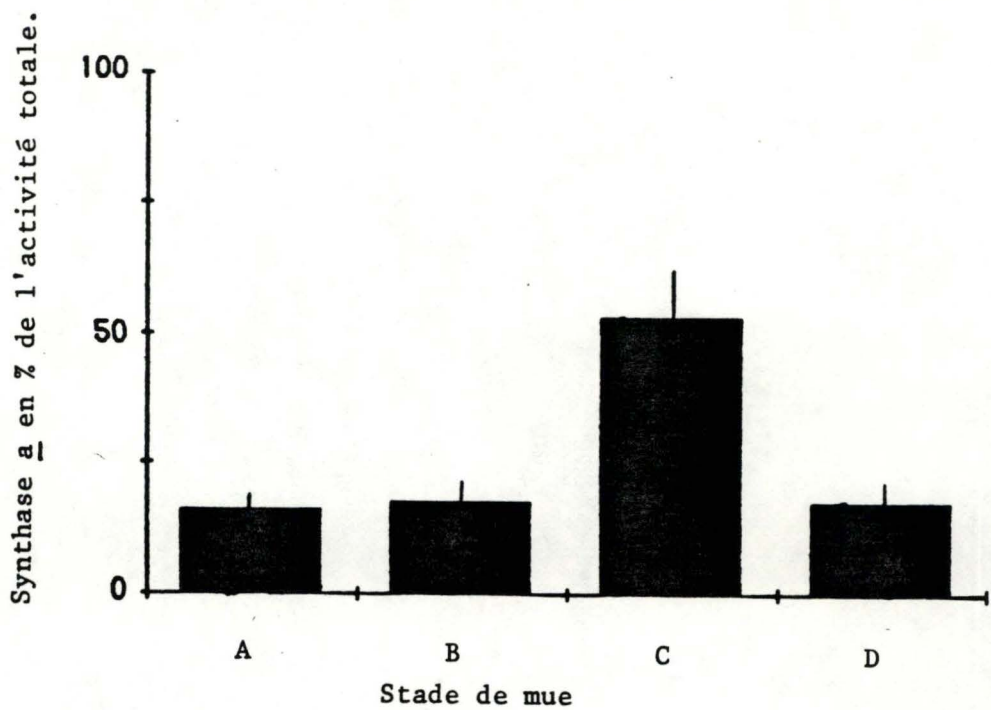


Figure 29

Comparaison entre les pourcentages de forme active/forme totale en été et en hiver

a) Crabes en intermue (C)

Tableau 21

moyenne du pourcentage forme <u>a</u> /forme <u>a+b</u>			
ETE	$m_1 = 56,2 \pm 21,3$	$n = 7$	moyenne du rapport forme a/forme b $m + S$
HIVER	$m_2 = 46,2 \pm 21,8$	$n = 10$	

$$F_{obs} = 1,36$$

$$DF = 1$$

$$DR = 15$$

$$P(F < F_{obs}) = 0,739$$

b) Crabes en prémue (D)

Tableau 22

moyenne du pourcentage forme <u>a</u> /forme <u>a+b</u>			
ETE	$m_1 = 17,3 \pm 4$	$n = 5$	moyenne du rapport forme a/forme b $m + S$
HIVER	$m_2 = 10 \pm 5,3$	$n = 7$	

$$F_{obs} = 5,88$$

$$DF = 1$$

$$DR = 10$$

$$P(F < F_{obs}) = 0,96$$

Il apparaît ici une différence significative pour les crabes en prémue ; nous les traiterons donc séparément, ce qui n'est pas le cas des crabes en intermue que nous traiterons ensemble.

Comparaison du pourcentage de forme active/forme totale pour un même stade de mue suite à l'application du traitement

a) Crabes en intermue (C)

Tableau 23

	L.P.	L.P.+E.C.D.	E.C.D.	E.P.	contrôle
ETE			$m_1=41 \pm 5$ (n=4)		$m_2=53,3 \pm 8$ (n=3)
HIVER	$m_3=26 \pm 1,7$ (n=3)				$m_4=72,5 \pm 10$ (n=7)
					moyenne du rap- port forme a/ forme b m + S

Pour le lot ETE Fobs = 5,96 DF = 1 DR = 5 P(F<Fobs) = 0,942

Pour le lot HIVER Fobs = 255 DF = 1 DR = 8 P(F<Fobs) = 0,999

Ici, nous obtenons dans les deux cas des variations fort significatives. Nous traiterons dès lors chaque groupe isolément.

b) Crabes en prémue (D)

Tableau 24

	L.P.	L.P.+E.C.D.	E.C.D.	E.P.	contrôle
ETE			$m_1=17 \pm 1,1$ (n=2)	$m_2=17,6 \pm 5,5$ (n=3)	
HIVER		$m_3=11,1 \pm 2,8$ (n=3)		$m_4=9,9 \pm 1,73$ (n=4)	
					moyenne du rap- port forme a/ forme b m + S

Pour le lot ETE Fobs = 0,025 DF = 1 DR = 3 P(F<Fobs) = 0,121

Pour le lot HIVER Fobs = 0,091 DF = 1 DR = 5 P(F<Fobs) = 0,229

Comme cela a été écrit dans l'appendice traitant des techniques de dosage, nous n'avons pas de preuve directe quant à la spécificité de la mesure de la forme a. L'effecteur utilisé dans le test est théoriquement susceptible de stimuler la forme a tout en inhibant la forme b et les résultats obtenus sont cohérents avec les situations physiologiques que connaît l'animal. C'est en tenant compte de ces limites affectant la valeur du dosage de la forme a qu'il faut examiner le tableau. Il nous indique une activité synthétique élevée en période d'intermue soit à un moment où le crabe se nourrit beaucoup. Il y a donc alors le substrat nécessaire pour faire des réserves dont l'animal aura besoin en période de mue. Aux stades A et B, l'activité de l'enzyme a se réduit à 15 % de la forme totale. A ces moments, l'animal ne se nourrit plus et les réserves de glycogène constituées en intermue sont utilisées sous forme de glucose qui servira de matériel énergétique ou de substrat pour la formation de la nouvelle cuticule. Au stade D, l'activité synthétique est basse. A ce moment les réserves constituées sont suffisantes et il n'y a plus de synthèse ; c'est d'ailleurs à cette période que le crabe arrête de se nourrir. Pour ce stade, la tendance à une diminution du pourcentage de synthase a en hiver, si elle est significative, ne permet cependant pas d'expliquer un changement physiologique, vu que la différence se porte sur de faibles pourcentages d'activité.

Stades A et B

Les moyennes ont été calculées avec des résultats obtenus en été pour des crabes n'ayant été soumis à aucun traitement.

Stade C

La moyenne rassemble les individus traités et non traités car le tableau **28** nous montre qu'il n'y a pas de différence entre eux.

Elle rassemble aussi les résultats obtenus en été et en hiver car eux non plus ne présentent de différence significative, (tableau **26**).

Stade D

La moyenne représente tous les individus traités en été et en hiver. De fait, le tableau **27** nous montre qu'il ne semble pas exister "d'effet saison".

2.3.2 La phosphorylase

Variation du pourcentage forme active/forme totale observée suivant le stade de mue

Tableau 25

Moyenne des pourcentages \pm écart type forme <u>a</u> /forme <u>a+b</u> (m + S)						
A	⋮	B	⋮	C	⋮	D
82 ± 12 (n = 7)	⋮	$m_2 = 90 \pm 10$ (n = 4)	⋮	$m_3 = 79 \pm 17$ (n = 23)	⋮	$m_4 = 75 \pm 9$ (n = 14)

$$F_{obs} = 1,61$$

$$DF = 3$$

$$DR = 17$$

$$P(F < F_{obs}) = 0,776$$

Au vu des résultats précités, aucune différence n'apparaît en fonction du stade de mue.

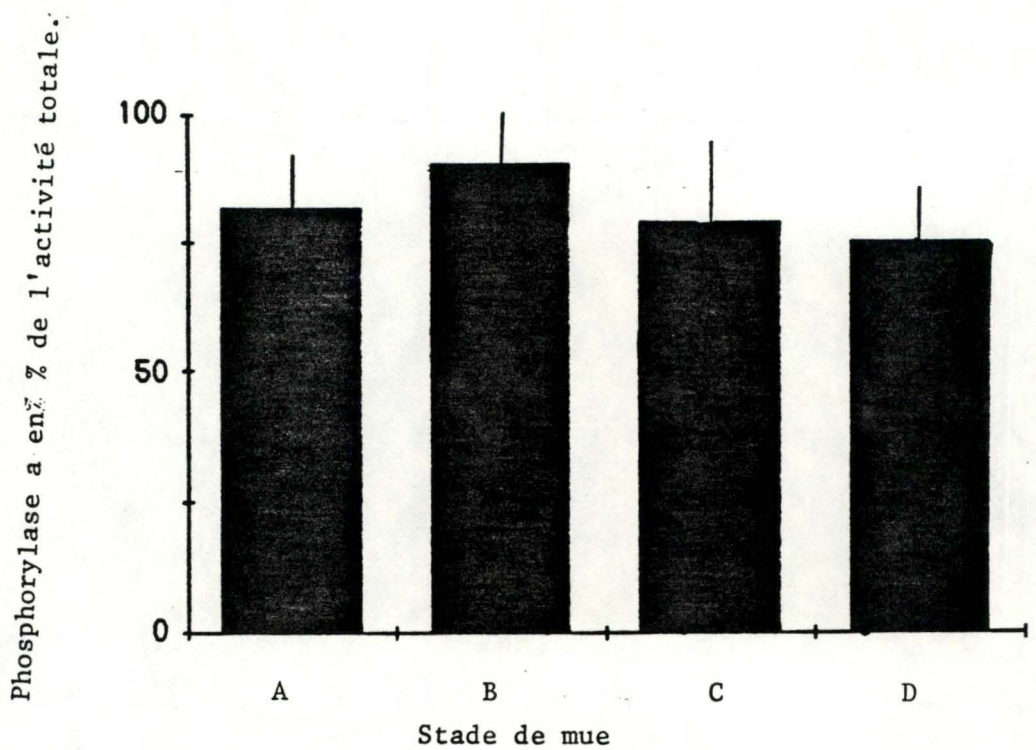


Figure 31

Variation en été et suivant le stade de mue de la glycogène-phosphorylase a dans l'épiderme et le tissu conjonctif sous-épidermique du crabe *Carcinus maenas*. Chaque colonne représente une moyenne affectée de son écart-type.

2.3.2 La phosphorylase

Comparaison entre le pourcentage de forme active/forme totale en été et en hiver
--

a) Crabes en intermue (C)

Tableau 26

	· · moyenne du pourcentage + écart type de · forme <u>a</u> /forme <u>a+b</u> (n+S)	
ETE	· $m_1 = 80 \pm 17$ (n = 10)	moyenne du rapport forme <u>a</u> /forme totale $m + S$
HIVER	· $m_2 = 78 \pm 15$ (n = 13)	

Fobs = 0,204

DF = 1 P(F < Fobs) = 0,340

DR = 21

b) Crabes en prémue (D)

Tableau 27

	· · moyenne du pourcentage + écart type de · forme <u>a</u> /forme <u>a + b</u>	
ETE	· $m_1 = 76 \pm 10$ (n = 5)	moyenne du rapport forme <u>a</u> /forme totale $m + S$
HIVER	· $m_2 = 74 \pm 8$ (n = 9)	

Fobs = 1,66

DF = 1 P(F < Fobs) = 0,779

DR = 12

Dans aucun des deux cas, nous ne voyons de différence significative due à la saison ce qui nous permet de rassembler les résultats pour chacun des stades.

Variation du pourcentage de forme active/totale observée suite aux traitements

a) Crabes en intermue

Tableau 28

	L.P.	LP+ECD	ECD	EP	contrôle	
ETE			$m_1 =$ 78 _{±15} (n = 3)		$m_2 =$ 83 _{±15} (n=7)	moyenne du rap- port forme a/ forme to- tale $\bar{m} + S$
HIVER	$m_3 =$ 76 _{±20} (n=5)				$m_4 =$ 79 _{±16} (n = 8)	

pour le lot ETE Fobs = 2,62 ; D.F. = 1 D.R. = 8
P(F < Fobs) = 0,858

pour le lot HIVER Fobs = 0,888 ; D.F. = 1 D.R. = 11
P(F < Fobs) = 0,369

b) Crabes en prémue

Tableau 29

	L.P.	LP+ECD	ECD	EP	contrôle	
ETE			$m_1 =$ 74 _{±8} (n = 3)	$m_2 =$ 79 _{±10} (n = 2)		moyenne du rap- port forme a/ forme to- tale $\bar{m} + S$
HIVER		$m_3 =$ 76 _{±12} (n = 6)		$m_4 =$ 70 _{±7} (n = 3)		

pour le lot ETE Fobs = 0,330 ; D.F. = 1 D.R. = 3
P(F < Fobs) = 0,393

pour le lot HIVER Fobs = 0,875 ; D.F. = 1 D.R. = 7
P(F < Fobs) = 0,384

Dans les deux cas, il ne semble pas y avoir de différence entre chaque groupe, qu'ils aient subi ou non des traitements.

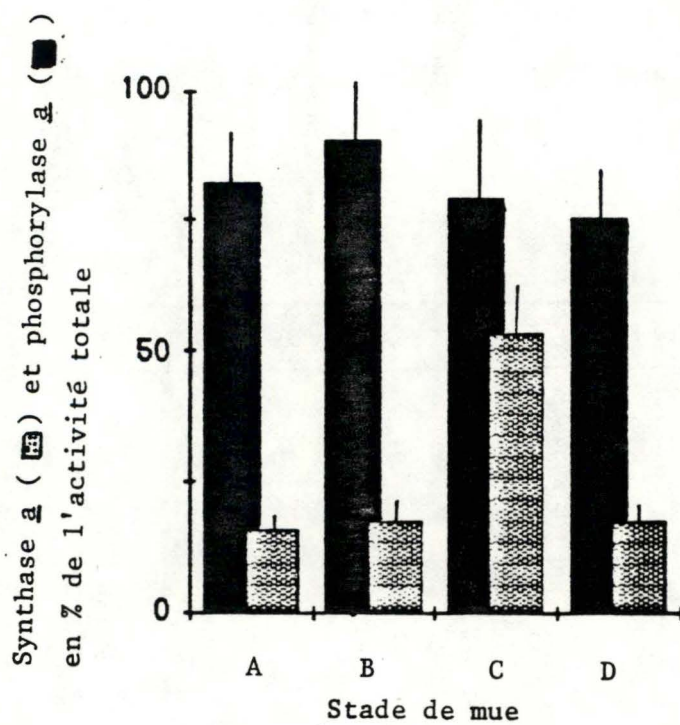


Figure 32

Variation en été et suivant le stade de mue de la glycogène-synthase α et de la glycogène-phosphorylase α dans l'épiderme et le tissu conjonctif sous-épidermique du *Carcinus maenas*. Chaque colonne représente une moyenne affectée de son écart-type.

DISCUSSION

Les résultats obtenus lors de l'interconversion in vitro de la phosphorylase et présentés dans l'appendice nous permettent de dire que nous mesurons cette fois spécifiquement la forme (a) de l'enzyme. Par contre le tableau 25 indique une activité fort élevée tout au long du cycle de mue, ce qui est difficilement compréhensible. Aux stades A et B pendant lesquels il y a une forte demande de glucose donc une dégradation possible du glycogène, cela ne pose de problème. Par contre, on s'attendait à une faible activité durant les autres stades. Ainsi, c'est au stade C que s'observe l'activité de synthase la plus intense. Or, comme décrit dans la première partie du chapitre, il existe des mécanismes empêchant l'activation simultanée des deux enzymes. Une forte activité de la phosphorylase à ce stade ne s'explique donc pas. Au vu de ces observations, nous ne pouvons pas écarter la possibilité d'une activation artéfactuelle de l'enzyme au cours des manipulations précédant le dosage. Dès lors son activité ne serait plus représentative de ce qui se passe in vivo.

CHAPITRE III - LES PROTEINES

Objectif des dosages

Résultats

Discussion

STADE C

STADE A



Figure 3 3

LES PROTEINES

3.1 Objectif des dosages

Des études réalisées en microscopie électronique par BOUCHAUD ET HUBERT (1973) montrent qu'il existe différents aspects de l'appareil de GOLGI et de ses grains de sécrétions en fonction du cycle de mue.

"En période préexuviale (période D), l'activité sécrétrice est maximale, les dictyosomes, sont nombreux et donnent naissance à des grains de sécrétion dont le contenu protéique est nettement visible"

"En période postexuviale (période A), cette sécrétion est faible ; elle est ensuite minimale à la période de stabilité des téguments (période C). Corrélativement, on observe un polymorphisme cyclique de l'appareil de GOLGI allant de la forme ouverte, témoignant d'une activité sécrétrice, intense à la forme fermée circulaire correspondant à un état d'inactivité transitoire".
(Figure 33).

Les résultats de ces études nous permettent de supposer que la quantité de protéines présente dans l'épiderme varie en fonction du stade de mue. Notre objectif est ici de quantifier ces variations par méthode biochimique.

3.2 Résultats

Stades A et B

Les moyennes m_1 et m_2 ont été calculées avec les résultats obtenus pour des crabes capturés en été et qui n'ont subi aucun traitement particulier.

Stade C

La moyenne m_3 rassemble les individus traités et non traités, en hiver et en été, en effet, le tableau 31 montre qu'il n'y a pas de différence entre les deux saisons, et le tableau 33 montre que le traitement n'influence pas le résultat.

Stade D

La moyenne rassemble les résultats obtenus en été et en hiver, quelque soient les traitements qu'ont subi les crabes (tableau 32 et 34).

Variation de la concentration de protéines au cours du cycle de mue

Tableau 30

	A	B	C	D
été et hiver	$m_1 =$	$m_2 =$	$m_3 =$	$m_6 =$
mgr par	$25,6 \pm 4,3$	$26,2 \pm 3,9$	$30,1 \pm 4,0$	$42,0 \pm 7,2$
gr de	(n = 7)	(n = 5)	(n = 27)	(n = 16)
tissu				

$$F_{obs} = 3,64 ; D.F. = 3 ; D.R. = 45$$

$$P(F < F_{obs}) = 0,980$$

Nous pouvons dire, avec un risque d'erreur de 2 %, qu'il ya du moins une moyenne différente des autres. La comparaison des moyennes deux à deux s'indique pour situer où se trouve la différence décelée par le test d'AMOUA 1. Pour celà, nous utiliserons la méthode des contrastes de SHEFFE

$$A/B \quad F_{obs} = 0,048$$

$$P(F < F_{obs}) = 0,014$$

$$B/C \quad F_{obs} = 0,092$$

$$P(F < F_{obs}) = 0,029$$

$$C/D \quad F_{obs} = 3,9$$

$$P(F < F_{obs}) = 0,912$$

$$D/A \quad F_{obs} = 3,19$$

$$P(F < F_{obs}) = 0,960$$

$$A/C \quad F_{obs} = 0,10$$

$$P(F < F_{obs}) = 0,0414$$

$$B/D \quad F_{obs} = 2,74$$

$$P(F < F_{obs}) = 0,946$$

Il y a une diminution significative après l'exuviation soit du stade D aux stades A et B. Une tendance à l'augmentation à l'approche de la mue soit du stade C au stade D, apparaît également.

Comparaison entre la concentration de protéines observée en été et en hiver

a) Crabes en intermue (C)

Tableau 31

	moyenne \pm écart type en mgr de protéines par gr de tissu
ETE	$m_1 = 28,4 \pm 4,6$ (n = 19)
HIVER	$m_2 = 33,6 \pm 6,4$ (n = 8)

$$F_{obs} = 1,60$$

$$D.F. = 1 \quad P(F < F_{obs}) = 0,787$$

Comme aucune différence significative n'apparaît entre été et hiver, nous rassemblerons tous les résultats des crabes arrivés à chacun des stades.

b) Crabes en prémue (D)

Tableau 32

	moyenne \pm écart type en mgr de protéines par gr de tissu
ETE	$m_1 = 39,1 \pm 4,8$ (n = 4)
HIVER	$m_2 = 43,3 \pm 8,4$ (n = 12)

$$F_{obs} = 0,423$$

$$D.F. = 1 \quad P(F < F_{obs}) = 0,471$$

Nous pouvons tirer les mêmes conclusions que celles qui concernaient les crabes en intermue.

Variation de la concentration de protéines pour un stade donné suite à l'application des traitements

a) Crabes en intermue (C)

Tableau 33

	C.P.+F.	L.P.	L.P.+ECD	E.C.D.	ECD+E.P.	E.P.	contrôle
été et hiver mgr par gr de tissu	$m_1 =$ 23,6 \pm 4,8 (n = 7)	$m_2 =$ 33,8 \pm 13,6 (n = 3)	$m_3 =$ 24,2 \pm 4,8 (n = 4)		$m_4 =$ 29,4 \pm 7,4 (n = 2)	$m_5 =$ 27,2 \pm 4,0 (n = 4)	$m_6 =$ 31,2 \pm 10,0 (n = 10)

$$F_{obs} = 1,96 ; D.R. = 3P ; D.E. = 5$$

$$P(F < F_{obs}) = 0,768$$

Aucune différence significative n'apparaissant entre les crabes arrivés au stade C de façon naturelle et ceux qui y sont arrivés par traitement, nous avons choisi de rassembler ces résultats pour l'étude suivante concernant la variation de la quantité de protéines au cours d'un cycle de mue.

b) Crabes en prémue (D)

Tableau 34

	C.P.+F.	L.P.	L.P.+ECD	E.C.D.	ECD+E.P.	E.P.	contrôle
été et hiver mgr par gr de tissu			$m_1 =$ 43,6 \pm 12 (n = 6)	$m_2 =$ 38 \pm 8 (n = 2)		$m_3 =$ 1,36 \pm 9 (n = 8)	

$$F_{obs} = 3,8 ; D.R. = 2,5 ; D.F. = 1$$

$$P(F < F_{obs}) = 0,836$$

Aucune différence significative n'apparaît dans ce cas ; nous allons donc traiter ensemble tous les individus en prémue.

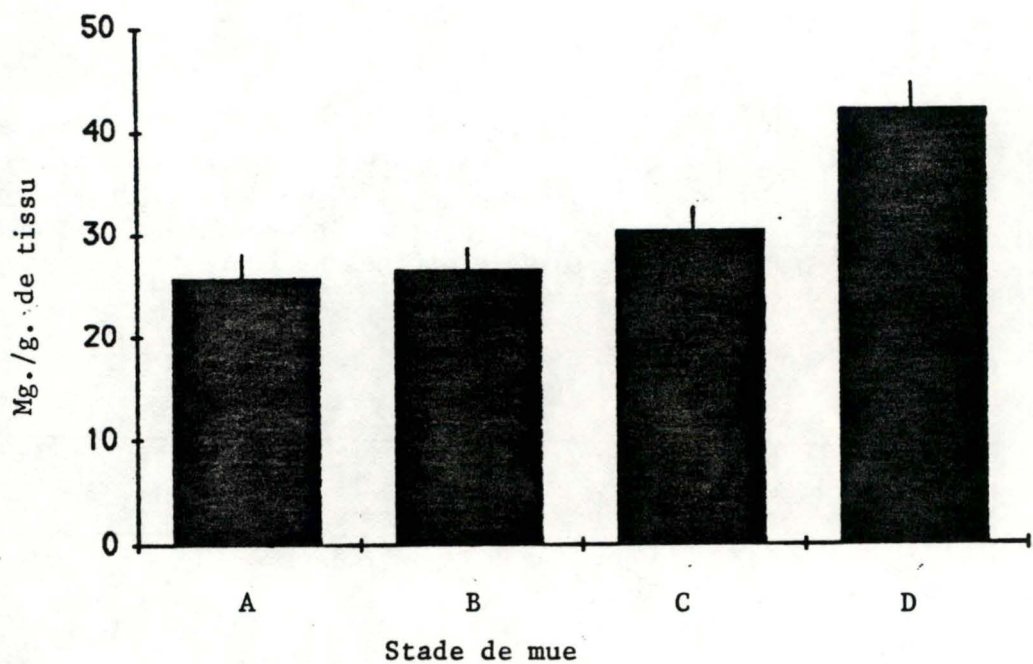


Figure 34

Variation en été et suivant le stade de mue de la concentration de protéines dans l'épiderme et le tissu conjonctif sous-épidermique du crabe *Carcinus maenas*. Chaque colonne représente une moyenne affectée de son écart-type.

DISCUSSION

On n'a pas pu montrer de différences saisonnières entre la quantité de protéines, celle-ci n'étant pas non plus influencée par la manière dont les différents stades sont obtenus. Les éléments significatifs sont une quantité de protéines plus élevée à l'approche de la mue (stade D) et plus basse après celle-ci (A et B). La quantité élevée en présence peut être mise en relation avec l'aspect de l'appareil de GOLGI comme signalé plus haut. De plus, à ce moment, l'épiderme entre en mitose ce qui nécessite la synthèse de protéines supplémentaires telles que des protéines de membrane. Signalons enfin que des peptides et acides aminés en provenance de la cuticule qui est en partie digérée à ce stade sont récupérés au niveau de l'épiderme. Ils seront dosés en même temps que les protéines de celui-ci. Après la mue, une entrée massive d'eau dans les cellules (DRACH, 1932) contribua fortement à réduire la concentration en protéines du tissu. Au stade d'intermue (C), les cellules épidermiques présentent une forme pavimenteuse caractéristique de cellules qui ne sont pas en activité, ce que confirme l'aspect du GOLGI et ne contredit pas les résultats.

o
o o

CHAPITRE IV - DISCUSSION DES TRAITEMENTS

1. Mortalité
2. Obtention du stade de mue
3. Variation de la concentration en métabolites pour un stade donné comme conséquence d'un traitement
4. Variation du pourcentage de forme active/ forme totale pour un stade donné comme conséquence d'un traitement

1. MORTALITE

L'application des différents traitements n'a pas toujours abouti ; la survie variable suivant le traitement s'est élevée en moyenne à 50 %. En effet, par ces manipulations, nous engendrons des modifications métaboliques qui peuvent être fatales pour l'individu.

Ainsi, en épédonculant les crabes non seulement nous éliminons l'organe de sécrétion de la "moult inhibiting hormone", mais il semble que nous éliminons aussi le lieu de production du facteur d'exuviation. Dès lors le crabe arrivera à la période qui précède immédiatement la mue (absence de MIH), mais au moment où il devra rejeter son ancienne carapace, il ne recevra pas le signal déclenchant ce phénomène (absence de facteur d'exuviation). L'animal se trouve alors dans des conditions qu'il ne peut supporter longtemps. Pour ce lot, nous obtenons de fait une mortalité de plus de 60 %.

2. OBTENTION DU STADE DE MUE

L'objectif des traitements qui était d'accélérer les phénomènes préparatifs à la mue nous a permis d'obtenir suffisamment de crabes en prémue et, en ce sens, ils ont été efficaces.

Nous pouvons nous référer au tableau 4 qui est représentatif des stades de mue obtenus.

Il semble qu'une augmentation de la phase claire de la photopériode ne soit pas un facteur suffisant pour déclencher les processus préparatifs à la mue. Le signal "déclencheur" venant du milieu extérieur comporte sans doute aussi d'autres éléments tels que la température de l'eau la composition de celle-ci,...

L'injection d'ecdysone à ces crabes permet, elle, d'observer des stades de prémue : 60 % des crabes traités se retrouvent au stade D après six semaines. La seule injection d'ecdysone permet également d'obtenir des individus au stade D. Dès lors, le traitement "longue photopériode" ne semble avoir que peu d'importance par rapport au traitement "injection d'ecdysone".

L'épédonculation a également été efficace, cependant, dans ce cas, il y a une forte mortalité à l'approche de la mue (l'épédonculation supprime d'autres facteurs que la MIH, ce qui engendre un désordre métabolique). Cette mortalité se marque davantage si on injecte, en plus, de l'ecdysone : après six semaines, 80 % des crabes qui se trouvaient prêts à exuvier sont morts suite à l'impossibilité de rejeter leur carapace. Les 20 % de survivants n'étaient pas encore arrivés à ce stade.

Enfin, les crabes soumis en été à une courte photopériode et à une température de 12°C sont restés en intermue, comme attendu. En effet, les conditions reflètent, du moins en partie, ce que le crabe connaît en hiver, période pendant laquelle il ne mue pas.

3. VARIATION DE LA CONCENTRATION EN METABOLITES POUR UN STADE DONNE COMME CONSEQUENCE D'UN TRAITEMENT

Il n'apparaît, de ce point de vue, aucune différence significative entre des crabes arrivés à un stade de mue naturellement et des crabes traités si ce n'est une augmentation importante des sucres reducteurs chez les crabes soumis à une longue photopériode (tableau 15). Cette augmentation ne porte ni sur le glycogène, ni sur le glucose (tableaux 4 et 9). Les crabes soumis à ce traitement étaient plus petits que ceux constituant les autres lots (3 cm au lieu de \pm 5 cm). Leur activité métabolique plus élevée requiert plus d'énergie. Comme ni le glucose, ni le glycogène ne sont modifiés, il s'agit d'autres sucres dont peut-être le tréhalose.

Tous les stades D dont nous avons disposés ont été obtenus après traitement et nous n'avons pas eu l'occasion de les comparer avec des stades D obtenus dans la nature. Cependant, comme les différents traitements n'ont amené entre eux aucune différence significative de la concentration en sucres et en protéines, nous avons estimé que la comparaison avec la condition naturelle aurait mené au même résultat. Ils ont dès lors été considérés comme représentatifs de ce qui se passe in vivo et utilisés comme tels.

4. VARIATION DU POURCENTAGE DE FORME ACTIVE/FORME TOTALE POUR UN STADE DONNE COMME CONSEQUENCE D'UN TRAITEMENT

Etant donné que le pourcentage de phosphorylase actuel résulte probablement d'une stimulation artéfactuelle, nous ne pouvons utiliser ces derniers pour tirer une conclusion quant à l'effet des différents traitements. Dans le cas de la synthase, le seul traitement qui modifie de façon significative le pourcentage de forme active est une longue photopériode au cours de l'hiver. Ce traitement concerne de petits crabes dont le métabolisme élevé requiert beaucoup d'énergie. Comme nous l'avons déjà dit, la quantité de glucose et de glycogène ne varie pas dans ce cas. Il faudrait doser les différents intermédiaires du cycle des pentoses phosphates ainsi que l'activité des enzymes y étant impliqués. Cela nous permettrait de savoir si chez ces petits crabes, ce cycle ne supplante pas celui de la dégradation et de la synthèse du glycogène ; ce qui expliquerait l'activité réduite de la synthase.

CHAPITRE V -

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'intérêt d'une étude des variations physiologiques que subissent l'épiderme et le tissu conjonctif sous-épidermique au cours du cycle de mue vient d'une part de ce qu'ils sont directement impliqués dans la digestion de l'ancienne cuticule ainsi que dans l'élaboration de la nouvelle et, d'autre part, de ce qu'ils contiennent une réserve de substrats susceptibles de fournir les matériaux et l'énergie nécessaires au phénomène d'exuviation.

Pour mener à bien cette recherche, il nous fallait disposer d'échantillons représentatifs des principaux stades d'un cycle de mue complet. La récolte des crabes dans la nature ne les fournit pas nécessairement en quantité requise, ni au moment voulu. Ce handicap a pu être surmonté grâce à l'induction artificielle des stades de prēmue (D).

Les variations morphologiques de la cellule et de son appareil de Golgi au cours du cycle de mue ont été observées par Chassard-bouchaud (1973). Elles postulent une augmentation de la quantité de protéines en prēmue, nous avons pu confirmer de manière quantitative le bienfondé de ces observations.

Le glucose est généralement considéré comme un précurseur de la chitine ainsi que comme un substrat énergétique (Pahlic et Stevenson, 1978; Johnson et al., 1973).

Il était permis de supposer que ce monosaccharide ainsi que sa forme de réserve, le glycogène, contenus dans l'épiderme et le tissu conjonctif sous-épidermique étaient utilisés au cours du cycle de mue.

De fait, des observations effectuées en microscopie phototonique par Skinner (1962) montrent qu'il y a des variations qualitatives du glycogène dans ces tissus.

Nos résultats quantitatifs confirment ces observations: la concentration du glycogène et du glucose augmente à l'approche de l'exuviation et se réduit en postmue.

De plus ces modifications générales s'accompagnent d'autres changements dans la composition des hydrates de carbone.

Alors que de la postmue à l'intermue, le glucose et le glycogène constituent la quasi-totalité des sucres réducteurs ou comportant des unités réductrices, à l'approche de l'exuviation d'autres sucres s'y ajoutent, parmi lesquels très probablement le tréhalose. On sait que chez les crustacés, ce dernier est synthétisé principalement dans les muscles abdominaux d'où il peut être acheminé vers l'épiderme et le tissu sous-épidermique via l'hémolymphe (Speck, 1969).

Une observation intéressante à ce sujet a été faite par Marc Fourneau (1986) au cours d'un travail effectué en parallèle avec le nôtre. Il observe aussi, à l'approche de l'exuviation, une charge du plasma (hémolymphe -hémocytes) en sucres autres que le glucose.

Au stade actuel, il n'est pas possible de déterminer le rôle particulier joué par chacun de ces sucres au niveau du cycle considéré.

Puisqu'ils servent à la fois de matériau et de source d'énergie dans la synthèse de la chitine, on peut prévoir une glycolyse plus intense ainsi qu'une production accrue de NADPH via le cycle des pentoses-phosphates.

Les quelques dosages de glucosamine que nous avons effectués confirment son rôle de précurseur immédiat dans la synthèse de la chitine. Faute de matériel biologique, nous n'avons pas pu étendre cette observation à la N-acétyl-glucosamine.

Il est généralement admis que la formation des réserves de glycogène est physiologiquement contrôlée par la glycogène-synthase. De fait, son activité est importante dans le tissu étudié au moment où le crabe se nourrit abondamment.

Lors de l'utilisation de ces réserves, il faut un enzyme qui permettra la transformation de ce glycogène en glucose-1-P: la glycogène phosphorylase. L'activité de celle-ci est élevée au moment où la demande de glucose est maximale (stades A et B). Il est cependant étonnant d'observer une activité comparable au moment où les réserves se constituent (stade C₄). Comme notre dosage mesure spécifiquement la forme a, l'observation d'une telle activité pourrait résulter d'une activation artificielle lors du prélèvement du tissu.

Comme on le voit, les résultats obtenus laissent encore certaines questions sans réponses. En particulier l'identification des sucres autres que le glucose et le glycogène devrait permettre de préciser le rôle joué par chacun d'eux dans la préparation et l'achèvement de la mue.

APPENDICE - MATERIEL BIOLOGIQUE ET METHODES

Matériel biologique

Dosages enzymatiques

Dosage des métabolites

APPENDICE : MATERIEL BIOLOGIQUE ET METHODES

1. Matériel biologique

1.1 Description de l'espèce Carcinus maenas (L.)

Le Carcinus maenas est un arthropode de la classe des crustacés. Il possède cinq paires de pattes et un abdomen discret : c'est un décapode brachyoure. C'est un animal au corps massif et aplati, symétrique, plus large que long, protégé par une solide carapace au bord antérieur dentelé. Il est constitué d'un céphalothorax et d'un abdomen réduit rabattu ventralement. L'exosquelette minéralisé protège l'entièreté de l'animal, à l'exception de certains endroits afin de permettre l'articulation de différents segments.

Ce crabe est un prédateur et un nécrophage ; il a une activité importante, surtout à marée haute et la nuit. En hiver, il migre du littoral vers de plus grandes profondeurs, et il remonte au printemps. C'est à cette époque qu'il se reproduit. Le Carcinus maenas mue beaucoup quand il est jeune et muera de moins en moins avec l'âge.

1.2 Récolte

On le récolte durant la basse saison, dans la zone intertidale. Il se dissimule sous les pierres éparpillées au niveau de la zone de balancement des marées. En hiver il migre dans des eaux plus profondes (presqu'à 62 m). et ne remonte qu'avec le retour des températures printanières (avril-mai).

Nous avons effectué deux récoltes, l'une en septembre, l'autre en mai, toutes les deux sous les pierres de la de la jetée à Nieuport.

Pendant la mauvaise saison, la population de Carcinus maenas diminuant le long de nos plages, nous avons été obligés de nous approvisionner dans une poissonnerie.

1.3 Elevage

Au laboratoire, les crabes sont maintenus à la lumière naturelle dans une eau de mer artificielle (Vitakraft : 37,5 gr/l) continuellement filtrée sur laine de verre et charbon de bois. Elle est aussi oxygénée et maintenue à une température de 20° C. Les crabes sont nourris deux fois par semaine avec des moules. Afin d'éviter le stress dû à la surpopulation, nous n'avons pas mis plus de douze crabes par bacs ($\pm 1\text{m}^2$).

1.4 Traitements

1.4.1 Épédonculation :

Une double épédonculation est réalisée chez certains crabes. Des tampons hémostatiques sont alors placés au niveau des deux pédoncules enlevés pour faciliter la coagulation de l'hémolymphe.

Le but de cette opération est de supprimer le complexe Organe X-glande du Sinus, responsables de la synthèse et de la sécrétion de la M.I.H. Ainsi, les organes Y n'étant plus soumis à l'inhibition de cette hormone peuvent libérer la M.H. dont la fonction est d'accélérer les stades préparatifs à la mue (PASSANO, 1951 ; BLISS, 1965).

1.4.2 Injection de β -ecdysone :

N. ANDRIEUX (1974) a montré que l'injection de β -ecdysone à des Carcinus maenas à la fin du stade B ou du stade C induit les phénomènes de la mue. Le déroulement de ces phénomènes est, de plus, fortement accéléré puisque les crabes traités arrivent à la période D après quelques semaines alors que les crabes non traités restent en C₄ pendant ce délai.

Ces expériences ont déjà été réalisées avec succès par BLANCHET et CHARNIAUX-COTTON (1971). En fait, par injection d'hormone, nous remplaçons la M.H. qui ne peut pas être libérée suite à l'action de la M.I.H.

Nous avons effectué trois injections à douze heures d'intervalle. Chacune d'elle correspondant à 30 μ g de β -ecdysone en solution dans 300 μ l d'un mélange alcool/eau (1 volume pour 100 volumes).

1.4.3 La température et la photopériode :

En hiver, des crabes ont été soumis à une longue photopériode (phase claire de 14 heures) et à des températures proches de 20° C. Ces crabes étaient donc dans des conditions proches de celles de l'été.

En été, des crabes ont été placés cette fois dans des bacs éclairés seulement huit heures et dont l'eau était à 12° C. Ces deux conditions visaient à mettre en évidence artificiellement un effet possible de deux facteurs caractéristiques de chacune des saisons.

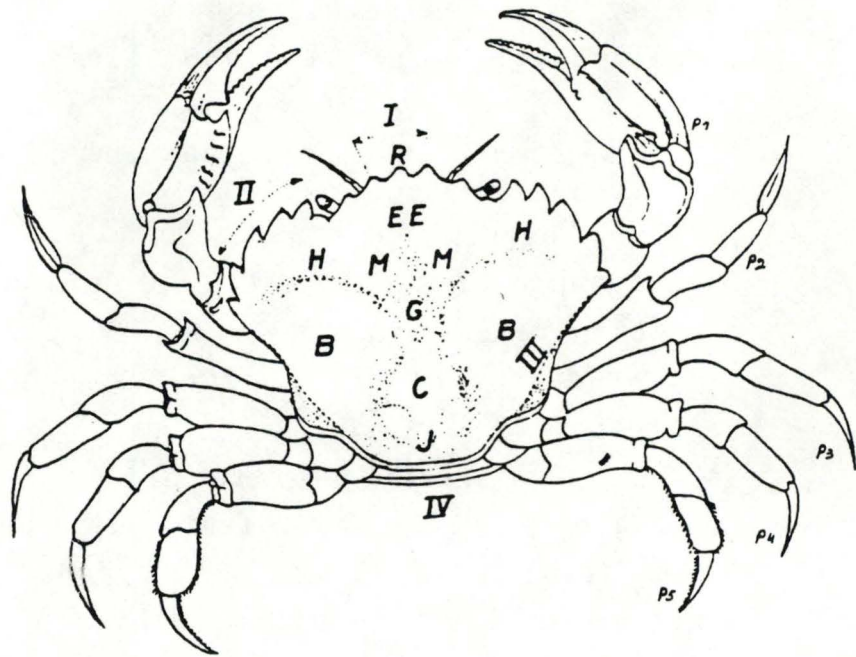


Figure 35

: Bords de la carapace. R : rostre; I : front; II : bord antéro-latéral; III : bord postéro-latéral; IV : bord postérieur.
 Aires de la carapace : B : aires branchiales; C : aire cardiaque; E : aire épigastrique; G : aire gastrique; H : aire hépatique; J : aire intestinale; M : aire métagastrique.

1.4.4 Injection d'ecdysone et longue photopériode Injection d'ecdysone et épédonculation - -

Afin d'amplifier l'action de la M.H., nous avons soumis certains crabes à deux traitements simultanés :

- une longue photopériode susceptible de diminuer la sécrétion de M.I.H. accompagnée d'une injection de β -ecdysone accélérant les phénomènes préparatifs à la mue
- une injection de β -ecdysone combinée cette fois à une ablation bilatérale des pédoncules, ce qui supprime l'émission de M.I.H.

1.5. Prélèvement des tissus

Après avoir retiré le bouclier dorsal du céphalothorax, il est facile de prélever l'épiderme et le tissu conjonctif sous-épidermique qui se détachent assez aisément de la cuticule. La surface prélevée s'étend de l'aire gastrique à l'aire épigastrique et l'aire hépatique. L'aire métagastrique est aussi incluse dans cette surface (figure 35).

Le tissu est placé dans une solution à 0-4°C tamponnée à pH 7,4 avec du tris HCl 25 mM. Cette solution contient aussi de la benzamidine 10 mM qui inhibe des protéases susceptibles d'hydrolyser les enzymes à doser.

Le tissu est ensuite séché sur papier buvard et pesé, puis remis rapidement dans la solution à 0-4° C.

L'homogénéisation dans quatre volumes de la solution tamponnée est réalisée dans homogénéiseur de type POTTER-ELVEJHEM.

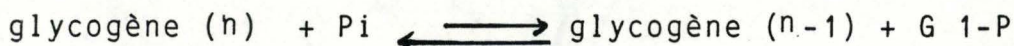
L'homogénat est ensuite centrifugé à basse vitesse 5 minutes à 1500 g., ce qui permet d'obtenir un extrait débarrassé des débris membranaires. C'est cet extrait qui sert pour la mesure des activités enzymatiques et le dosage de métabolites.

2. Dosages enzymatiques

2.1 La glycogène-phosphorylase

2.1.1 Principe de la réaction :

L'activité de la phosphorylase est déterminée dans le sens synthétique de la réaction qui a lieu lorsque l'enzyme est incubé en présence de glycogène et d'un excès de G 1-P (HERS, 1964).



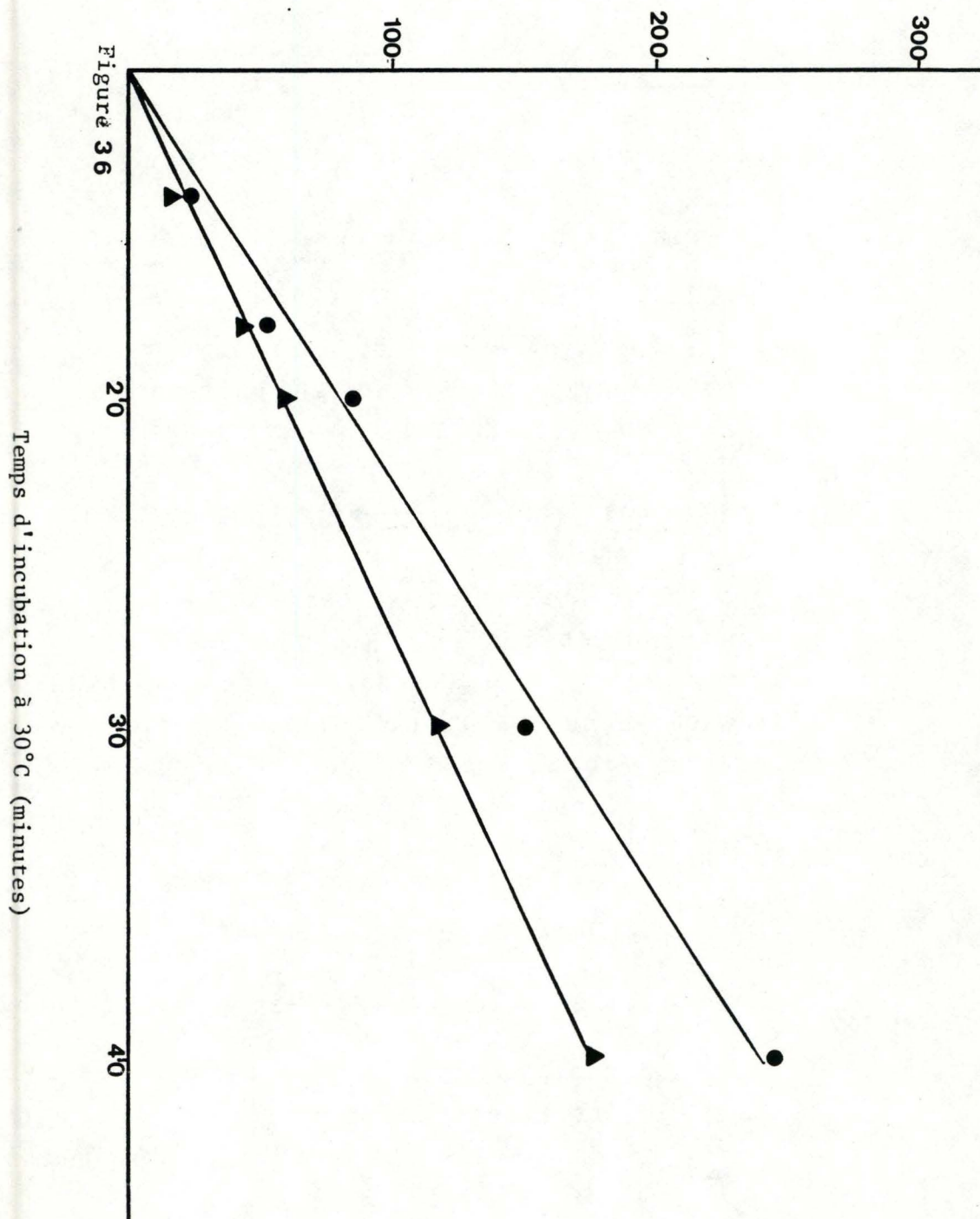
Le phosphate inorganique libéré suite à l'incorporation au glycogène du glucose provenant du G 1-P est mesuré par la technique de FISKE-SUBBAROW (1925) basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdique (formé à partir du Pi et des molybdates de NH_4^+ en milieu acide) en un complexe bleu par de l'acide 1, 2, 4 aminonaphtosulfonique

2.1.2 Mode opératoire :

- a) mise en évidence de l'activité phosphorylase

La phosphorylase totale (a + b) est mesurée par l'incubation à 30°C de 25 μl d'extrait dilué 4 fois avec 75 μl d'une solution contenant

Activité de la phosphorylase totale (●) et de la phosphorylase a (▲)
en μ môles par g. de tissu.



du G 1-P 50 mM, du glycogène 1 %, du NaF $0,15^M$ AMP 1 mM et du $(NH_4)_2 SO_4$ 0,5 mM dans le volume final (P. NOËL, 1985)

La phosphorylase a est mesurée de la même manière que la phosphorylase a + b, mis à part le fait que substrat est dépourvu de 5'-AMP et contient de la caféine 0,5 mM qui inhibe complètement la phosphorylase b (STALMANS et HERS, 1975).

La réaction est arrêtée après un certain temps d'incubation par l'addition de 0,5 ml de TCA (10%) froid qui dénature les protéines. Celles-ci sont éliminées par centrifugation à basse vitesse (1500 g pendant 2 minutes) après avoir amené le volume à 4,3 ml avec de l'eau distillée.

b) dosage du phosphate inorganique libéré

On ajoute au surnageant 0,5 ml de molybdate acide d'ammonium (MAA) puis 0,2 ml d'acide aminonaphtosulfonique (AANS). Les lectures d'extinction se font au spectrophotomètre avec un maximum d'absorbance à 660 nm, dix minutes après l'addition du dernier réactif.

L'étalon phosphate correspond à 0,5 ml d'une solution de KH_2PO_4 mM. Dans les conditions de l'expérience, l'extinction est proportionnelle à la quantité de phosphate pour autant que celle-ci reste inférieure à 1 micromôle

Une unité de phosphorylase est la quantité d'enzyme qui libère une μ môle de Pi par unité de temps, dans les conditions décrites.

Unités de phosphorylase totale (▲) et de phosphorylase a (■ □)
 mesurée à 30°C.
 (μ mûles/min./g.detissu)

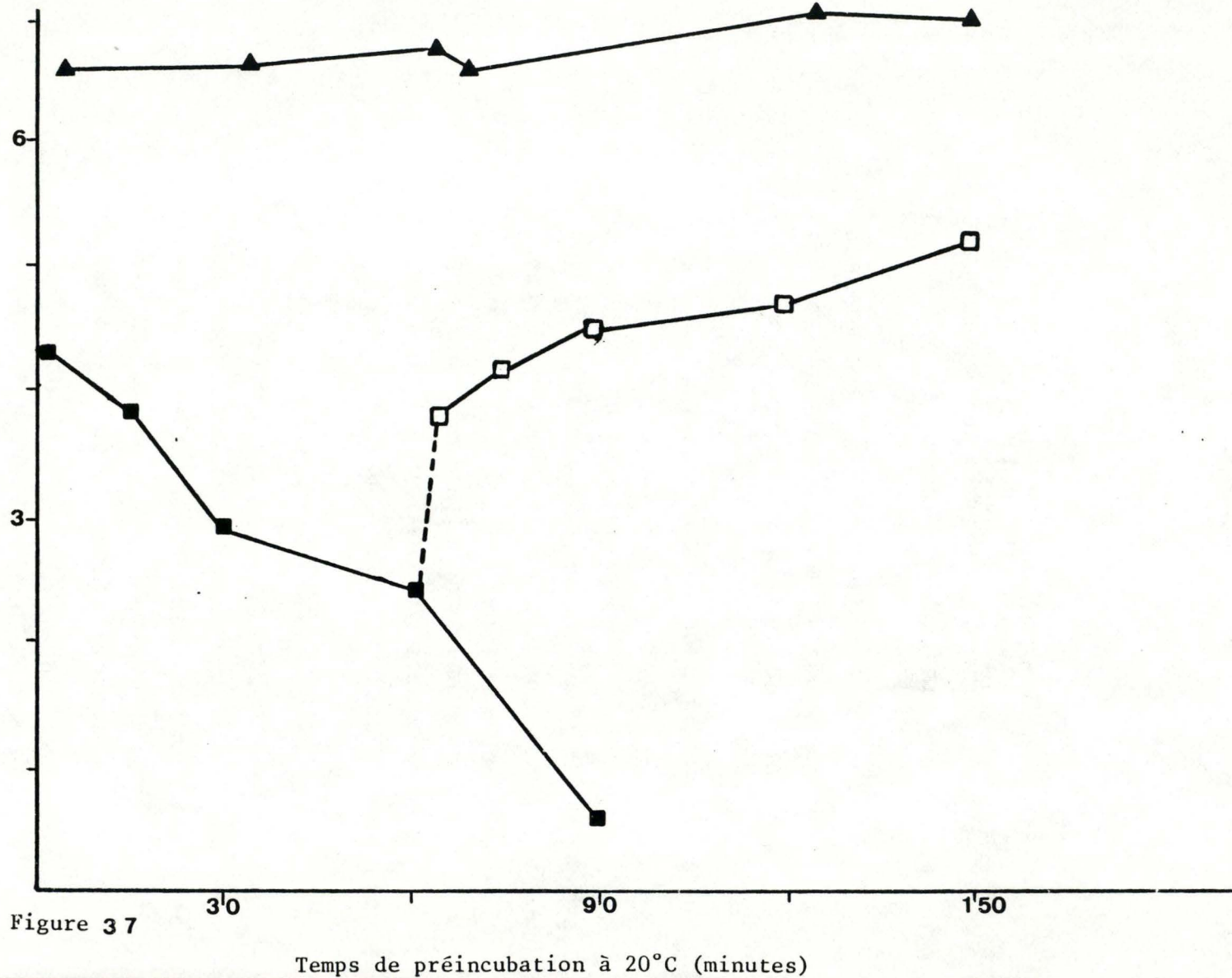


Figure 37

Inactivation (■) en présence de glucose 1% et réactivation (□) en présence de NaF 0,1M ,ATP 5mM ,MgCl₂ 5mM et cAMP 0,5 mM,d'un extrait (1500g) d'épiderme et de tissu conjonctif sous-épidermique.

c) Spécificité de la mesure de la phosphorylase active

Afin de montrer que nous dosons spécifiquement la forme active, nous avons cherché à réaliser in vitro l'interconversion des formes de la phosphorylase. Nous verrons que l'activité de la phosphorylase totale a + b restera constante tandis que celui de la forme a variera suivant le degré d'activation de l'enzyme.

L'activation et l'inactivation de la phosphorylase est réalisée in vitro par la préincubation à 20° C de l'extrait dilué deux fois. A cet extrait nous avons ajouté des effecteurs favorisant l'action des phosphatases (glucose 1 %) ou celle des kinases (ATP 5mM ; $MgCl_2$ 5mM ; AMPc 0,5 mM). Lors de l'activation par les kinases, nous avons ajouté en plus du NaF 100 mM final pour inhiber les phosphatases. Au cours d'une préincubation des échantillons prélevés à différents moments servent à mesurer l'activité de tout l'enzyme (a + b) et de sa forme active (a). La figure 37 nous montre que la phosphorylase peut être activée en présence d'ATP, de magnésium et d'AMPc. Elle peut être inactivée en glucose 1 %. Ces résultats indiquent que ce que mesurons reflète ce qui se passe in vivo.

2.1.3 Préparation des réactifs :

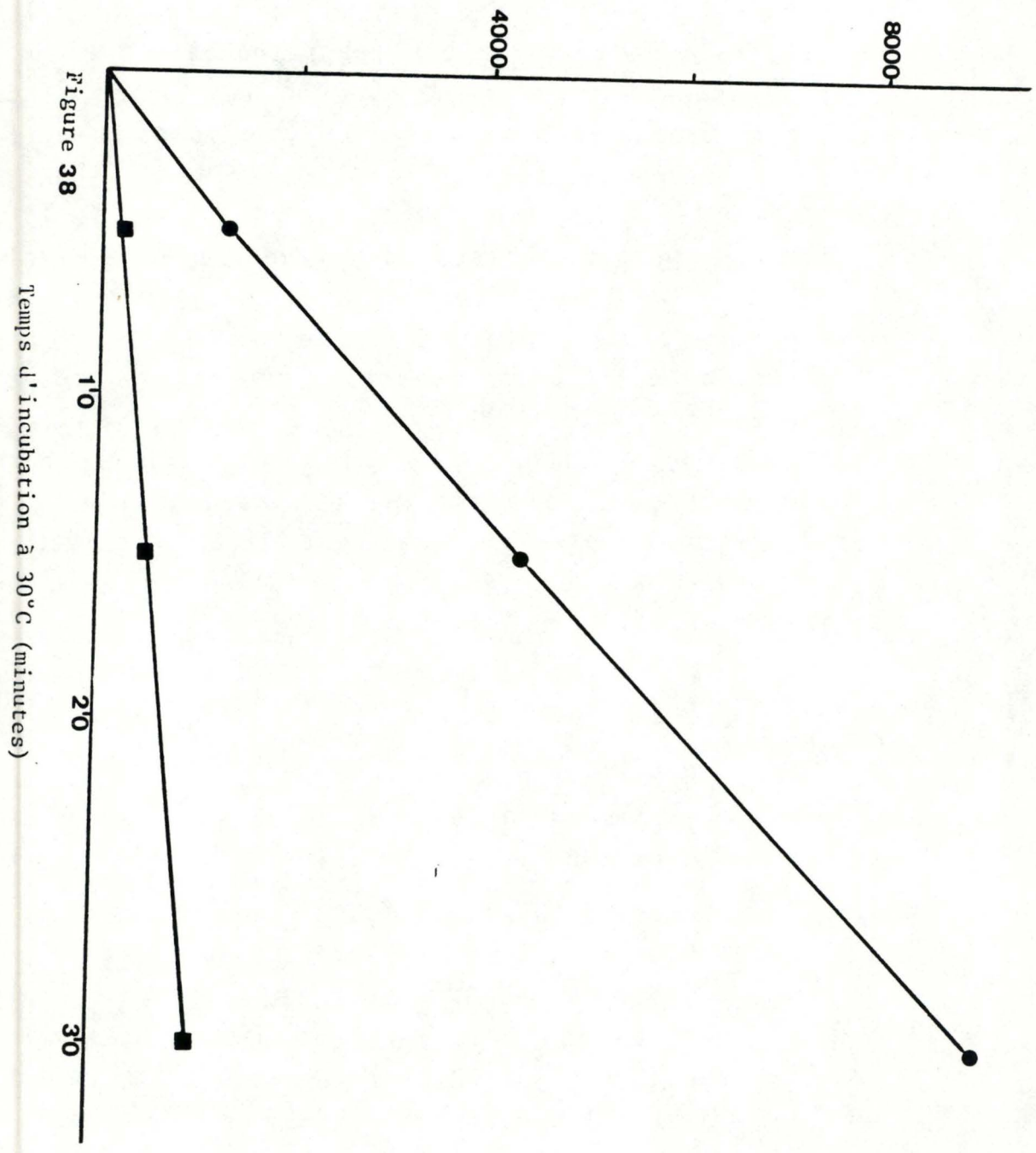
. Préparation du MAA

On dissout 1,25 gr de molybdate d'ammonium dans 500 ml de H_2SO_4 (5 V)

. Préparation de l'AANS

Pour un volume de 500 ml, on prépare une solution de $Na_2S_2O_5$ dont la concentration sera 15%, à laquelle on ajoute 1,25 gr de $C_{10}H_9NO_4S$ et 12,5 ml de Na_2SO_3 20%. Le tout est mélangé et légèrement chauffé jusqu'à obtention d'une solution claire qui est ensuite filtrée.

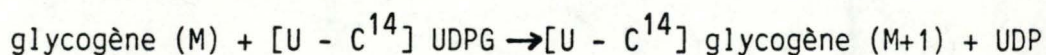
Activité de la synthase totale (●) et de la synthase a (■) en η môles par g. de tissu.



2.2 La_glycogène-synthase

2.2.1 Principe_de_la_réaction :

La glycogène-synthase ou uridine diphosphoglucose glycogène transglucosidase se mesure par la quantité de glucosyle incorporé au glycogène à partir d'uridine diphosphoglucose dont le glucosyl est au C¹⁴ ([U - C¹⁴] UDPG). La mesure de la radioactivité du glycogène permet de calculer le nombre d'unités glucosyles incorporées par unité de temps, ce qui correspond à l'activité de la synthase (THOMAS et al , 1968).



2.2.2 Mode_opératoire :

a) L'activité de la synthase totale (a+b) est mesurée par l'incubation à 30° C de 20 µl d'extrait avec 80 µl d'un milieu contenant de l'UDPG 5mM, de l'[U-C¹⁴] UDPG (20.000 cpm par 90 µl de milieu), du glycogène 0,75 %, de l'EDTA 3,6 mM, neutralisé à pH7; du Tris-HCl 25 mM pH 7,8 et du G 6-P 5 mM dans le volume final.

La mesure de l'activité de la synthase a est réali-réalisée de la même manière que pour la synthase totale (a + b) si ce n'est que le substrat est dépourvu du G 6-P qui est un activateur de la synthase b et contient par contre du Na₂SO₄ 10 mM qui inhibe relativement la forme b de l'enzyme (DE WULF et al , 1968). La réaction est arrêtée après un certain temps d'incubation par le prélèvement de 75 µl du milieu réactionnel qui sont déposés sur un papier WHATMAN ET 31 (2 x 2 cm).

Unités de synthase mesurées à 30°C soit en présence de glucose 6-P (●)
soit en présence de Na₂SO₄ 10mM (■)

(μmôles/min./g.de tissu)

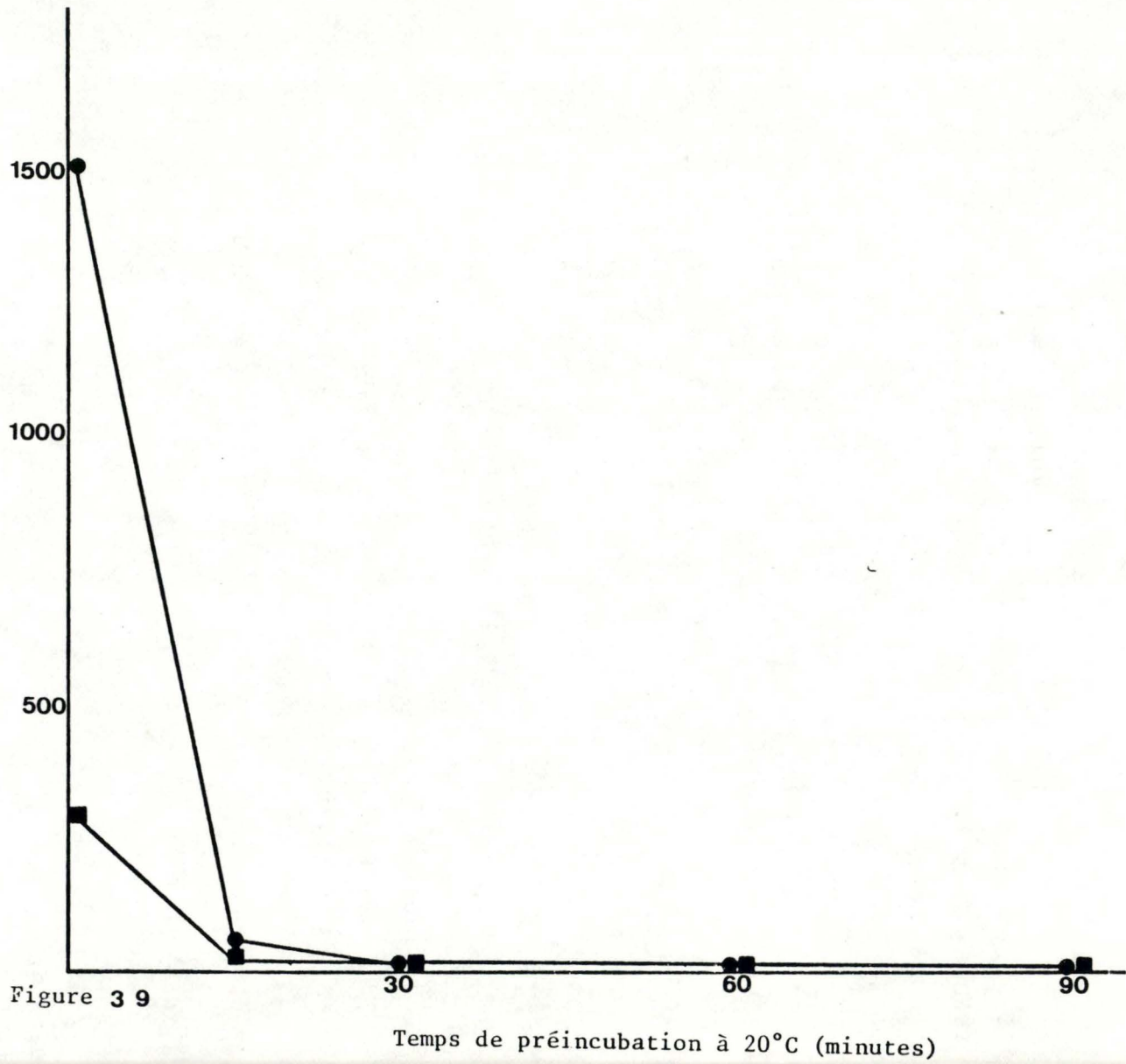


Figure 3 9

Temps de préincubation à 20°C (minutes)

Effet de la préincubation sur l'activité de la synthase d'un extrait (1500 g) d'épiderme et de tissu conjonctif sous-épidermique.

Les papiers sont immédiatement plongés dans une solution glacée contenant 66 % d'alcool dénaturé, puis ils subissent un lavage à froid et deux lavages à température ambiante, de 15 minutes chacun dans la même solution agitée par un barreau magnétique. Après cela, ils sont déshydratés par passage dans l'acétone et séchés. Au terme de ces opérations ils sont placés dans des fioles avec 4 ml de liquide scintillant pour solide (Aqualuma) et le comptage des coups émis par les rayons β du C^{14} se fait au compteur à scintillation ((BECKMAN LS 8000) pendant dix minutes.

Une milliunité de synthase est la quantité d'enzyme qui incorpore au glycogène 1 nanomôle de glycosyle de l'UDPG par unité de temps et dans les conditions décrites (P. NOEL, 1985). Dans ces conditions, nous avons pu mesurer linéairement dans le temps l'activité de la forme a et celle de l'enzyme total (a + b).

b) spécificité de la mesure de la forme active

Pour vérifier si nous mesurons sélectivement l'activité de la forme active, nous avons essayé de suivre in vitro les interconversions de l'enzyme.

Pour désactiver la forme active ainsi que pour réactiver l'enzyme b, nous avons préincubé un extrait à 20° C en présence d'effecteurs de kinases (désactivation) ou de phosphatase (activation) : la désactivation en présence d'ATP 5mM, de $MgCl_2$ 5 mM, d'AMPC et de NaF 100 mM (inhibiteur de phosphatase) et l'activation en présence de glucose 1 % et de l'EDTA (inhibiteur de kinases). Des échantillons destinés au dosage de la forme a ou de l'enzyme

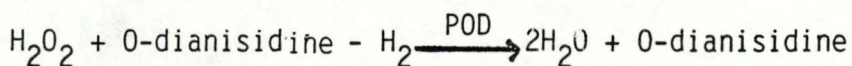
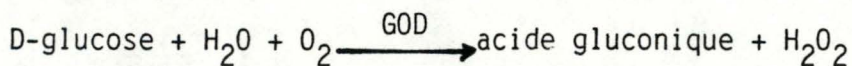
me totale (a + b) ont été prélevés à différents moments de la préincubation. La figure 39 montre qu'il y a en une perte totale d'activité après 15 minutes de préincubation à 20° C. Il semble que l'enzyme ne soit pas stable dans ces conditions. Nous n'avons donc pas de preuves directes quant à la sélectivité du dosage de la forme a. Les résultats obtenus dans l'étude de la variation du pourcentage de la forme active par rapport à la forme totale (a + b) au cours du cycle de mue montrent cependant des variations significatives. Ce problème est abordé dans le chapitre discutant des résultats.

3. Dosage des métabolites

3.1 Dosage du D-glucose par la méthode de la glucose oxydase

3.1.1 Principe du dosage :

En milieux aqueux, la glucose-oxydase catalyse la réaction d'oxydation du D-glucose en acide D-gluconique. Le peroxyde d'hydrogène formé lors de cette réaction oxyde, en présence de la peroxydase, une substance qui, à l'état oxydé présente un maximum d'absorbance à 450 nm. Ceci peut être résumé comme suit :



état réduit
= INCOLORE

état oxydé
= MAXIMUM D'ABSORBANCE
à 450 nm

Dans ces conditions, il apparaît que l'absorbance est proportionnelle à la quantité de D-glucose contenue dans chaque tube, pour autant que celle-ci ne dépasse pas 40 µgr.

3.1.2 Réactifs :

. Etalon glucose (1 mgr/100 ml) dans de l'eau bidistillée

D-Glucose (MERCK, Art. 8342)

Mixture POD-GOD-OD

. GOD : glucose oxydase 20 mgr
(BOEHRINGER, Art. 127019)

POD : peroxydase 5 mgr
(BOEHRINGER, Art. 128066)

OD : O-Dianisidine 6 mgr
(SIGMA D - 3127)

Tampon Tris-HCl M pH8 2,5 ml

La mixture est portée à 100 ml avec de l'eau distillée.

3.1.3 Mode opératoire :

Nous travaillons avec un extrait. Il faut tout d'abord le déprotéiniser. En effet, les protéines provoquent une turbidité gênant les lectures photométriques. Elles peuvent également interférer directement avec la réaction chromogène. La déprotéinisation est réalisée par l'addition successive de sulfate de zinc puis de $Ba(OH)_2$ qui provoquent la précipitation des protéines. Le rapport entre les deux substances doit être tel que le pH soit neutre et leurs quantités suffisante, pour précipiter toutes les protéines.

Le dosage se fait sur 0,5 ml d'extrait (1/1) déprotéinisé. A chaque tube, 2,5 ml de mixture oxydase-peroxydase-dianisidine sont ajoutés.

Le mélange réalisé de cette façon est placé pendant 30 minutes à 37° C (bain thermostaté), délai au bout duquel la réaction est complète.

Après cela, l'absorbance du contenu de chaque tube est lue à 450 nm (Spectrophotométrie PYE URICAM, modèle SPG-550).

3.2 Dosage du glycogène

3.2.1 Principe du dosage :

L'hydrolyse du glycogène en D-Glucose est réalisée par l'amyloglucosidase, enzyme actif à pH acide et le glucose est ensuite dosé par la méthode de la glucose oxydase.

Par cette méthode, on dose donc le glucose, celui qui est initialement présent dans l'échantillon comme celui provenant de l'hydrolyse du glycogène suite à l'action de l'amylase.

On soustrait de la valeur en D-glucose obtenue après hydrolyse celle obtenue lors du dosage sans hydrolyse préalable en D-glucose pour connaître la quantité de glycogène en solution.

3.2.2 Réactifs :

- . Amyloglucosidase (BOEHRINGER, 102849)
Tampon acétate de Na 20 mM pH 4,5
Solution d'amyloglucosidase : 1 mg/ 5ml
- . Etalon glycogène (1 %) (MERCK, art. 4202)
- . Réactifs utilisés lors du dosage du glucose

3.2.3 Mode opératoire :

0,5 ml d'un extrait déprotéinisé est mis en présence 0,1 ml d'amyloglucosidase et l'ensemble est incubé 60 minutes à 37° C, ce qui suffit largement à l'hydrolyse complète du glycogène. Après cela, nous ajoutons 2,5 ml du réactif glucosidase-peroxydase-O-dianizidase que nous mettons à incuber 30 minutes à 37° C. Ensuite, la mesure de l'extinction est réalisée à 420 nm.

3.3. Dosage des sucres réducteurs :

3.3.1 Dosage des sucres réducteurs :

Le dosage des sucres réducteurs se fait avec de l'anthrone. En présence d'acide sulfurique concentré, ceux-ci forment des cycles furfural qui se condensent avec l'anthrone pour donner un complexe vert foncé.

3.3.2 Préparation du réactif de l'anthrone :

On ajoute à 30 ml d'eau distillée 120 mgr d'anthrone. 60 ml d' H_2SO_4 concentré (36 N) sont ajoutés à cette suspension, ce qui a pour effet de solubiliser l'anthrone. Ce réactif n'est stable qu'une semaine environ.

3.3.3 Mode opératoire :

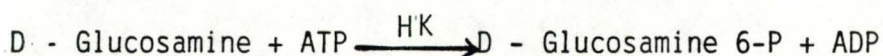
Le dosage des sucres réducteurs se fait sur 1 ml d'extrait déprotéinisé. On lui ajoute 2 ml d' H_2SO_4 concentré (36 N), puis 2 ml de réactif à l'anthrone et on laisse incuber le tout 10 minutes à 100° C. On mesure l'extinction au spectrophotomètre à 620 nm. Dans de telles conditions, il

apparaît qu'elle est proportionnelle à la quantité de sucres réducteurs pour autant que celle-ci ne dépasse pas 200 gr. L'étalon correspond à 100 μ gr de saccharose mesurés dans les mêmes conditions.

3.4 Dosage de la glucosamine

3.4.1 Principe :

La D-glucosamine est phosphorylée par l'adénosine triphosphate en présence d'une hexokinase (D-Hexose-6-phosphotransferase). La glucosamine 6-P formée est alors éliminée par précipitation en présence de $Ba(OH)_2$ et de $ZnSO_4$. Le contenu en glucosamine de l'échantillon est déterminé en comparant le contenu en sucres aminés avant et après le traitement décrit ci-dessous.



3.4.2 Réactifs :

- . Tampon Tris-HCl (0,20 M, pH 80)
- . $MgCl_2$; KOH (1N) ; ATP (0,1 M pH 6,9) ; Na_2CO_3 (0,25 M)
- . D Glucosamine (mM)
- . P-Diméthylaminobenzaldéhyde (PDMAB) :
dissoudre 3,2 gr du réactif dans 120 ml d'éthanol (95 %), ajouter 120 ml d'HCl concentré (12 N) et stocker à 2-5° C pendant 15 jours maximum.
- . 2,4 Pentanedione (acétylacétone) :
mélanger 0,5 ml du réactif avec 25 ml de Na_2CO_3 0,25 M. Préparation extemporanée
- . Hexokinase HK (0,5 mgr/ml) : la dilution est à faire extemporanément.

3.4.3 Mode opératoire :

40 μ l de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,15 N, 30 μ l d'ATP 0,1 M, 50 μ l de MgCl_2 0,25 M, 20 μ l d'enzyme et 60 μ l de ZnSO_4 0,15 N sont ajoutés, dans l'ordre décrit, au premier tube et le précipité qui apparaît est éliminé par centrifugation de 5' à 3000 g. Le surnageant contient, entre autres, la glucosamine à doser.

Le $\text{Ba}(\text{OH})_2$ et le ZnSO_4 ne sont ajoutés au second tube qu'après 40 minutes d'incubation à 30°C en présence des autres réactifs. Cette fois, le surnageant ne contient plus de glucosamine qui a été précipitée sous forme de sel de phosphate.

Après addition de 0,5 ml de pentanedione à 0,6 ml de chaque surnageant puis incubation de 30' à 100°C, le milieu refroidi est porté à 3,5 ml avec de l'eau distillée. 0,5 ml de PDMAB lui sont ajouté et une nouvelle incubation de 30 minutes est réalisée à 37° C cette fois. La lecture de l'extinction au spectrophotomètre se fait à 530 nm. La différence d'extinction entre le premier et le second tube correspond à la glucosamine présente dans l'extrait.

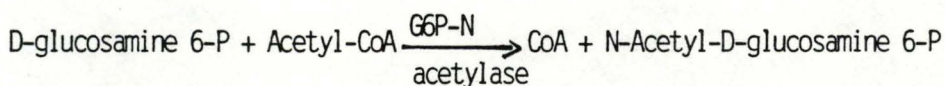
Dans ces conditions, l'extinction est proportionnelle à la quantité de glucosamine pourvu qu'elle ne dépasse pas 500 nmôles. L'étalon est constitué de 0,1 ml de glucosamine mM. Ce test permet de mesurer une différence de 5 nanomôles de glucosamine qui a subi le premier des deux traitements décrits ci-dessus.

3.5 Dosage de la glucosamine 6-P et de l'acétyl-glucosamine 6-P

3.5.1 Principe :

La glucosamine-6-P est acétylée par une G-6P acétylase en présence d'acétyl-CoA. La quantité d'acétyl-glucosamine 6-P est ensuite déterminée colorimétriquement à 585 nm en présence de D-diméthylaminobenzaldehyde (PDMAB)

La différence entre la quantité mesurée après et celle mesurée avant l'acétylation donne la quantité de glucosamine 6-P de l'échantillon tandis que la valeur obtenue sans traitement représente la quantité d'acétylglucosamine 6-P de l'échantillon (David H. BROWN, 1955).



3.5.2 Réactifs :

- . MgCl_2 0,25 M ; CH_3CO_2 0,1 M ; ATP 0,1 M pH 6,9 ; KOH 1,0 N ; HClO_4 (3N)
- . N-acétylglucosamine (mM) (SIGMA A 8625)
- . Tampon Tris 0,2 M pH 8
- . Tampon Borate-Potassium 0,8 M pH 9,2
- . P-diméthylaminobenzaldéhyde :
dissoudre 10 gr de PDMAB dans 90 ml d'acide acétique pur puis y ajouter 10 ml d'HCl concentré (12 N) et mettre à froid (2-5° C) (stabilité d'environ un mois). Mélanger extemporanément 5 ml de cette solution à 45 ml d'acide pur et maintenir à froid.
- . Glucosamine-6-phosphate-N-acétylase (25 mgr protéine/ml). Sa préparation est décrite en 3.6
- . Glutathion (-SH), forme réduite ('GHS)
- . Coenzyme A (-SH), forme réduite

3.5.3 Mode opératoire :

Dans deux tubes contenant 0,5 ml d'extraits et maintenus à froid, sont ajoutés, dans l'ordre indiqué, 0,3 ml de GHS 0,1 M ; 0,2 ml CH_3COOH 10 mM; 0,4 ml de tampon Tris HCl 0,4 M pH8 ; 0,04 ml ATP 0,1 M ; 0,2 ml MgCl_2 0,1 M et 0,25 ml de Coenzyme A 10 mM.

Un des tubes, qui sert de contrôle, reçoit 0,25 ml d'enzyme et 50 μl de tampon borate puis est chauffé pendant 4 minutes à 100° C. L'autre tube est incubé 45 minutes à 37° C avant l'addition de tampon borate et le chauffage à 100° C.

Après addition de 1,5 ml de PDMAB à chaque tube, ils sont incubés à 37° C pendant 35 minutes. La lecture de l'extinction se fait à 585 nm. Dans ces conditions, elle est proportionnelle à la quantité d'acétylglucosamine présente, pourvu qu'elle ne dépasse pas 200 $\mu\text{môles}$.

3.6 Isolation de la glucosamine-6-phosphate-N-acétylose

3.6.1 Solutions à préparer :

- . K_2HPO_4 (0,1 M)
- . Protamine sulfate (2 %)
dissoudre 0,4 gr de la protamine sulfate dans 20 ml d'eau distillée. La dissolution ne sera partielle et il ne faudra garder que la solution filtrée
- . EDTA (2 mM)

3.6.2 Mode opératoire

Une solution contenant 1 gr de levure fraîche par ml de K_2HPO_4 0,1 M est soniquée à froid pendant 30 minutes à 15 Kcycles. et 0,6° d'amplitude. Les débris membrannaires et les noyaux sont éliminés par centrifugation à froid pendant 30 minutes à 10.000 g. Le surnageant obtenu est centrifugé 70 minutes à 100.000 g.

On récupère un surnageant clair contenant l'enzyme et on lui ajoute de la protamine sulfate (0,8 ml par 10 ml de SN). Le tout est laissé 30 minutes à froid puis centrifugé à 10.000 g pendant 30 minutes. Le surnageant est dialysé à froid pendant 18 heures contre une solution d'EDTA (2 mM). Passé ce délai, si le contenu du sac est trouble, il faut le centrifuger à 10.000 g. Sinon, on le congèle directement en petites portions. Cette préparation est stable plus d'un an. Elle contient 11 à 27 mgr de protéine par ml et l'enzyme a une activité de 40 mU par gr de protéine, à 37° C. L'activité de l'enzyme (définie comme la quantité en millimôle d'acétylglucosamine 6-P formée par unité de temps) est de 40 m Unités/gr

3.7 Dosage des protéines

3.7.1 Principe du dosage :

La méthode utilisée dérive de celle décrite par LOWRY (1951). Les protéines digérées par l'action du NaOH sont mises en présence d'une faible quantité de cuivre (Cu^{++}) en milieu alcalin

additionné de tartrate sodicopotassique. De telles conditions gardent le Cu^{++} en solution et permettent la formation d'un complexe Cu^{++} - liaisons peptidiques. Lorsqu'on ajoute le réactif de FOLIN-CIOCALTEU, le complexe phosphomolybdique phosphotungstique de celui-ci est réduit par les unités tyrosine et tryptophane (acides aminés aromatiques) de la protéine et une coloration bleue apparaît.

3.7.2 Réactifs :

. Mixture alcaline du cuivre

Na_2CO_3 2% dans de l'eau distillée	100 ml
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 1 %	1 ml
$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2 %	1 ml

. réactif de FOLIN-CIOCALTEU (UCD, 3283)

. étalon sérum albumine Bovine (SAB) (MERCK, Art.12018)

3.7.3 Mode opératoire :

Le dosage se fait sur 0,5 ml d'homogénat 1/10 dilué deux cents fois. On lui ajoute 0,5 ml de NaOH (1 N) et ensuite 2,5 ml de la solution alcaline de CuSO_4 . Il est alors laissé sur table pendant 10 minutes. Après ce laps de temps, du réactif de FOLIN y est vigoureusement mélangé. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, chaque tube est lu au spectrophotomètre à 600 nm. La relation entre l'extinction et la concentration en protéines est linéaire pour une quantité de protéines comprise entre 0 et 100 μgr .

BIBLIOGRAPHIE

. ADELUNG, D. (1969)

Die Ausschüttung und Funktion von Häutungshormonen während eines Zwischenhäutungs-Intervalls bei der Strandkrabbe Carcinus maenas L.

Z.Naturf., 24b, 1447-1455.

. ALIKHAN, M.A. (1972)

Changes in the hépatopancréas métabolic réserves of Porcellio laevis Latreille: effect of âge and imposed fasting.

Comp.Biochem.Physiol., 539-548.

. ANDRIEUX, N. (1974)

Action de l'ecdysterone sur les phénomènes de mue des crabes Carcinus maenas sains et parasités par Sacculina carcini.

C.R.Acad.Sc., Paris, t279, 807-810.

. APPELMAN, M.N.; BIRNBAUMER, L.; TORRES, H.N. (1966)

Factors affecting the activity of muscle glycogeno-synthase. III: the reaction with the adenosine triphosphate, Mg^{++} , and cyclic 3'5'adenosine monophosphate.

Arch.Biophys.Biochem., 116, 39-43.

. BAUCHAU, A.G.; de BROUWER, M.B. (1972)

Ultra structure des hémocytes d'Ericher sinensis H.M.EDW. Crustacé Décapode Brachyoure.

J.Microsc., 15, 171-179.

.BAUCHAU, A.G.; PLAQUET, E. (1973)

Variation du nombre d'hémocytes chez les Crustacés
Brachyours.
Crustaceana, 14, part. 2

.BAUCHAU, A.G.; MENGEOT, J.C. (1978)

Structure et fonction des hémocytes chez les Crustacés
Arch.Zool.Exp.Gén., 119, 227-248.

.BAZIN, F. (1976)

Mise en évidence des caractères des glandes stéroïdogènes
des glandes mandibulaires et des glandes Y du crabes
Carcinus maenas (L.) normal et épédonculé.
C.R.Acad.Sci., PARIS, 282, 739-741.

.BLANCHET, M.F. (1974)

Etude du contrôle hormonal du cycle d'intermue et de
l'exuviation chez Orchestia gammarella par microcautérisation
des organes Y suivie d'injection d'ecdysterone.
C.R.Acad.Sc., PARIS, 278, 509-512.

.BROWN, D.H. (1951)

The phosphorylation of D-(+)-glucosamine by cristalline
yeast hexokinase.
Biochem.Biophys.Act., 7, 487-493.

.BUSBY, J.W. (1976)

Regulation of the glycogen phosphorylase system from physical
measurment to biological speculations.
Current Topics in Cellular Regulation, 10, 89-160.

.BUNT, A.H. (1967)

Ultra structure of the sinus gland of the crayfish procombarus
clarkii.
Gen.Comp.Endocrinol., 9, 334_342.

- .CANDY,D.J.;KILBY,B.A. (1962)
Studies on chitin synthesis in the desert locust.
J.Exp.Biol.,39,129-140.
- .CANTINIAUX-FONTAINE,M.Th. (1983)
Recherche sur la pheromone sexuelle et le comportement reproducteur de Carcinus maenas (L.).
Thèse de doctorat,F.N.D.P.
- .CAREY,F.G. (1965)
Chitin synthesis in vitro by crustacean enzymes.
Comp.Biochem.Physiol.,16,155 -158.
- .CHARMENTIER,G. (1980)
Aspects préliminaires des variations hémolymphatiques du taux d'ecdysteroïdes chez Pachygrapsus marmoratus (Crustacé Décapode):influence de la régénération intensive et de l'ablation des organes Y.
Bull.Soc.Zool.Fr.,105,81-86.
- . CHARNIAUX-COTTON (1971)
Contrôle du déclenchement et de la durée de la période D Du cycle d'intermue par l'ecdysterone, chez le crustacé Amphypode Orchestia gammarella(Pallas);interaction avec La vitellogenèse.
C.R.Acad.Sc.PARIS,t272,68-71.
- .CLARKE,R.U. (1973)
"The Biology of Arthropoda" E.Arnolds,Ed.
- .DENEL,R. (19475)
The occurrence and significance of phenolic hardening in the newly formed cuticle of Crustacea Decapoda.
Proc.R.Soc.LONDON,Ser.b134,485-503.

.DENNEL, R.; MALEK, S. R. A. (1956)

The cuticle of cockroach Periplaneta americana
V. The chemical resistance of the impregnating material
of the cuticle, and "self-tanning" of its protein component.
Proc. R. Soc. LONDON, Ser. b144, 545-556.

.De WULF, M.; STALMANS, W. (1968)

The Influence of Inorganic Phosphate, ADP, and Glucose-6-P
on the Activity of Liver Glycogen Synthase.
Eur. J. Biochem., 6, 545-551.

.De WULF, M.; STALMANS, W. (1970)

The Effect of Glucose and of a Treatment by Glucocorticoids
on the Activation in vitro of Liver Glycogen Synthase.
Eur. J. Biochem., 15, 168

.DIGBY, P. S. B. (1980)

Calcification in crustacean cuticle: the fundamental process.
Physiologist., 23, 105.

.DOMBRADI, V. (1981)

Structural aspects of the catalytic and regulatory function
of glycogen phosphorylase.
Int. J. Biochem., 13, 125-139.

.DOMBRADI, V. (1986)

Regulation of glycogen phosphorylase in Drosophyla melanogaster
by reversible phosphorylation-dephosphorylation.
Insect. Biochem., 16, (n°3), 557-565.

.DRACH, P. (1939)

Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes.
Ann. Inst. Oceanogr., 19, 103-191.

.ECHALIER, G. (1956)

Rôle de l'organe Y dans le déterminisme de la mue de Carcinus
maenas, (L.) Crustacé Décapoda.
C. R. Acad. PARIS, 240, 1581-1584.

- .ECHALIER,G. (1959)
L'organe Y et le déterminisme de la croissance et de la mue
chez Carcinus maenas (L.),Crustacé Décapode.
Ann.Sci.Zool.Ser.12,1,1-59.
- .ECHALIER,G. (1954)
Recherches expérimentales sur le rôle de l'organe ,dans la
mue de Carcinus maenas (L.),Crustacé Décapode.
C.R.Acad.Sc.PARIS,238,523-528.
- .FAUX,A.;HORN,D.H.S. (1968)
Molting hormones of crab during ecdysis.
Chem.Commun.,175-176.
- .FOURNEAU,M. (1986)
Caractérisation de l'hémolymphe et des hémocytes comme
transporteurs de matériau et d'énergie au cours de la mue.
Mémoire en Sciences Zoologiques ,F.N.D.P.
- .FRIEDMAN,S. (1978)
Trehalose regulation,on aspect of homeostasis.
Ann.Rev.Entomol.,23,389-407.
- .FOSTER,A.B.;WEBBER,J.M. (1960)
Chitin.
Adv.Carbohydr.Chem.,15,371-393.
- .GABE,M. (1953)
Sur l'existence,chez quelques Crustacés Malacostracés,
d'un organe comparable à la glande de mue des insectes.
C.R.Acad.Sci.PARIS,d237,1111-1115.
- .GHARAGOSLOU-Van GINEKEN,I.D.;BOULIGAND,Y. (1975)
Studies of the fine structure of the cuticle of
Porcellidium Crustacea Copepoda.
Cell.Tissue Res.,159,339-412.

- .GIBSON, R. (1979)
The decapode hepatopancreas.
Oceanogr. Marr. Biol. Ann. Rev., 17, 285-346.
- .GRAF, F. (1978)
Les sources de calcium pour les crustacés venant de mer.
Arch. Zool. Exp. Gen., 19, 143-161.
- .GREEN, J.P.; NEFF, M.R. (1972)
A survey of The fine structure of the integument of fiddler crab.
Tissue Cell., 4, 137-171.
- .GREENAWAY, P. (1983)
Uptake of calcium at the postmoe stage by the marine crabs
Callinectes sapidus and Carcinus maenas.
Comp. Biochem. Biophys., 75a, (n°2), 181-184.
- .GWIN, J.F.; STEVENSON, J.R. (1973)
Rôle of acetylglucosamine in chitin synthesis un crayfish.
I: correlation of ¹⁴C-acetylglucosamine incorporation with stages
of the moulting cycle.
Comp. Biochem. Physiol., 45, 769-776.
- .HACKMAN, R.H.; GOLDBERG, M. (1974)
Light-scattering and infrared-spectrophotometric
studies of chitin and chitin derivaties.
Carbohyd. Res., 38, 35_45.
- .HANSTROM, B. (1931)
"HORMONES IN INVERTEBRATES", 198, Oxford univ.
- .HEATH, J.R. (197)
Some changes in biochemical composition with season and
during moulting cycle of the common shore crab Carcinus maenas(L.).
J. Exp. Bilo. Ecol., 5, 193-233.

.HEDAHL, T.; and AL. (19 ?)

The structure and mineralization of the carapace of the crab
Cancer pagurus (L.). I: the endocuticle.
Zool. Scr., 6, 89-99.

.HERS, H.G. (1976)

The control of glycogen metabolism in the liver.
Ann. Rev. Biochem., vol. 45.

.HOCHACHKA, T. (1962)

The effects of temperature acclimatation on pathways of
glucose metabolism in the trout.
Can. Zool. J., 40, 261-270.

.HOCHACHKA, T.; FREED, J.M.; SOMERO, G.N.; POSSER, C.L. (1978)

Control sites in glycolysis of crustacean muscle.
Int. J. Biochem., 2, 125-130.

.HUBERT, M.; CHASSARD-BOUCHAU, C. (1978)

Quelques aspects de la physiologie des crustacés décapodes
étudiés en fonction des sates du cycle d'intermue. Micro-
analyse en microscopie électronique.
Arch. Zool. Exp. Gen., 119, 283-296.

.HUBIN, M.L. (1985)

Influence d'un type d'alimentation (riz complet),
du jeûne et de la temperature sur les proteines, lipides et
glucides de l'ecrevisse A. astacus.
Mémoire en Sciences Zoologiques, F.N.D.P.

.JAROS, P.P (1978)

Tracing of neurosecretory neurons in crayfish optic ganglia
by cobalt iontophoresis.
Cell. Tissue Res., 194, 297-302.

- .JEUNIAUX,C. (1983)
"Chitin and chitinolysis" .Masson,Paris
- . JONSHON,P.T. (1980)
"Histology of the blue crab Callinectes sapidus.
A model for the decapode".
Praeger Publishers CBS Educatinal and Professionnal Publishing.
- .JOHNSTON,M.A.;DAVIES,P.S. (1971)
Possible hepatic function for crustacean blood cells.
Nature,230,471-472.
- .JOHNSTON,M.A. (1972)
Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues
of Carcinus maenas.
Comp.Biochem.Physiol.,41b,433-443.
- .JOHNSTON,M.A. and AL. (19735
Cytology of carcinus hemocytes and their function
in carbohydrate metab .lism.
- .KLEINHOLZ,L.H. (1985)
Biochemistry of crustacean hormones
The Biology of Crustacea,vol.9,513-521.
- .KANNUPANDI,T. (1976c)
A study on the cuticle of Stegoalpheon kempi
Isopoda Crustacea in relation to its parasitic mode of live.
J.Exp.Marr.Bill.Ecol.,25,87-97.
- .LANG,R. (1971)
Chitinsythese bei dem flusskrebs Orconectes limosus
Aktivitat der Phosphoglucosamin-isomerase und Einbau von
Glucose-U-C¹⁴ into bound carbohydrate.
Z.Vergl.Physiol.,73,305-316.

- .LOCKE, M (1964)
The structure and formation of the integument in insects.
In "The Physiology of Insecta", vol.3, 380, 470.
- .LORET, S. (1982)
Effet de la température sur le nombre d'hémocytes, la
protéïnémie et le métabolisme des hydrates de carbone
chez le homard Homarus americanus (H. Milne-Edwards)
Mémoire en Sciences Zoologiques, F.N.D.P.
- .MARREC, (1944)
L'organe lymphocytogène des Crustacés Décapodes, son activité
cyclique.
Bull. Inst. Oceanogr., 41, 1-4.
- .MEENAKSHI, V.R.; SCHEER, B.T. (1961)
Metabolism of glucose in the crab Cancer Pagurus and
Hemigrapsus nudus.
Comp. Biochem. Physiol., 3, 30-41.
- .NEVILLE, A.C. (1970)
Cuticle ultrastructure in relation to the whole insect.
Symp. R. Entomol. Soc. LONDON, 5, 17-39.
- .NEVILLE, A.C. (1975)
"Biology of the Arthropode Cuticle".
Springer-Verlag, BERLIN and NEW-YORK.
- .PAHLIC, M.; STEVENSON, J. (1978)
Glucosamine-6-P synthesis in the epidermis.
Comp. Biochem. Physiol., 66b, 282-285.
- .PASSANO, L.M. (1952)
Neurosecretory control of moulting in crabs by the
organe X sinus gland complex.
Physiol. Comp. Ecol., 3, 155-189.

.PAVATHY, K. (1972)

Endocrin regulation of carbohydrate metabolism during the moult cycle in crustacean. I: effect of eyestalk removal in Ocypoda platytarsis.

Mar. Biol., 14, 58-62.

.RAMAMURTHI, R. (1968)

Endocrine control of glycogen synthesis in crabs.

Comp. Biochem. Physiol., 26, 311-319.

.RICHARDS, A.G.; RICHARDS, P.A. (1976)

Origin and composition of the peritrophic membrane of the mosquito Aedes aegyptii.

J. Insect. Physiol., 17, 2253-2275.

.RIEDER, N. (1977)

Ultrastruktur und Funktion Hautdrüsen von Triops cancriformis box (Crustacea nostraca)

Zoomorphologie, 88, 133-143.

.ROSS STEVENSON, J. (1967)

Metecdysial moult staging and changes in the cuticle in the crayfish Orconectes sanborni.

Crustaceana, 14, 170-177.

.ROSS STEVENSON, J. (1985)

Dynamics of the integument.

In "The Biology of Crustacea, vol. 9, 49-129.

.RUDALL, K.M. (1967)

Conformation in chitin-protein complexes.

In "Conformation of Biopolymers", vol. 2, 751-765.

.RYMAN, E.; WHELAN, W.J. (1971)

New aspect of glycogen metabolism.

Adv. Enzymol., 34, 286-444.

- .SANTIAGO,A. (1974)
Kinetics of Glycogen Phosphorylase a from the Muscle
of the Blue Crab Callinectes sapidus .
Arch.Biochem.Biophys.;163,688-698.
- .SANTIAGO,A. (1974)
Purification and Properties of glycogen Phosphorylasea
from the Muscle of the Blue Crab,Callinectes danae .
Arch.Biochem.Biophys.,163,679-687.
- .SCHOWCH,G. (1972)
Studies on the trehalose métabolisme in the crayfish.
Comp.Biochem.Physiol.,43,905-917.
- .SEIFERT,P (1982)
Studies of the sex pheromone of the shore crab Carcinus
maenas,with special regard to ecdysone excretion.
Ophelia,21,147-158.
- .SHYAMASUNDARI,K.;HANUMANTHA RAO,K. (1978)
Studies on the Indian sand lobster Thenus orientalis.
Muccopolysaccharides of the tegumental gland.
Folia Histochem.Cytochem.,16,247-254.
- .SKINNER,D.M. (1962)
The structure and metabolism of crustacean integumentary
tissue during a molt cycle.
Bio.Bull.(Woods Hole,Mass),123,635--(è.
- .SKINNER,D.M. (1985)
Moulting and regeneration.
In "The Biology of Crustacea",vol.9,49-129.
- .SKINNER,D.M. (1985)
Interacting Factors in the Control of Crustacean
Moult Cyvle.
Amer.Zool.,25,275-284.

- .SPECK,U.;URICH;K. (1971)
Quantitative Bedeutung der Reservestoffe für Chitinsynthese
Energiestoffwechsel und Osmotische Vorgänge.Während der
Häutung des flusskrebse Orconectes limosus.
Z.Vergl.Physiology.,71,286-294.
- .STALMANS,W.;De WULF,M. (1971)
The Control of Liver Glycogen Synthase Phosphatase
by Phosphorylase.
Eur.Biochem.,18,582-587.
- .STEVENSON,J.R.;SCHNEIDER,R.P. (1962)
Thyrosinase of activity of organs containing tegumental
glands in the crayfish.
J.Exp.Zool.,150,47-27.
- .STEVENSON,J.R. (1969)
Sclerotizing in the crayfish cuticle.
Comp.Biochem.Physiol.,30,503-508.
- .SUMMERS,N.M. (1967)
Cuticle sclerotization and blood phenol oxydase
in the fiddler crab Ucca pugnax.
Comp.Biochem.Physiol.,23,129-138.
- . TELFORD,M. (1968)
Changes in blood sugar composition during the moult cycle
of the lobster Homarus americanus.
Comp.Biochem.Physiol.,26,917-928
- .TRAVIS,D.F. (1955)
The moulting cycle of the spiny lobster Panulirus argus,
Latreille.II:preecdysial histological and histochemical
changes in the hepatopancreas,and integumental tissues
Bio.Bull.(Woods Hole,Mass),108,88-112.
- .VACCA,L.L.;FINGERMAN,M. (1975)
The mechanism of tanning in the fiddler crab
Ucca pugnax.Part.I:tanning agents and protein carriers
in the blood during ecdysis
Comp.Biochem.Physiol.51,475-482.

.WEIS-FOGH, T. (1970)

Structure and formation of insect cuticle
Symp. R. Entomol. Soc. LONDON, 5, 165-185.

.WILLIAMS, A. J.; LUTZ, P. (1975a)

Blood cell types in Carcinus maenas and their
physiological rôle.

The rôle of the hemolymph in the carbohydrate
metabolism of Carcinus maenas.

J. Mar. Biol. Ass. U.K., 75, 667-674.