

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Bilan glucidique des hémocytes et de l'hémolymphe à différents stades du cycle de mue du *Carcinus maenas* (L.)

Argentin, Didier

*Award date:*  
1987

*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

---

Bilan glucidique des hémocytes  
et de l'hémolymphe à différents  
stades du cycle de mue du Carcinus  
maenas (L.).

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

Argentin Didier

1986-1987

# FACULTES UNIVERSITAIRES N. D. de la PAIX

Faculté des Sciences

Rue de Bruxelles 61, B-5000 NAMUR

Tél. 081-22 90 61 Télex 59222 facnam-b Téléfax 081-23 03 91

## Bilan glucidique des hémocytes et de l'hémolymphe à différents stades du cycle de mue du Carcinus maenas (L.).

ARGENTIN Didier

### Résumé.

Nous avons établi un bilan, à différents stades de mue, des glucides plasmatiques et hémocytaires du Carcinus maenas (L.) au moyen de la technique de chromatographie en couche mince et de dosages enzymatiques. Les résultats apportent des arguments appuyant l'hypothèse de JOHNSTON (1971) qui propose de considérer les hémocytes comme des hépatocytes circulants, c'est-à-dire comme une population de cellules libres, capable d'accumuler, de transporter et de distribuer des matériaux glucidiques selon les besoins des autres tissus et, ce, aux différentes étapes du cycle de mue. Nous mettons de plus en évidence l'intervention de différents disaccharides (maltose, saccharose et tréhalose) dans le processus de la mue. Enfin, nous proposons de considérer l'hémocyte comme un lieu de stockage et éventuellement de synthèse du tréhalose.

### Abstact.

We carried out at definite moult stages a balance of the plasma and hemocytes glucides of Carcinus maenas (L.) by means of thin layer chromatography and enzymatic methods. The results substantiate the hypothesis of JOHNSON (1971) which considers the hemocytes as circulating hepatocytes i.e. as a population of free cells able to accumulate, to transport and to distribute glucidic material in function of the tissues demand at various moult stages. We also put forward the intervention of disaccharides such as maltose, sucrose and trehalose in the moulting process. Finally, we propose to consider the hemocyte as a site of storage and possibly of synthesis of trehalose.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 1987

Département de Biologie

Unité d'Endocrinologie et Hématologie Comparée

Promoteur : **P. DEVOS**

Au terme de ce travail, je tiens à remercier tout particulièrement le Père Devos, promoteur de ce mémoire, pour l'aide constante qu'il m'a prodiguée ainsi que pour ses nombreux conseils.

J'adresse également mes remerciements au Père A. Bauchau ainsi qu'à G. Traush pour leur aide dans l'élaboration de ce mémoire.

J'exprime aussi ma plus vive gratitude à tous les membres de laboratoire pour leur disponibilité de tous les jours.

Enfin, mes remerciements vont également à ma famille pour son soutien constant au cours de cette année.

## Table des matières.

- Orientation du travail
- Liste des abréviations
- Chapitre 1. : Données physiologiques et morphologiques concernant les Crustacés
  - 1.1. Le système circulatoire chez les Crustacés
  - 1.2. L'hémolymphe
  - 1.3. Les hémocytes
    - 1.3.1. Origine et nombre des hémocytes
    - 1.3.2. Classification des hémocytes
    - 1.3.3. Cytochimie des hémocytes
    - 1.3.4. Fonctions des hémocytes
      - 1.3.4.1. La coagulation
      - 1.3.4.2. La phagocytose
      - 1.3.4.3. Encapsulation et mélanisation
      - 1.3.4.4. Mue et vitellogenèse
      - 1.3.4.5. Réserve d'acides aminés libres
      - 1.3.4.6. Fonction d'"hépatocyte circulant"
  - 1.4. La mue
    - 1.4.1. Introduction
    - 1.4.2. Le système tégumentaire
    - 1.4.3. Déroulement de la mue
    - 1.4.4. Contrôle endocrinien
    - 1.4.5. Contrôle de la taille
  - 1.5. Les hydrates de carbone
    - 1.5.1. Introduction
    - 1.5.2. Glucose-glycogène
      - 1.5.2.1. Structures
      - 1.5.2.2. Rôle du glucose
      - 1.5.2.3. Rôle du glycogène
      - 1.5.2.4. Synthèse et dégradation du glycogène
        - a) La glycogène-synthase
        - b) La glycogène-phosphorylase
        - c) La synthase phosphatase
        - d) La phosphorylase phosphatase
        - e) La phosphorylase kinase
        - f) La protéine kinase
        - g) Conclusions

- 1.5.3. Le tréhalose
  - 1.5.3.1. Biosynthèse du tréhalose
  - 1.5.3.2. Rôle du  $\alpha\alpha$ -tréhalose
    - a) comme composant structural
    - b) comme réserve d'énergie supplémentaire
    - c) comme intermédiaire pour la résorption ou le transfert du D-glucose
  - 1.5.3.3. Régulation hormonale de la tréhalosémie
- 1.5.4. Autres saccharides
  - 1.5.4.1. Le fructose
  - 1.5.4.2. Le saccharose
  - 1.5.4.3. Le maltose et les oligosaccharides
- 1.5.5. Régulation de la glycémie
  - 1.5.5.1. Introduction
  - 1.5.5.2. La H.C.G. ( hormone hyperglycémiante )
  - 1.5.5.3. Facteurs internes agissant sur la glycémie
  - 1.5.5.4. Facteurs externes agissant sur la glycémie

## 1.6. Autres types de réserves

- 1.6.1. Les lipides
- 1.6.2. Les protides

## -Chapitre 2. . Matériel et méthodes

### 2.1. Choix du matériel

- 2.1.1. Intérêt de l'étude expérimentale des Crustacés
- 2.1.2. Intérêt de l'étude de l'hémolymphe de Carcinus maenas

### 2.2. Généralités

- 2.2.1. Présentation de l'espèce étudiée
- 2.2.2. Récolte
- 2.2.3. Elevage

### 2.3. Démarche expérimentale générale

- 1. Prélèvement de l'hémolymphe
- 2. Comptage des hémocytes
- 3. Traitement de l'hémolymphe
- 4. Désionisation
- 5. Chromatographie en couche mince ( CCM )
  - 5.1. Principe de la technique
  - 5.2. Réactifs et matériel utilisés pour la CCM
  - 5.3. Mode opératoire

### 6. Dosages

- 6.1. Glucose

6.1.1. Principe

6.1.2. Mode opératoire

6.2. Glycogène

6.3. Sucres réducteurs ou composés d'unités réductrices

6.3.1. Principe du dosage

6.3.2. Préparation du réactif à l'anthrone

6.3.3. Mode opératoire

7. Recherche pratique des stades de mue

-Chapitre 3 : Résultats et discussion

3.1. Chromatographie en couche mince

3.1.1. But de la méthode

3.1.2. Résultats

3.1.2.1. Crabe au stade C3

3.1.2.2. Crabe au stade C4

3.1.2.3. Crabe au stade D3

3.1.3. Conclusion

3.2. Evolution du nombre d'hémocytes au cours du cycle de mue

3.3. Dosages de métabolites

3.3.1. Le glucose

3.3.2. Le glycogène

3.3.3. Le glucose 6P

3.3.4. Le fructose et le fructose 6P

3.3.5. Le maltose et les oligosaccharides

3.3.6. Le saccharose

3.3.7. Le tréhalose

3.3.8. Les sucres totaux

Conclusions

-Bibliographie

## Orientation du travail

Dans le cadre de l'étude du métabolisme énergétique des Crustacés et plus particulièrement du recensement de leurs réserves énergétiques, un travail récent sur les hémocytes montre qu'ils sont capables de glycogénosynthèse et de glycogénolyse ( Fourneau, 1986 ).

Par ailleurs, on connaît encore peu de choses concernant la fonction des dissaccharides dans la constitution et l'utilisation des réserves énergétiques. L'étude du métabolisme du saccharose, du maltose ( et des oligosaccharides ) et du tréhalose n'a que très rarement été envisagée. Ce dernier sucre notamment est prédominant dans l'hémolymphe des insectes, plus particulièrement dans celle des insectes ailés où il fournit de l'énergie pour le vol.

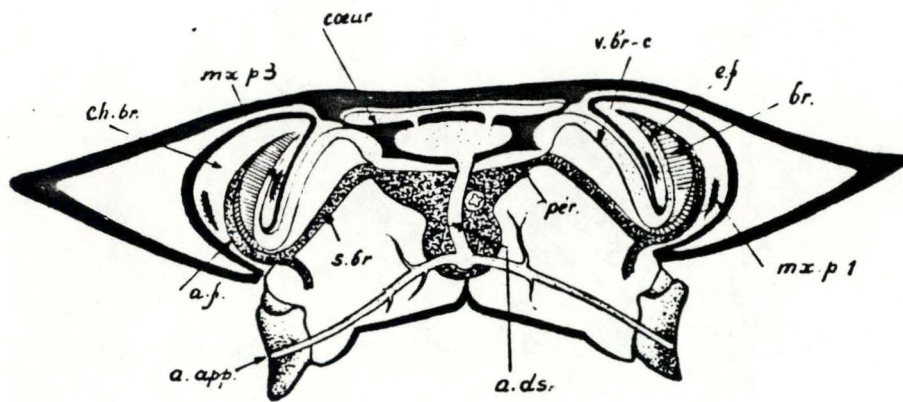
Notre objectif a donc été d'affiner les connaissances existant sur l'hémolymphe comme transporteur d'énergie et ce, chez Carcinus maenas. Nous avons effectué une étude qualitative et quantitative des sucres rencontrés dans l'hémolymphe au moyen de deux techniques conventionnelles adaptées aux conditions rencontrées chez les Crustacés :

- Chromatographie en couche mince ( CCM ).
- Dosages enzymatiques.

L'objectif est donc d'établir un synopsis glucidique de l'hémolymphe et des hémocytes chez Carcinus maenas L. et ce, en relation avec différents stades de mue.

## Liste des abréviations

AMPC	: acide 3', 5'-adénylique cyclique.
ATP	: adénosine-5'-triphosphate.
5'AMP	: adénosine-5'-monophosphate .
CCM	: chromatographie en couche mince.
EDTA	: acide tétraacéptique éthylènediamine.
F6P	: fructose 6P.
G1P	: glucose 1P.
G6P	: glucose 6P.
G6P-DH	: glucose 6 phosphate DHase.
GMPC	: acide 3', 5'-guanylique.
Hc	: hémocytes.
HGH	: hormone hyperglycémiant.
HK	: hexokinase.
HL	: hémolymphe.
5'IMP	: inosine-5'-monophosphatase.
MR	: mobilité relative.
NADP	: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.
PGI	: phosphoglucoisomerase.
Pi	: phosphate inorganique
P.O	: pédoncule oculaire.
RER	: réticulum endoplasmique rugueux.
RES	: réticulum endoplasmique lisse.
SNC	: système nerveux central.
Tris	: tris (hydroxyméthyl) aminoéthane.
UDP	: uridine diphosphate
UDPG	: uridine diphosphoglucose.



Coupe transversale du céphalothorax montrant les chambres branchiales (*ch. br.*), les branchies (*br.*), les épipodites de *mx.p1* et *mx.p3*, le cœur et une paire d'ostioles dorsales, le péricarde (*per.*) et des vaisseaux sanguins.

*s. br.* : sinus branchial afférent; *a. f.* : veine afférente remontant sur la face externe des branchies; *e. f.* : veine efférente menant le sang dans la veine branchio-cardiaque (*v. br.-c.*), qui débouche dans la cavité péricardique. *a. ds.* : artère descendante se ramifiant en artères appendiculaires (*a. app.*).

Fig.1: d'après A.G. Bauchau ( 1966 ).

## Chapitre 1:Données physiologiques et morphologiques concernant les Crustacés.

### 1.1.Le système circulatoire chez les crustacés:

Les Crustacés comme tous les Arthropodes ont un système circulatoire ouvert, c'est-à-dire que le sang quitte les artérioles pour se répandre dans des sinus interviscéraux. Chez les Entomostracés et les Malacostracés inférieurs, le coeur est simplement un long tube avec une paroi musculaire unique et des ostioles latérales allant par paire. Chez les Malacostracés plus évolués, comme par exemple Carcinus maenas L., le coeur se présente sous la forme d'une grande chambre pentagonale située dorsalement dans le thorax au-dessus des organes respiratoires (fig. 1). Il est suspendu dans le péricarde par des ligaments fibreux. Des artères élastiques mais non musculaires quittent le coeur, elles sont munies de valvules empêchant l'hémolymphe de refluer vers la cavité cardiaque. Elles passent à travers la membrane péricardique et déversent l'hémolymphe dans des sinus sanguins après un nombre variable de branchements. Il s'y produit un échange de substances avec les tissus environnants, après quoi l'hémolymphe est drainée par un réseau de veines vers le sinus ventral médian d'où elles pénètrent dans les branchies. Les veines afférentes branchio-cardiaques ramènent l'hémolymphe au péricarde d'où elles pénètrent dans le coeur par trois paires d'ostioles à valvules. Le contrôle des contractions est assuré par un ganglion situé sur la paroi dorsale du coeur (Bauchau, 1966).

### 1.2.L'hémolymphe:

On dénomme le "sang" des Crustacés hémolymphe en raison de leur système circulatoire ouvert. Celle-ci véhicule un nombre variable de cellules sanguines appelées hémocytes et non plus leucocytes comme antérieurement pour éviter toute confusion avec certaines cellules sanguines des Vertébrés. L'hémolymphe véhicule également un pigment respiratoire, l'hémocyanine

**TABLÉAU I**  
**Hémocytes des Crustacés Décapodes**

Type	Forme	Noyau	Ret. Endop.	Ribos libres	Golgi	Granules	Lysos.	Mitoch.	Synonymies probables - Auteurs
HYALIN	Ronde Ovale	Central Rond Large	L	+	-	- ou peu		+	Pale amoeboid cell (HALLIBURTON, 1885) Explosive corpuscule (HARDY, 1892) Hyaline lymphoid cell (GEORGE et NICHOLS, 1948) Lymphoid cell (TONEY, 1958) Gerinnungszellen (STANG-VOSS, 1971)
SEMI-GRANULEUX	Fuseau Ovale	Central Ovale Bilobé	L - R	+	+	++	+	+	Thigmotactic amoebocyte (GEORGE et NICHOLS, 1948) Monocyte (TONEY, 1958) Ovoid or spindle basophil (HEARING et VERNICK, 1967) Gerinnungszellen (STANG-VOSS, 1971) Phagocytyierende amöbocyten (STANG-VOSS, 1971)
GRANULEUX	Ronde Ovale	Excentr. Bilobé Nucléole	L - R	+	+	++++	++	+	Eosinophilic corpuscle (HARDY, 1892) Acidophilic granule cell (GEORGE et NICHOLS, 1948) Explosive refractile granulocyte (TONEY, 1958) Ovoid or Spindular basophil, Eosinophil (HEARING et VERNICK, 1967) Granulären amöbocyten (STANG-VOSS, 1971)
LIPO-PROTEINIQUE	Ovale Ronde	Excentr. Aplati				+		+	SEWELL, 1955.

Fig.2 : d'après A.G. Bauchau et J.C. Mengeot.

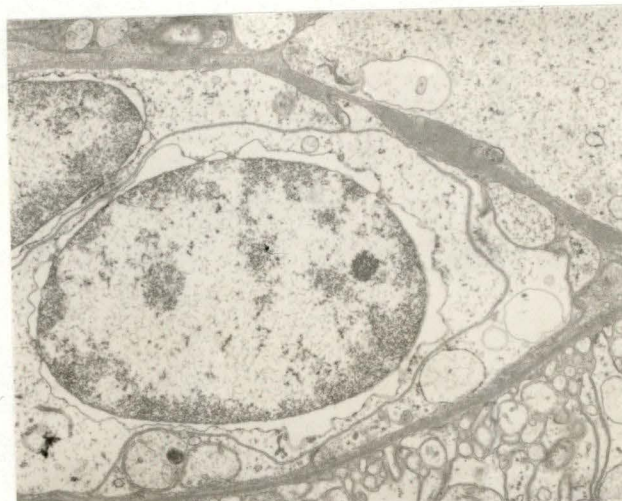


Photo 1. : hémocyte hyalin ou hyalocyte ( G = 9100 )

### 1.3. Les hémocytes:

#### 1.3.1 Origine et nombre des hémocytes:

- origine. Les hémocytes proviennent de l'organe hématopoïétique. Il est composé d'un ensemble de nodules reliés par du tissu conjonctif. Sa localisation varie avec le groupe systématique étudié. Il est situé à la base du rostre chez les Natantia et s'étale sur les parois dorsales et latérales de l'estomac broyeur chez les Reptantia (Charmantier, 1972). Chaque nodule est composé de cellules souches ou hémoblastes d'origine fibroblastique, caractérisées par un grand noyau et un cytoplasme hyalin; elles subissent des mitoses régulières produisant ainsi des cellules-filles: celles-ci se différencient à des degrés divers pour donner naissance aux trois types d'hémocytes circulants: les cellules hyalines, les hémocytes semi-granuleux et les granulocytes ( Bauchau, 1978 ). Etant donné que les hémocytes circulants ne subissent plus de mitoses, leur nombre reflète étroitement l'activité de l'organe hématopoïétique. D'autres facteurs peuvent aussi augmenter le taux hémocytaire, notamment la préparation de la ponte et en général les phénomènes de stress (jeûne, température, parasitisme,...).

#### 1.3.2 Classification des hémocytes:

Les hémocytes ont été décrits pour la première fois en 1824 par Carus. Depuis cette date se sont succédés un nombre important de travaux pour tenter d'établir une classification des hémocytes. Cependant tous ces travaux n'ont réussi qu'à créer une confusion dans la littérature scientifique. La diversité des techniques et des critères utilisés l'expliquent pour une bonne part. De plus, les hémocytes constituent un matériel très réactionnel qui subit des transformations importantes dès qu'il est retiré de l'hémocoèle. Cependant, la mise en oeuvre des techniques nouvelles de microscopie a permis d'aboutir à une nomenclature plus rationnelle. Trois types fondamentaux peuvent être distingués, les autres n'étant que des synonymes( fig. 2 ).

- Les cellules hyalines:

Ce sont les cellules les plus petites ( 7 microns ), avec un grand noyau central généralement entouré par une frange cytoplasmique basophile. On note la présence de RER, de ribosomes libres et de quelques rares granules limités par une membrane. Le Golgi, quand il existe, est unique.

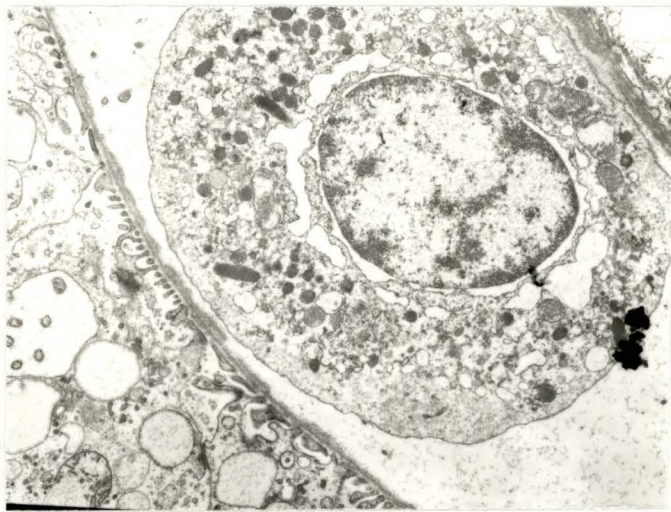


Photo 3. : hémocyte granuleux ou granulocyte ( G = 5700 )



Photo 2. : hémocyte semi-granuleux ( G = 7100 )

Ces cellules ont une tendance marquée à émettre des extensions pseudopodiales.

- Les granulocytes:

Ce sont les cellules les plus grandes (8 à 10 microns) avec un noyau petit, bilobé et décentré. Le cytoplasme est rempli de grands granules limités par une membrane; ils sont denses aux électrons et acidophiles. Le Golgi est présent la plupart du temps. On ne trouve du RER et du RES qu'autour du noyau et en bordure de la cellule.

- Les cellules semi-granuleuses:

C'est un type intermédiaire entre les deux types précédemment décrits. Le noyau est central ou décentré, sphérique ou lobé. Ces cellules contiennent des ribosomes libres, du RER ou du RES plus développés que dans les deux autres types, et deux Golgis ou plus produisant un nombre plus ou moins grand de granules eosinophiles dispersés dans le cytoplasme (Bauchau et De Brouwer, 1972).

Ces trois types cellulaires forment apparemment une série continue de différenciation avec de nombreuses formes intermédiaires. Plusieurs arguments plaident en faveur de cette hypothèse, notamment le rapport noyau/cytoplasme décroissant et la charge croissante en granules. Ce concept a été proposé en 1891 par Cuénot et adopté par la majorité des chercheurs. Cependant, certains s'y opposent:

- En effet, Ghiretti, et al. (1977) ainsi que Ratcliffe (1979) affirment que les différents types d'hémocytes ne représentent pas des stades de maturation d'une même cellule et que chaque type d'hémocyte assure une ou plusieurs fonctions particulières.

- Une autre hypothèse veut que les granulocytes soient le seul type natif circulant et qu'en raison de leur extrême labilité, n'importe quel stress les amènerait à dégranuler donnant naissance aux populations hyalines et semigranuleuses (Vranckx et Durliat, 1977).

En plus de ces trois types circulants, d'autres hémoblastes ne se différencient qu'après fixation sur le tissu conjonctif; on peut y inclure:

- Les cellules lipo-protéiniques de Sewell (1955):

Une vacuole augmente progressivement en taille confinant le cytoplasme en périphérie et repoussant le noyau dans un coin. Un matériau lipo-protéinique s'aggrège dans des corps denses réfractiles. Ces cellules pourraient être responsables de la sécrétion de l'épicuticule non chitineuse, juste avant la mue.

- Les cyanocytes:

Ils synthétisent et stockent l'hémocyanine sous la forme de corps cytoplasmiques cristallins (Fahrenbach, 1970). Ceux-ci fusionnent repoussant le cytoplasme en périphérie. Le pigment passe dans le sang via une sécrétion de type holocrine

- Les phagocytes, attachés en divers points du réseau vasculaire (Johnson, 1981)

- Les cellules de réserve: ce sont des hémocytes volumineux répartis dans le tissu conjonctif (Ghiretti-Magaldi, 1977).

Il faut cependant signaler l'existence d'autres classifications:

- Ravindranath (1974) a adapté à *Ligia océanica*, celle établie par Jones (1962) pour les insectes. Il subdivise le stade hyalin en cinq sous-classes mais aucune recherche n'est venue confirmer cette classification.

- William et Lutz (1975) ne distinguent que deux types cellulaires selon l'absence ou la présence de glycogène mais cette classification semble trop simpliste.

### 1.3.3 Cytochimie des hémocytes:

-En règle générale, on note la présence simultanée de protéines basiques et d'hydrates de carbone non glyco-géniques dans les granules (Bauchau et al., 1975). Ce sont des mucopolysaccharides neutres. Il se pourrait que ce soit de la chitine ou des précurseurs de chitine (Johnston et al., 1973). On a constaté la présence d'hémocyanine dans les granules des granulocytes (Durliat et Vranckx, 1976b).

-Le glycogène se trouve sous forme de plages plus ou moins riches dans les trois types hémocytaires fondamentaux; on y trouve également des lipides.

-Au point de vue enzymatique, la caractéristique la plus intéressante est que la prophenoloxdase ne se retrouve que dans les cellules semi-granuleuses et granuleuses.

### 1.3.4 Fonctions des hémocytes:

#### 1.3.4.1 La coagulation:

Dès 1970, Grégoire reconnaît cette fonction aux hémocytes. On peut regrouper les différents types de coagulation en trois catégories principales:

-Le type A: simple agglutination hémocyttaire, sans aucune gélification

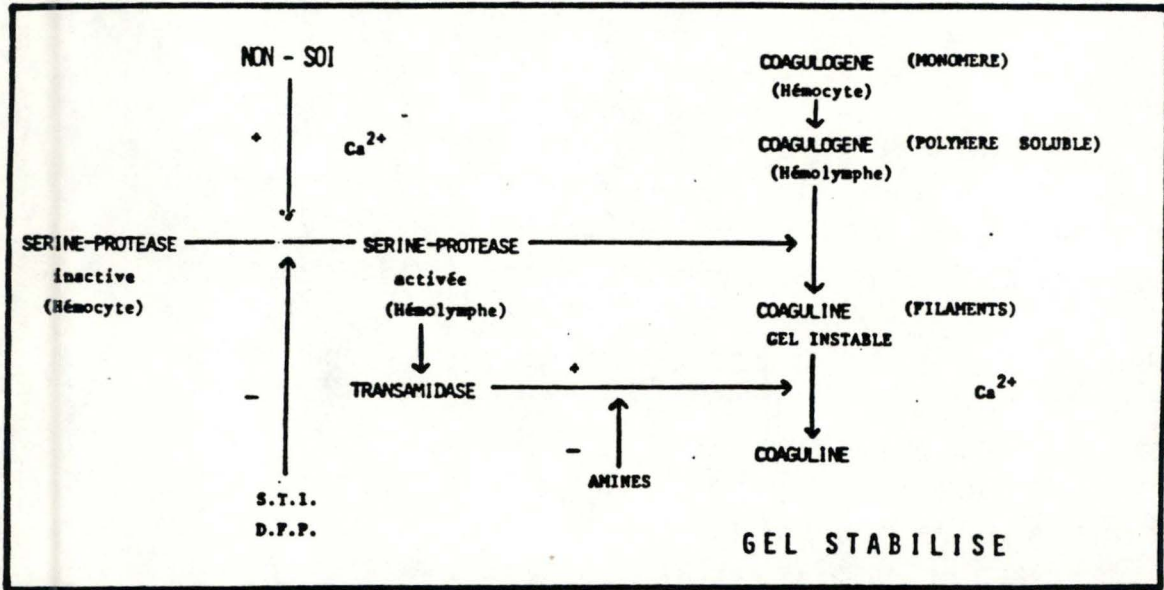


Fig.3:d'après A.C. Bauchau (1985)

ultérieure du plasma.

-Le type B: agglutination cellulaire et gélification totale du plasma

-Le type C: formation d'un gel limité au pourtour des hémocytes suivi peu après d'une gélification plus complète. L'agglutination ne joue ici qu'un rôle secondaire ( Tait, 1911 ).

Carcinus maenas présente le type de coagulation B, schématisé à la figure 3.

Le coagulogène est présent sous forme de monomères dans l'hémocyte et serait à la base de la formation du coagulogène polymérique plasmatique soluble. C'est une protéine qui joue un rôle analogue au fibrinogène des Vertébrés. Sous l'action d'une sérine protéase hémocytaire, le coagulogène se transformerait en coaguline formant un gel instable. Une transamidase, activée par la sérine protéase, acheverait la transformation de ce gel en gel stabilisé et insoluble. Il faut signaler que d'autres facteurs interviennent, notamment le calcium. Les hémocytes ne participent pas tous en même temps à ce phénomène. Les cellules hyalines et semi-granuleuses forment d'abord un réseau cellulaire lâche par l'émission de longs pseudopodes. Pendant ce temps, elles déchargent leur contenu vacuolaire provoquant une gélification du plasma plus ou moins prononcée. Ensuite les cellules granuleuses déchargent le contenu solubilisé de leurs granules dans le plasma.

Les Arthropodes étant un groupe d'animaux à circulation ouverte, la coagulation se doit d'être un phénomène efficace, toute atteinte à l'intégrité des téguments représentant en effet une éventualité redoutable.

### 1.3.4.2 La phagocytose:

La phagocytose est un processus actif par lequel une cellule englobe des particules solides en suspension dans le milieu. Les trois types fondamentaux d'hémocytes phagocytent mais les hyalins et les semi-granuleux se montrent plus actifs. Il existe une certaine spécialisation cellulaire notamment chez Callinectes sapidus où les amibes ne sont phagocytées que par les hyalins tandis que les bactéries le sont par les granulocytes. L'adhérence des éléments à phagocyter aux récepteurs membranaires est un préalable essentiel.

-Ce phénomène est dépendant du pH.

-Il se fait grâce à la présence de lectines sur la membrane des hémocytes et par une reconnaissance spécifique des carbohydrates (Renwranz, 1983; Cassels, 1986).

—QUANTITATIVE RESULTS OF CARBOHYDRATE ASSAYS OF *Carcinus* HAEMOLYMPH  
AND HEPATOPANCREAS TISSUES

Carbohydrate	Mean tissue concentration		Mean total tissue values	
	Haemolymph (mg% ± S.E.)	Hepatopancreas (mg/g ± S.E.)	Haemolymph (mg ± S.E.)	Hepatopancreas (mg ± S.E.)
Glucose	8.02 ± 0.86	1.69 ± 0.20	1.34 ± 0.14	5.65 ± 0.66
Trehalose	4.36 ± 0.29	1.15 ± 0.09	0.73 ± 0.04	7.17 ± 0.48
Total oligosaccharides	17.35 ± 1.33	3.65 ± 0.25	2.90 ± 0.22	12.18 ± 1.33
Glycogen	23.16 ± 2.88	0.22 ± 0.05	3.87 ± 0.48	0.60 ± 0.13
Total polysaccharides	74.77 ± 6.43	1.03 ± 0.18	12.04 ± 1.05	3.42 ± 0.59
Total carbohydrates	94.05 ± 6.97	4.36 ± 0.31	15.12 ± 1.42	15.69 ± 1.07

Fig. 4:d'après Johnston (1973)

#### 1.3.4.3 Encapsulation et mélanisation.

Lorsque le corps étranger dépasse le volume des hémocytes, apparaît le phénomène de l'encapsulation. Plusieurs couches d'hémocytes entourent le corps étranger qui se voit séquestré dans un épais manchon cellulaire. Ce phénomène est parfois suivi d'une mélanisation intense due à l'activation de la phenoloxydase hémocytaire.

#### 1.3.4.4 Mue et vitellogenèse:

Chez Eriocheir sinensis, une augmentation significative des hémocytes a lieu lors de conditions physiologiques définies telles que la mue ou l'activité des gonades (Bauchau-Plaquet, 1973). Il serait tentant d'y voir un rôle joué par les hémocytes mais cette hypothèse n'est pas confirmée à l'heure actuelle. De même, pendant la vitellogenèse chez Carcinus maenas, l'hémocyanine et une autre protéine sérique ( glycolipoprotéine ) sont incorporées dans les oeufs; ces protéines pourraient être d'origine hémocytaire (Busselen, 1970).

#### 1.3.4.5 Réserve d'acides aminés libres.

La teneur en acides aminés libres des hémocytes est élevée par rapport à celle du plasma. Elle pourrait jouer un rôle dans la régulation osmotique de ces cellules, quand le crabe parvient dans un milieu de salinité différente ( Evans, 1972 ).

#### 1.3.4.6. Fonction d' "hépatocyte circulant":

En 1971, Johnston et Davies effectuent une analyse comparée des sucres présents dans l'hémolymphe et dans l'hépatopancréas de Carcinus maenas ( fig 4 ). Ils constatent que, non seulement les proportions de polysaccharides sont plus élevées dans l'hémolymphe mais leur quantité totale en comparaison avec l'hépatopancréas est également supérieure. Or, jusqu'à ce jour, l'hémolymphe des Crustacés était généralement considérée comme un moyen de transport des métabolites de faible poids moléculaire. L'hépatopancréas souvent comparé au foie des Vertébrés, apparaissait au contraire comme un site de transformations et de stockage des hydrates de carbone de haut poids moléculaire. Ces recherches ont donc conduit à réviser les rôles respectifs des

hémocytes et de l'hépatopancréas et à proposer un rôle d'hépatocyte circulant pour l'hémocyte. D'autres données sont venues appuyer cette hypothèse: Bauchau et Mengeot (1978) utilisant des méthodes histochimiques ainsi que la microscopie électronique ont mis en évidence dans les hémocytes des quantités de glycogène dépassant celles nécessaires à leur propre métabolisme. Une partie de cette réserve pourrait servir à la synthèse de chitine au cours de la mue (Johnston et al., 1973); le surplus serait un réservoir de glucose facilement mobilisable (William et Lutz, 1975 b). En effet, Johnston et Davies (1971) remarquent que l'hydrolyse des polysaccharides de l'hémolymphe augmente la concentration du glucose sanguin.

Cependant, les travaux de Keller (1977) ont fourni des résultats ne concordant pas avec cette hypothèse: une injection de l'hormone hyperglycémiant des glandes sinusaires produit une augmentation des concentrations en AMPc et GMPc dans les muscles, les téguments et les gonades, mais pas dans l'hémolymphe ce qui laisse subsister un doute sur la fonction hépatique des hémocytes.



## 1.4. La mue:

### 1.4.1 Introduction:

Bien qu'elle ne s'exprime que périodiquement au travers de la mue, la croissance est un phénomène tout à fait continu chez les Crustacés.

Deux cas peuvent se présenter.

- soit les mues se succèdent tout au long de la vie du Crustacé, ce qui conduit à une taille de plus en plus grande. C'est le cas du tourteau (Cancer pagurus) et du homard (Homarus vulgaris).

- soit il existe une dernière mue et, dans ce cas, l'animal atteint une taille maximum. On rencontre cette situation chez l'araignée de mer (Maia squinado) et le crabe enragé (Carcinus maenas).

La mue assure trois rôles:

- La réparation régulière de toute détérioration de l'exosquelette.

- La croissance.

- L'expression, lors de la puberté, des caractères sexuels primaires et secondaires (appendices sexuels, élargissement de l'abdomen chez la femelle).

La terminologie actuelle différencie l'exuviation ou ecdysis (rejet de l'ancien exosquelette) de la mue (phénomènes qui précèdent et suivent l'exuviation). Ces deux processus s'accompagnent de modifications profondes du système tégumentaire: c'est pourquoi il nous a paru nécessaire de le décrire ci-après.

### 1.4.2. Le système tégumentaire:

On y distingue plusieurs couches (figure 5):

- L'épicuticule qui est la couche la plus externe correspond à quelques microns; elle est composée d'un complexe de lipo-protéines ainsi que de cristaux de carbonate de calcium; la chitine y est absente. Son rôle est de diminuer la perméabilité des téguments.

- L'endocuticule que l'on peut subdiviser en deux couches suivant leur moment de sécrétion:

. La couche préexuviale, secrétée avant la mue: elle est riche en protéines, calcifiée, contient divers pigments et est composée de 40 à 45 % de chitine.

- STADES DU CYCLE D'INTERMUE : leur durée chez C. maenas, les caractéristiques morphologiques et physiologiques qui les définissent.

Stade	Durée	Caractéristiques physiologiques	Caractéristiques morphologiques
A <sub>1</sub>	10 - 15 h	(Immédiatement après l'exuviation) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Absorption d'eau.</li> <li>• Inactivité apparente de l'animal (ni déplacement, ni alimentation).</li> </ul>	Dépassement du nouvel exosquelette qui offre une consistance molle.
A <sub>2</sub>	20 - 40 h	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fin de l'absorption d'eau.</li> <li>• Début de calcification de la partie antérieure du bouclier dorsal.</li> <li>• Déplacement de l'animal, jeûne.</li> </ul>	Bouclier dorsal à consistance parcheminée.
B <sub>1</sub>	2 - 3 jours	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Calcification croissante de l'exosquelette.</li> <li>• Déplacements, jeûne.</li> </ul>	Bouclier dorsal durci sauf dans région cardiaque, propodites des pattes déprimables sans casser.
B <sub>2</sub>			Propodites rigides.
C <sub>1</sub>	quelques jours	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Début de formation de la couche principale, calcification croissante.</li> <li>• Déplacements, alimentation intense.</li> </ul>	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.
C <sub>2</sub>	quelques jours	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suite de la formation de la couche principale et de la calcification.</li> <li>• Déplacements, alimentation intense.</li> </ul>	Rigidité totale du bouclier dorsal, flexibilité très réduite de la région postérieure des branchiostégites.
C <sub>3</sub>	quelques jours	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Achèvement de la couche principale.</li> <li>• Déplacements, alimentation.</li> </ul>	Rigidité totale de l'exosquelette.
C <sub>4</sub>	plusieurs semaines ou plusieurs mois	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formation de la couche membraneuse.</li> <li>• Déplacements, alimentation.</li> </ul>	Test de présence de la couche membraneuse : une cassure d'un fragment du bouclier dorsal n'entraîne pas une séparation des deux morceaux.
D <sub>0</sub>	quelques jours	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Décollement de l'épiderme par rapport à l'exosquelette (apolyse), mitoses ectodermiques, genèse des futures soies.</li> <li>• Déplacements, alimentation.</li> </ul>	Examen microscopique de l'épipodite branchial externe : faisceau fibrillaire des soies pas encore invaginé sous l'épiderme.
D <sub>1</sub>	quelques jours	Suite de D <sub>0</sub> .	Examen microscopique de l'épipodite branchial externe : faisceau fibrillaire des soies invaginé sous l'épiderme.
D <sub>2</sub>	quelques jours	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sécrétion de l'épicuticule, début de sécrétion de la couche pigmentaire du futur exosquelette.</li> <li>• Déplacements, fin d'alimentation.</li> </ul>	Cassure d'un dactylopodite : l'extrémité de la patte se dégage de son ancien exosquelette.
D <sub>3</sub>	quelques jours	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Résorption de l'ancienne cuticule, suite de l'édification de la couche pigmentaire.</li> <li>• Déplacements, jeûne.</li> </ul>	Fragilité de la suture épimérienne qui cède sous la pression d'un ongle.
D <sub>4</sub>	quelques heures	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Achèvement de la résorption de l'ancien exosquelette.</li> <li>• Inactivité, jeûne.</li> </ul>	Suture épimérienne ouverte : fente bien apparente.
E	quelques minutes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Absorption importante d'eau.</li> </ul>	Soulèvement du bouclier dorsal, dégagement des appendices, rejet de l'ancien exosquelette (exuviation).

Fig. 7 : d'après M.T. Cantiniaux-Fontaine (1983)

Les couches postexuviales, déposées après la mue : la couche principale s'enrichit en dépôts calcaires tandis que la couche membraneuse, déposée en tout dernier lieu reste libre de calcaire.

Toutes ces couches forment l'exosquelette qui s'appuie sur l'ectoderme. Ce dernier ne compte qu'une seule assise de cellules très hautes ; des cellules sensorielles terminées par un poil s'y intercalent. Le derme, situé sous l'ectoderme, contient des glandes tégumentaires au rôle controversé et de nombreux chromatophores.

La chitine apparaît donc comme un composant essentiel de l'exosquelette : c'est un polymère de l'acétylglucosamine (fig 6), qui se lie à des protéines pouvant être tannées et retient éventuellement des cristaux de calcite. La superposition des strates traduit le caractère rythmique de l'activité sécrétoire de l'ectoderme.

#### 1.4.3 Déroulement de la mue (cfr fig 7) :

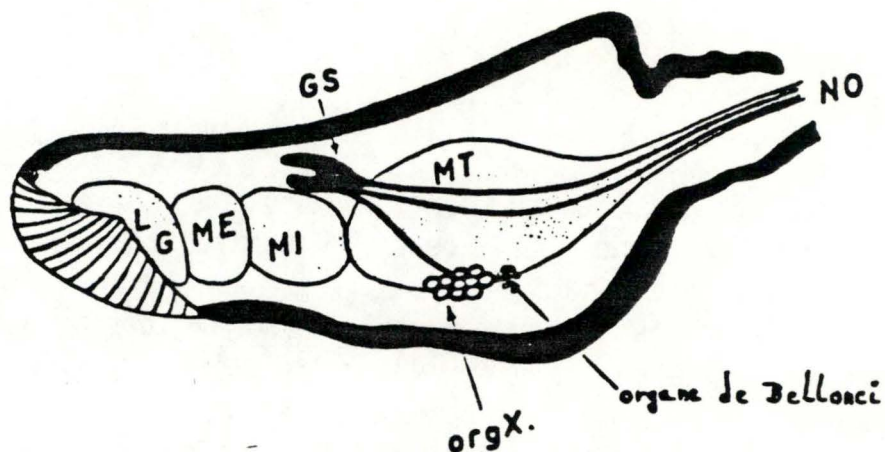
L'exuviation est précédée d'une étape préexuviale (proecdysis ou étape D de Drach) divisée en cinq stades :

- L'apolyse ou étape Do : l'épiderme et l'exosquelette se séparent ; l'épiderme se plisse suite à de nombreuses divisions de ses cellules.
- L'étape D1 : sécrétion d'une nouvelle épicuticule qui s'achèvera en D2.
- L'étape D2 : sécrétion de l'exocuticule ( la couche préexuviale ).
- L'étape D3 : résorption de l'ancienne cuticule avec mise en réserve d'une partie de ses constituants dans l'hépatopancréas, l'épiderme et l'hémolymphe.
- L'étape D4 : l'ancien revêtement cède sous une attaque enzymatique plus localisée : la carapace s'ouvre.

Lors de l'exuviation, le Crustacé sort de son ancien exosquelette.

Au cours des étapes postexuviales, il va absorber de l'eau notamment par la paroi de l'estomac broyeur (A1), ce qui, par l'extension de ses tissus va lui permettre d'acquies une taille plus grande (A2 jusque C3). Ces étapes s'accompagnent de la calcification progressive de l'exosquelette par le dépôt de sels minéraux et de l'achèvement de la couche principale (endocuticule) par la synthèse de protéines et de chitine.

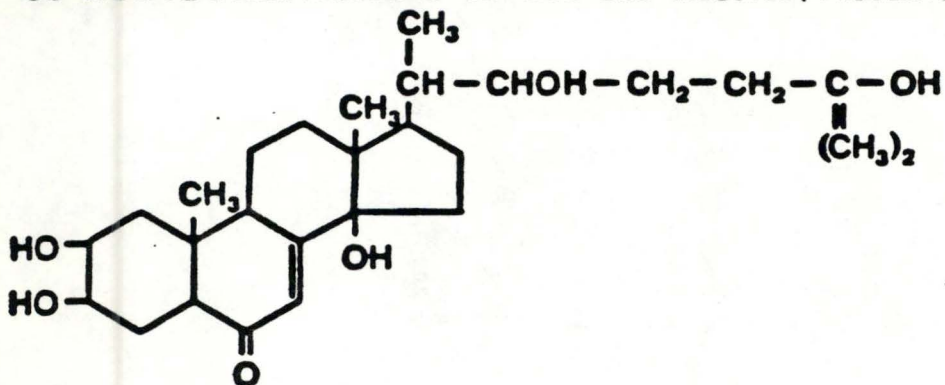
L'intermue ou anecdysis (C4) est l'étape la plus longue et se caractérise par la formation de la couche membraneuse.



— Schéma d'une coupe sagittale d'un pédoncule oculaire, 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, entourant un sinus sanguin.

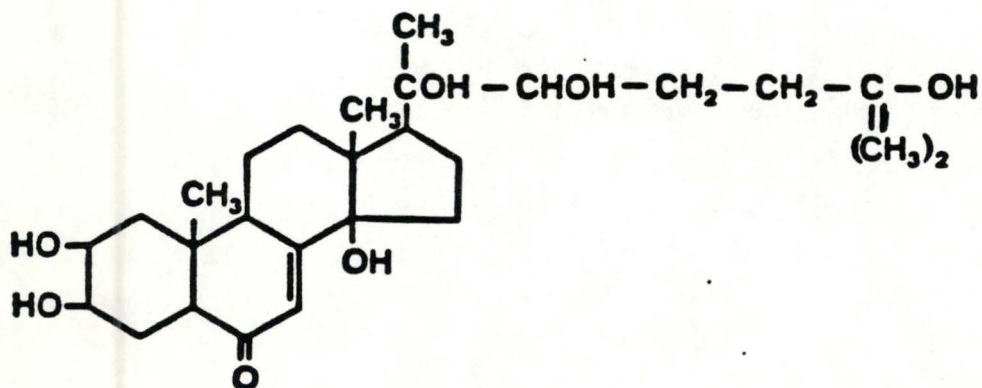
Fig.8:d'après A.G. Bauchau (1966)

**α-ECDYSONE:**(HORMONE DE MUE DES INSECTES; PRESENTE CHEZ LES CRUSTACES)



**β-ECDYSONE:**(HORMONE DE MUE DES CRUSTACES; PRESENTE CHEZ LES INSECTES)

**ECDYSTERONE**  
**CRUSTECDYSONE**  
**20-HYDROXY-ECDYSONE**



**DEOXY-CRUSTECDYSONE (CRUSTACES)**

Fig.9:d'après A.G. Bauchau (1985)

#### 1.4.4. Contrôle endocrinien:

Dès 1905, Zelény constate que l'ablation des pédoncules oculaires accélère la mue. Par contre, une implantation des pédoncules oculaires la retarde. Il en conclut à l'existence d'une hormone inhibitrice de la mue, la MIH. Il faut attendre 1931 et Hanström pour connaître l'histologie des pédoncules oculaires qui se révéleront être le lieu de sécrétion de la MIH. Ceux-ci ( fig 8 ) révèlent dans le sens proximo-dorsal différents tissus :

- une série de ganglions nerveux : la médulla terminalis (M.T.), la médulla interna (M.I.), la médulla externa (M.E.) et la lamina ganglionaris
- l'extrémité correspond à un ganglion optique constitué d'ommatidies.
- l'organe X, situé sous la médulla terminalis , est un ensemble de cellules nerveuses dont les terminaisons axoniques forment la glande sinusaire. L'organe X et la glande sinusaire constituent ensemble l'organe neurohémal.
- des cellules en forme d'oignon sont disposées près de l'organe X et forment l'organe de Bellonci. Des expériences d'ablation sélective et d'injection ont montré que l'organe de Bellonci agissait positivement sur l'organe Y et favoriserait l'ecdysis par l'intermédiaire d'une hormone.

En 1953, Passano montre grâce à des expériences d'ablations, de greffes, et d'injections, que c'est le complexe neurohémal qui est responsable de la sécrétion de la MIH. Cette hormone n'a été caractérisée que récemment (1986) par Webster : c'est une substance peptidique thermostable, sensible à la trypsine et d'un poids moléculaire situé entre 6000 et 14 000 Daltons.

Il existe également une hormone de mue: c'est en 1953 que Gabe identifie en avant des chambres branchiales une paire de glandes ectodermiques ventrales semblables à la glande prothoracique des insectes supérieurs : il la nomme organe Y. Si on en fait l'ablation avant l'étape D2, la mue est supprimée. Si on l'implante, la mue reprend. Cette glande produit donc une hormone de mue, nommée MH ( Moulting hormone). Horn et Faux (1968) l'identifient à partir d'extraits totaux : c'est la  $\beta$ -ecdysone ( fig 9 ) ou crustecdysone (ou ecdystérone) provenant de la transformation de l' $\alpha$ -ecdysone par les tissus. La source d' $\alpha$ -ecdysone est le cholestérol exogène comme l'a montré Blanchet (1974). Un problème demeure à savoir que, si on cautérise l'organe Y d'un individu et qu'on lui injecte la crustecdysone, il ne subit pas l'exuviation comme on s'y attendrait et les préparatifs de la mue s'arrêtent en D2 : cette constatation suggère l'existence d'un facteur d'exuviation distinct de l'hormone de mue; celui-ci est toujours hypothétique.

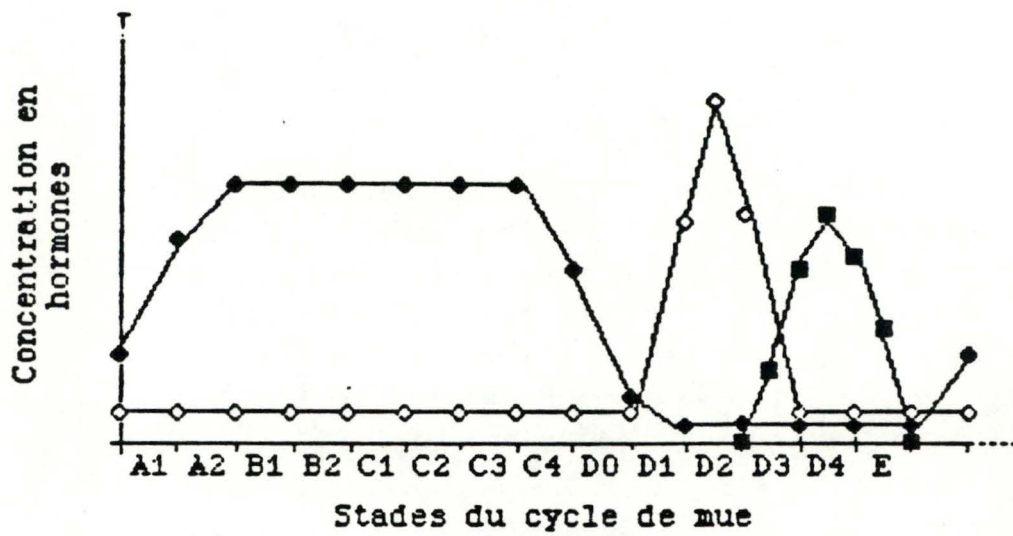


Fig.10: -Schéma récapitulatif concernant le contrôle hormonal de la mue: la M. I. H. (●), l'ecdystérone (○) et le facteur d'exuviation (■).

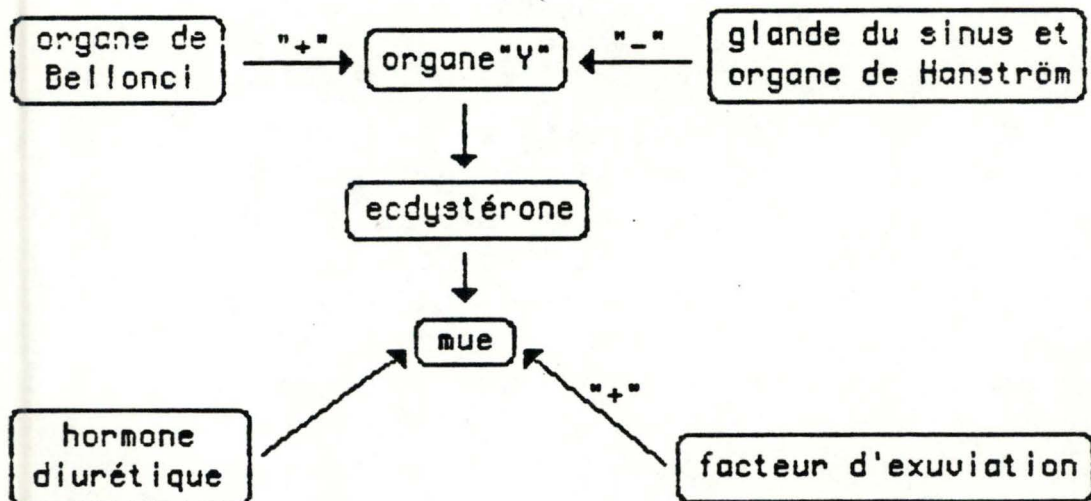


Figure 11

Les variations de concentration de ces trois hormones au cours du cycle de mue sont reproduites à la figure 10.

#### 1.45 Contrôle de la taille et hormone diurétique

Un accroissement de la taille va généralement de pair avec la mue. La croissance qui se fait de façon linéaire résulte d'une multiplication cellulaire et d'une absorption d'eau par l'estomac broyeur. Celle-ci est sous le contrôle de l'hormone diurétique libérée par les pédoncules oculaires. En effet, Mantel (1968), travaillant sur le crabe chinois (Eriocheir sinensis) constate qu'une ablation des pédoncules oculaires conduit à une croissance de 20 à 29 % au lieu des 6 à 10 % habituels. Après injection d'un extrait de pédoncules oculaires, la croissance est ramenée à des proportions normales. De plus, alors qu'un extrait de pédoncules oculaires a un effet diurétique à tout moment du cycle de mue, il ne retarde la mue que s'il est préparé à partir d'un crabe au stade C4, ce qui plaide en faveur de l'existence d'une hormone diurétique distincte de la MIH.

L'action des 4 hormones est reprise à la figure 11

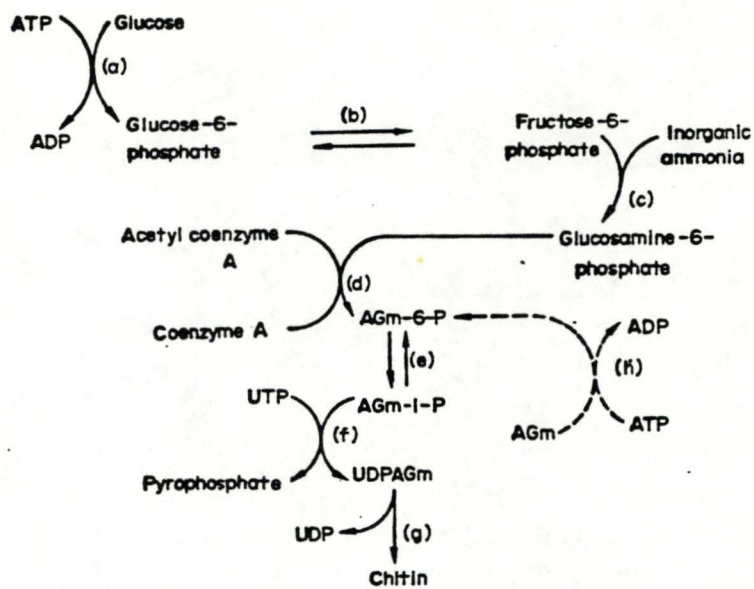


Fig.12 : d'après Gwinn-Stevenson (1973).

## 1.5. Les hydrates de carbone:

### 1.5.1. Introduction.

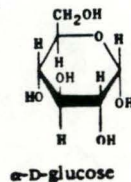
Chez les Décapodes, les hydrates de carbone contenus dans l'hémolymphe constituent une réserve énergétique importante contrairement aux vertébrés où cette réserve est localisée dans le foie. Bien que les voies biochimiques soient fort semblables entre Vertébrés et Crustacés, il existe des différences; ainsi la polymérisation de la N-acétylglucosamine en chitine à partir du glucose (fig.12). Comme de nombreux auteurs ont signalé l'importance des glucides pour le déroulement de la mue, nous décrivons ici leur métabolisme.

### 1.5.2. Glucose-glycogène.

Nous traiterons ensemble le cas de ces deux sucres étant donné qu'ils sont intimement liés par les processus de glycogénosynthèse et de glycogénolyse.

#### 1.5.2.1. Structures:

- Le glucose: c'est un sucre réducteur; il forme l'unité de base du glycogène.



-Le glycogène : (fig.13).

Il est constitué de chaînes linéaires d'unités glucosyles reliées entre elles par des liaisons  $\alpha$ 1-4 glucosidiques. Des liaisons  $\alpha$  1-6 intervenant toutes les 4 ou 5 unités lui confèrent un aspect arborescent typique. Dans la cellule, le glycogène se présente le plus souvent sous l'aspect de gros granules de diamètre variable, les particules  $\alpha$ , formées par

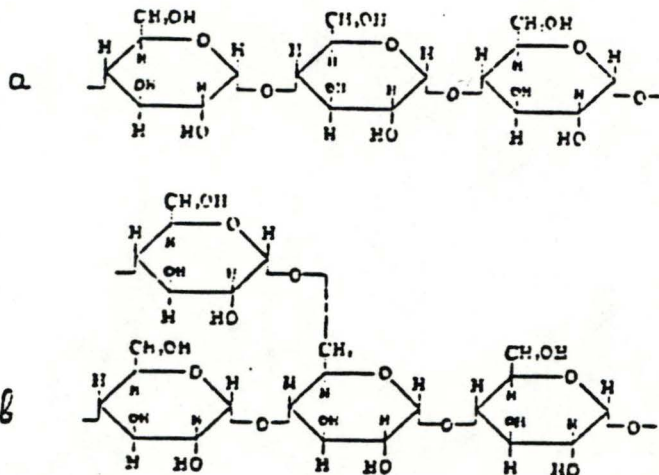
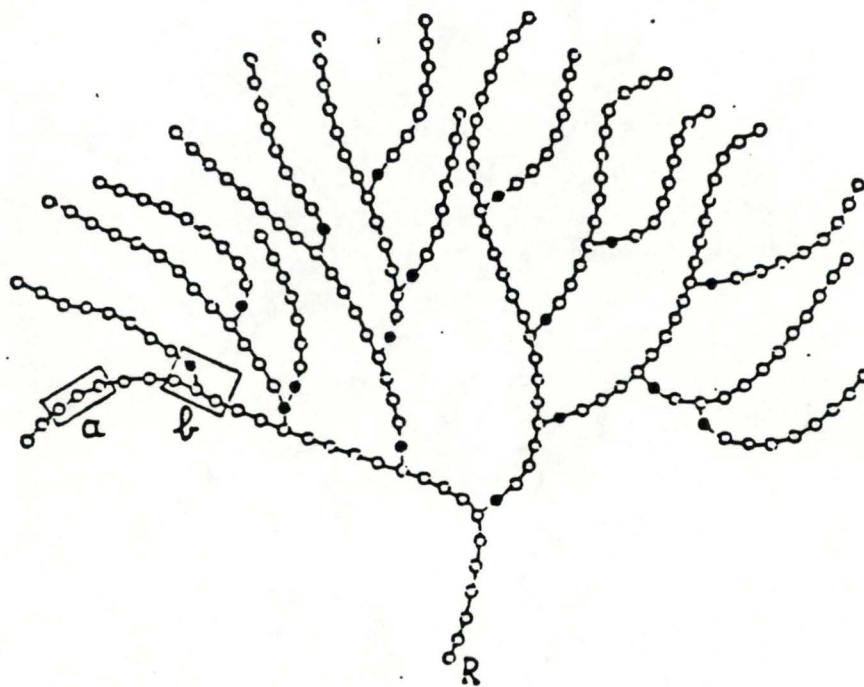


Fig. 13: - Structure du glycogène (schéma selon Cori, 1955).  
 Les unités glucosyles rattachées par des liaisons  $\alpha$ -1,4-glucosidiques sont représentées par les cercles clairs; les unités glucosyles rattachées par une liaison  $\alpha$ -1,6-glucosidique sont représentées par les cercles noirs. R représente l'extrémité réductrice du glycogène. La structure des fragments a et b est donnée plus en détail.

l'association des particules  $\beta$  (granules plus petits de diamètre constant). Cependant, il arrive que seuls les granules  $\beta$  soient présents comme dans le cas du muscle

### 1.5.2.2 Rôle du glucose

Le glucose est le sucre "clé" du métabolisme glucidique. Il peut évidemment être transformé en glycogène par la synthèse à constituant sous cette forme une importante réserve énergétique notamment dans les néphocytes

Il est à la base de la formation de mucopolysaccharides présents en plus ou moins grandes quantités dans les granules des hématocytes.

Sous forme de glucosamine-6P, il joue un rôle primordial dans la formation de la chitine. Enfin, c'est une source d'énergie directement utilisable par l'intermédiaire de la glycolyse

### 1.5.2.3 Rôle du glycogène

Le glycogène est le polysaccharide de réserve majeur de la cellule animale Sa structure branchée convient parfaitement pour ce rôle :

- elle explique la haute solubilité du glycogène
- elle permet une faible pression osmotique par rapport à une quantité équivalente de glucose

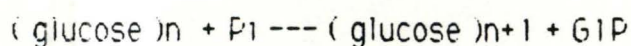
### 1.5.2.4 Synthèse et dégradation du glycogène

Ces deux processus font intervenir de nombreux enzymes (fig. 14) mais deux sont plus particulièrement impliqués dans ce mécanisme : la glycogène synthase et la glycogène phosphorylase

La glycogène synthase qui est l'enzyme limitant de la glycogénosynthèse catalyse le transfert du glucosyle de l'UDPG sur les extrémités non réductrices du glycogène suivant l'équation :



La glycogène phosphorylase qui est l'enzyme limitant de la glycogénolyse, catalyse la phosphorylation des glucosyles situés aux extrémités non réductrices du glycogène suivant l'équation :



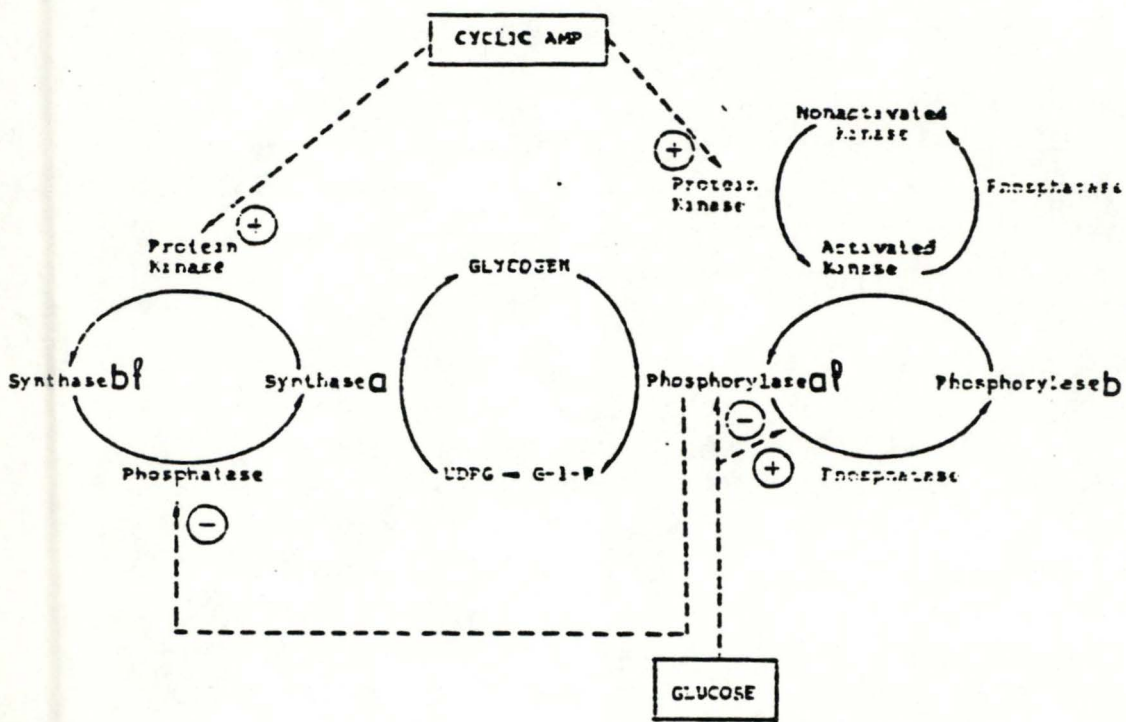


Fig. 14: - Interconversion des deux formes de la glycogène-phosphorylase et de la glycogène-synthase dans le foie, et son contrôle par l'AMP-cyclique et par le glucose.

a) La glycogène synthase :

Chez les Vertébrés, la synthase se trouve essentiellement sous la forme d'un dimère de poids moléculaire proche de 170.000 ; elle existe également sous forme de tétramère

Chez les crabes, elle est sous le contrôle d'un facteur diabétogénique des pédoncules oculaires qui exercerait son action via l'inhibition de l'enzyme (Wang D.H. et Sheer, 1963 ; Ramamurthi et al., 1968).

Dans le foie des Vertébrés, la synthase se présente sous deux formes interconvertibles par un processus de phosphorylation et de déphosphorylation. La synthase a (forme non phosphorylée) est la forme active " in vivo " tandis que la synthase b ( forme phosphorylée ) est moins active ou inhibée " in vivo ".

b) La glycogène phosphorylase :

Chez les Crustacés comme chez les Vertébrés, cet enzyme se présente sous la forme d'un dimère d'un poids moléculaire proche de 180.000, mais peut être aussi tétramérique ( Santiago, 1974 ). Cependant la phosphorylase des Crustacés a une constitution en AA et des propriétés physico-chimiques différentes de celle des vertébrés ( Cowgill, 1959). Comme dans le cas de la synthase, l'enzyme se présente sous deux formes interconvertibles : la phosphorylase a (active) et la phosphorylase b ( moins active). Cette fois, la forme phosphorylée est donc l'enzyme actif.

c) La synthase phosphatase :

Elle a été mise en évidence dans le foie des Vertébrés en 1970 par De Wulf et Hers. Elle catalyse l'activation de la synthase b. Son activité est inhibée en présence de la phosphorylase a (Stalmans, 1971).

d) La phosphorylase phosphatase :

Elle catalyse l'enlèvement de phosphates à la phosphorylase a la transformant ainsi en phosphorylase b. Son activité est influencée par plusieurs substances qui modifient la conformation de la phosphorylase a. Ainsi, chez les Vertébrés, le NaF, le 5'AMP et le 5'IMP inhibent son activité tandis que la caféine et le glucose l'activent.

e) La phosphorylase kinase :

c'est l'enzyme responsable de l'activation de la phosphorylase b. Son poids moléculaire est proche de 1.300.000 (Busby, 1976). Elle existe sous deux formes interconvertibles ; une protéine kinase dépendante du calcium peut la phosphoryler la rendant ainsi active tandis que son inactivation résulte d'une déphosphorylation par des phosphatases

f) La protéine kinase :

Cet enzyme peut aussi bien phosphoryler la phosphorylase kinase que la synthase a. Elle est constituée de deux sous-unités : la sous-unité C qui est la composante catalytique et la sous-unité R qui est la composante régulatrice. Lorsque celles-ci sont réunies, la protéine kinase est inactive. L'AMPc entraîne la séparation des deux sous-unités en se liant à l'unité R libérant ainsi l'unité C active :



g) Conclusions :

La régulation du glycogène est un phénomène complexe qui repose essentiellement sur l'équilibre entre activités kinasiques et phosphatasiques. Deux particularités du système permettent à la glycogénosynthèse et à la glycogénolyse de ne pas se dérouler simultanément :

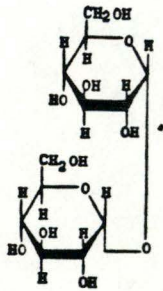
- l'existence d'une protéine kinase unique catalysant l'activation de la phosphorylase kinase ainsi que l'inactivation de la synthase
- le fait que la phosphorylase a (active) inhibe la synthase phosphatase empêche l'activation de la synthase b.

1.5.3 Le tréhalose:

Dans le règne animal, le tréhalose a surtout été recensé chez les invertébrés Arthropodes et plus particulièrement dans les espèces d'insectes étudiées dont le criquet (Nowosielski, Patton, 1964), le ver de farine (Chang, Liu, Feng, 1964), etc... Il s'est également avéré présent dans

le groupe des Nématodes (Cavier et Savel, 1960) et des Annélides (Fairbairn, 1958). Certaines espèces de Crustacés Décapodes dont Carcinus maenas en possèdent (Telford, 1968) mais il semble absent dans d'autres espèces (Mann, 1963 ; Parvathy, 1970).

C'est un sucre non reducteur composé de deux unités glucosyles reliées par une liaison  $\alpha 1-1'$ .



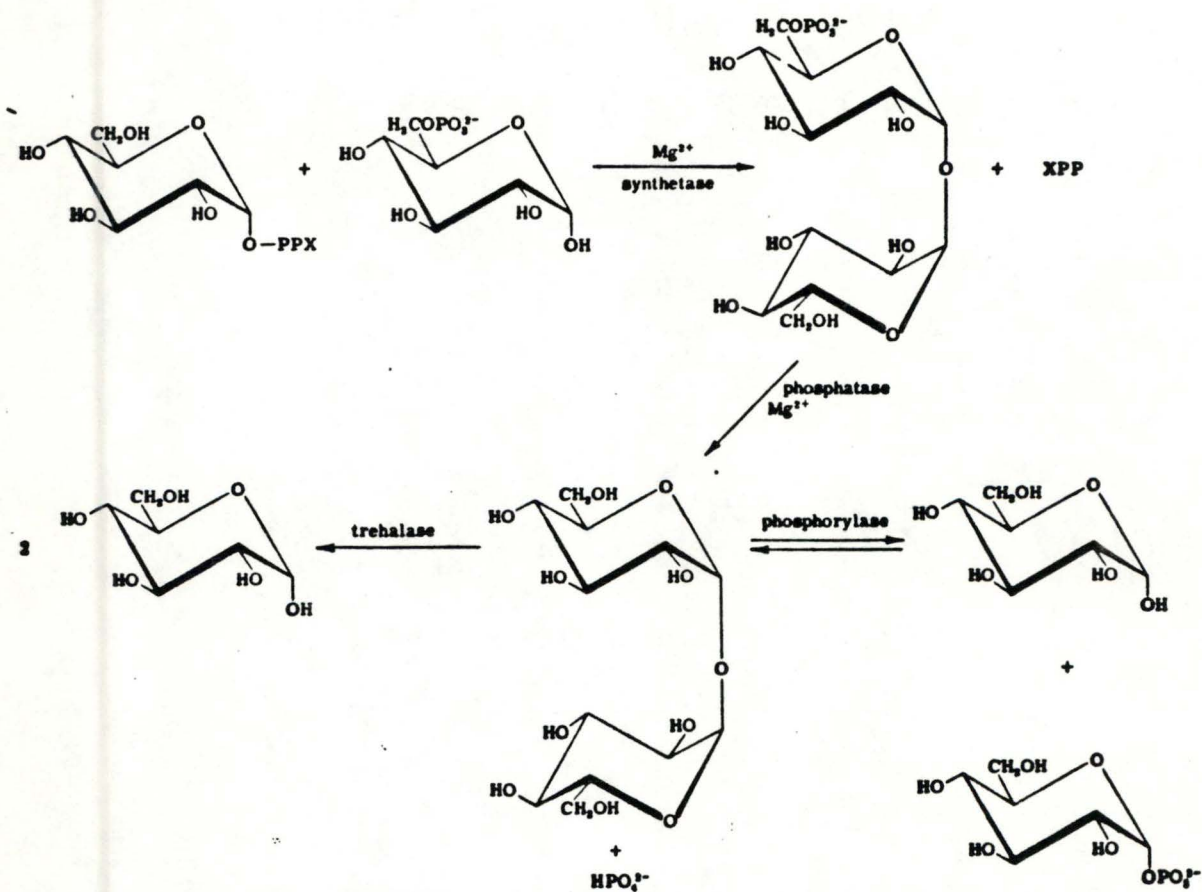


FIG. 1.—Reactions Involved in the Metabolism of  $\alpha,\alpha$ -Trehalose. [Synthetase refers to the trehalose 6-phosphate synthetase (XDP-D-glucose:D-glucose 6-phosphate 1-D-glucosyl transferase), phosphatase to the trehalose 6-phosphate phosphatase, and phosphorylase to the  $\alpha,\alpha$ -trehalose phosphorylase.]

Fig.15 : d'après Elbein, (1974).

### 1.5.3.1. Biosynthèse du tréhalose :

Calib et Leloir (1968) ont démontré les premiers la biosynthèse du tréhalose par la voie de l'uridine 5'-( $\alpha$ -D-glucopyranosyl pyrophosphate) chez la levure de bière (fig.15). Il s'agit du transfert du D-glucose à partir de l'UDP-D glucose vers le D-glucose 6-phosphate pour former de l' $\alpha$ -tréhalose 6-phosphate et de l'uridine 5'-pyrophosphate. Cette étape se fait grâce à la tréhalose 6-phosphate synthétase. Ensuite, une phosphatase catalyse l'enlèvement du groupe phosphate ce qui donne le tréhalose. Ce mécanisme semble être identique chez les insectes notamment chez la sauterelle, Shiztocerca grégoria (Candy et Killy, 1961). En ce qui concerne les crustacés, Schwach (1972) travaillant sur l'écrevisse Orconectes limosus raifinesque détecte la synthèse de tréhalose dans les muscles abdominaux, les glandes antennales, l'intestin postérieur, le tissu intégrumentaire et en moindre proportions, dans le tissu stomacal. Il constate aussi la présence de la tréhalose 6-phosphate synthétase qui est inhibée par le tréhalose. De plus, il observe que le taux de synthèse du tréhalose dépend des saisons, l'activité optimale dans les muscles abdominaux se situant en février et en mars. Enfin, il constate qu'après injection de tréhalose radioactif, celui-ci se distribue à partir de l'hémolymphe vers les autres organes.

### 1.5.3.2. Rôle du $\alpha$ -tréhalose :

#### a) Comme composant structural :

Cette idée a vu le jour après les travaux de Elbein et Mitchell (1973) travaillant sur Mycobacterium segmatis. Quand le contenu en azote du milieu diminue, la quantité de glycogène augmente nettement tandis que celle du tréhalose reste stable ; le glycogène constituerait donc une réserve d'énergie tandis que le tréhalose servirait à d'autres fins. Des expériences de marquages radioactifs chez les Crustacés (Schwach, 1972) ont montré qu'il est utilisé dans la biosynthèse de la chitine après sa conversion en glucose.

#### b) Comme réserve d'énergie supplémentaire :

Dès 1955, Sacktor démontre la capacité du tréhalose à servir de combustible pour l'activité oxydative d'un homogénat de muscle de mouche

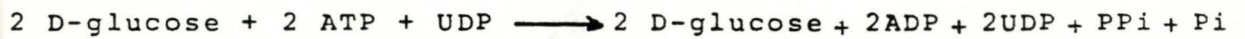
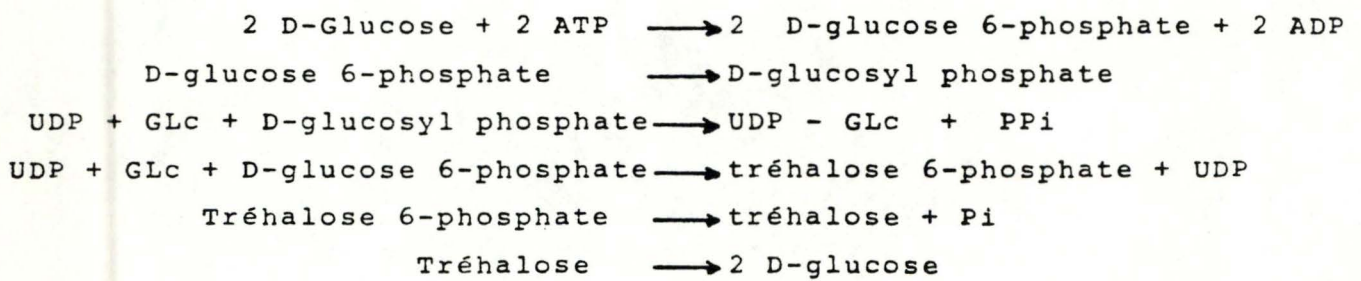


Figure 16 : Mécanisme détaillé de la résorption du glucose  
 ----- par le biais du tréhalose.

domestique aussi facilement que le D-glucose.

Clegg et Evans (1961) ont mis en évidence par après le rôle majeur du trehalose lors du vol chez les adultes de *Phormia régina*. Ainsi, lors d'un vol prolongé le niveau du trehalose dans l'hémolymphe décroît considérablement tandis que celui du D-glucose reste constant. Des observations semblables ont été faites chez *Locusta migratoria* (Bucher et Klingenberg, 1958) et chez la blatte *Péripianata americana* (Tréherne, 1960).

Il semble donc que les concentrations élevées du trehalose (6;74 mg/ml d'HL chez l'abeille-Arslan et al., 1986) observées dans l'hémolymphe soient une adaptation au vol. Chez les crustacés, le fait que les muscles abdominaux soient un site de synthèse important (11.7 mg/g de poids frais - Schwach, 1972) incline à penser que le trehalose interviendrait comme source d'énergie lors des mouvements brusques de l'animal, effectués grâce aux contractions de leurs muscles abdominaux. De plus, il existe un contrôle hormonal de la libération du trehalose : le niveau du trehalose dans l'hémolymphe augmente après l'injection d'un extrait de pedoncule oculaire. Enfin, le transport du trehalose de l'hémolymphe vers les organes ainsi que sa transformation en glucose sont rapides (30 minutes - Schwach, 1972).

### c) Comme intermédiaire pour la résorption ou le transfert du D-glucose

La résorption du glucose par le biais du trehalose est possible grâce à un mécanisme détaillé à la figure 16. Ce mécanisme nécessite la présence de tréhalase. Elle a été recensée chez l'écrevisse Orconectes limosus (Schwach, 1972). Elle a de même été recensée dans une grande variété d'organismes même chez ceux qui ne synthétisent ou ne stockent pas le trehalose. Arnold (1968) propose une hypothèse selon laquelle, chez les végétaux et les insectes, le trehalose pourrait fonctionner dans le mouvement des hydrates de carbone, en tant que "minitransporteur".

### 1.5.3.3. Régulation hormonale de la tréhalosémie :

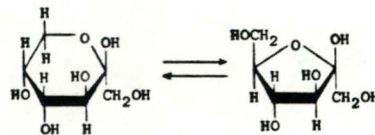
Chez les insectes et notamment chez le criquet Leurophae maderae (Wiens et Gilbert, 1967), un extrait de corpora cardiaca stimule tant la libération que la synthèse du trehalose à partir du tissu adipeux. Les auteurs en concluent à l'existence d'une hormone hyperglycémiant dans les corpora cardiaca des insectes.

Chez les Crustacés, Schwach (1972) constate une augmentation du taux de tréhalose dans l'hémolymphe et sa diminution dans le muscle abdominal de l'écrevisse Orconectes limosus suite à l'injection d'un extrait de pédoncules oculaires. De plus, comme l'injection de tréhalose radioactif dans l'hémolymphe d'animaux traités avec l'hormone, entraîne la présence d'une forte radioactivité dans la fraction "glucosée", il apparaît clairement que le tréhalose contribue à la formation du glucose de l'hémolymphe.

#### 1.5.4. Autres saccharides :

##### 1.5.4.1. Le fructose :

C'est un sucre réducteur qui peut exister sous les formes pyranose ou furanose.

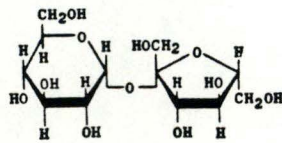


D'après Telford (1968a) ce sucre est présent occasionnellement chez Homarus americanus, mais d'autres auteurs (Mc Whinnie et Saller, 1960 ; Dean et Vernberg, 1965a) n'en ont pas trouvé. Chez Carcinus maenas, Telford (1968c) en détecte la présence par chromatographie en couche mince et estime sa concentration à 15 microgrammes par millilitre d'hémolymphe totale.

Il intervient dans le métabolisme de la chitine (fig.1) sous la forme d'un de ses dérivés, le fructose-6P. En règle générale, le fructose-6P est synthétisé à partir du glucose via la formation de glucose-6P mais le fructose pourrait pénétrer dans les cellules tégumentaires à partir de l'hémolymphe, y subir une phosphorylation et participer ainsi au métabolisme de la chitine.

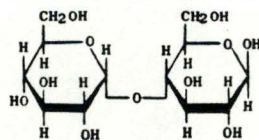
### 1.5.42 Le saccharose

C'est un sucre non réducteur formé d'une unité de glucose et d'une unité de fructose reliées entre elles par une liaison  $\alpha$ 1-4.



Ce sucre n'a que rarement été étudié chez les crustacés. Telford (1968c), travaillant sur Carcinus maenas, note la présence de trois disaccharides : le maltose, le tréhalose, et un troisième dont il estime la concentration à 50 microgrammes par millilitre d'hémolymphe totale mais dont il ne parvient pas à déterminer la nature, il pourrait s'agir du saccharose. Ce sucre fonctionnerait au même titre que le tréhalose comme minitransporteur dans le mouvement des hydrates de carbone (Arnold, 1968).

### 1.5.43. Le maltose et les oligosaccharides



Le maltose est un sucre réducteur composé de deux unités de glucose reliées en elles par une liaison  $\alpha$ 1-4. L'addition d'unités supplémentaires de glucose via une liaison de même type amène à la formation de maltotriose (trisaccharide), de maltotérose, etc...

Le maltose et ses dérivés ont été fréquemment observés dans l'hémolymphe des Crustacés. Telford (1968a) en a trouvé chez Homarus

americanus mais aussi chez Carcinus maenas (1968c).

HU (1958) et ensuite Meenakshi et Scheer (1961) notent la présence de maltose, de maltotriose et de maltotérose dans l'hémolymphe des crabes Hémigrapsus nudus et Cancer magister.

Le maltose pourrait être utilisé dans la biosynthèse de la chitine après sa conversion en glucose. Schwach (1972) a en effet enregistré 30 minutes après injection de maltose radioactif, de la radioactivité dans la chitine d'écrevisse Orconectes limosus fraîchement muée ; toutefois le taux d'incorporation y était moindre que celui du glucose et du tréhalose.

### 1.5.5. Regulation de la glycémie.

#### 1.5.5.1. Introduction :

Chez les Vertébrés, la glycémie est élevée (100 mg/100 ml de sang) mais elle est stable par le fait d'une régulation stricte. Les hormones responsables de cette régulation sont l'insuline, le glucagon (dans le foie), la nor-adrénaline, les glucocorticoïdes et enfin la somatostatine. Cette régulation est nécessaire car nombre de tissus et surtout le système nerveux central ne peuvent supporter des variations de la glycémie trop importantes.

Chez les Crustacés par contre, la glycémie est faible (2 à 10 mg/100ml) et variable et les tissus y compris le SNC tolèrent parfaitement ces variations.

#### 1.5.5.2. La HGH. (hormone hyperglycémiant):

En 1944, Abramowitz, travaillant sur Uca pugilator constate qu'une ablation des P.O. ne modifie pas la glycémie, mais que par contre, une injection d'un extrait de P.O. l'augmente brutalement dans les heures qui suivent. Il y a donc une hormone hyperglycémiant contenue dans les P.O. dont l'action s'exerce via la transformation de la phosphorylase b en phosphorylase a suite à une augmentation du taux d' AMPc ( Spindler, 1976 ) . Cette hormone est un oligopeptide (57 AA) dotée d'une certaine spécificité car l' HGH de Carcinus n'est pas active chez Orconectes et inversement.

### 1.5.5.3. Facteurs internes agissant sur la glycémie :

#### - la reproduction :

Dean (1965) a montré que la glycémie des crabes est doublée en période de reproduction. Pendant le même temps, l'activité de la glycogène synthase est à son minimum (Gomorosava, 1976).

#### - la mue :

Pendant l'intermue (C4), l'animal emmagasine des réserves importantes dans les hémocytes. Lors de la période préexuviale, il utilisera ses réserves avec comme conséquence une hyperglycémie.

### 1.5.5.4 Facteurs externes agissant sur la glycémie :

#### - La photopériode et le rythme des marées :

L'influence de ces deux facteurs a pu être démontré chez Uca par Dean (1965) où le rythme de la glycémie est dû à un effet conjugué de la photopériode et du rythme des marées

Le même phénomène appliqué aux sucres réducteurs a été démontré par Williams (1985) chez Carcinus maenas.

#### - L'exposition à l'air :

L'exposition à l'air de Libinia emarginata entraîne une augmentation de 200 % du taux de glucose dans l'hémolymphe (Kleinholz et Little, 1949). Une observation analogue a été faite chez le crabe Chasmagnathus granulata (Dos Santos, 1986).

#### - La température :

Dean (1965) a montré une augmentation de la glycémie proportionnelle à la température.

- Le stress :

Il provoque dans tous les cas une hyperglycémie : il peut être dû à la manipulation (Telford, 1968) ou au surpeuplement. Ainsi, chez Carcinus maenas, si la population s'élève à plus de 25 crabes par demi mètre carré, il s'ensuit une hyperglycémie (Johnston, 1972).

- l'alimentation :

Celle-ci modifie considérablement la glycémie. Chez Carcinus maenas, au cours d'une période de 25 jours de jeûne, les réserves de glycogène sont utilisées d'abord rapidement puis lentement jusqu'à ce qu'elles soient totalement épuisées. Lors de la renutrition, ces réserves sont entièrement reconstituées endéans les deux jours (Heath, 1970 ; Saravanan, 1981).

### 1.6. Autres types de réserves:

Dans ce travail, nous nous sommes volontairement limités à l'étude des sucres et de leur rôle dans le métabolisme énergétique. Cependant, nous sommes conscients de l'importance d'autres métabolites tels que les lipides et les protides.

#### 1.6.1. Les lipides:

Ils sont stockés en grande partie dans l'hépatopancréas. Deux particularités métaboliques distinguent les Crustacés des Vertébrés:

- d'une part, les Crustacés sont incapables d'allonger les acides gras non saturés et d'introduire une deuxième ou une troisième double liaison à l'intérieur de ceux-ci ce qui a pour conséquence que la variation des acides gras polyinsaturés ne reflète que la diversité du régime alimentaire.
- d'autre part, ce sont les phospholipides qui sont les principaux lipides circulants, notamment chez C. maenas ( Ceccaldi et Martin, 1969 ) contrairement aux Vertébrés où ce rôle est joué par les acides gras.

#### 1.6.2. Les protides:

Les composés azotés constituent une fraction importante de la masse tissulaire des Crustacés (40 à 80 % du poids total suivant les espèces). Le métabolisme azoté des Crustacés, et principalement celui des protéines,

dépend de leur nutrition, de leur croissance, de leur développement ainsi que de leur ajustement physiologique aux variations internes et externes (Pequeux, 1979).

Les acides aminés peuvent se trouver sous forme libre ou faire partie intégrante de protéines et de peptides. Sous forme libre, leur concentration est nettement plus élevée que dans les tissus correspondants des Vertébrés. Dans le cas de l'hémolymphe, Frédéricq (1901) avait déjà postulé l'existence d'un pool intracellulaire d'anions organiques constitué d'acides aminés libres pour pallier la déficience en anions inorganiques. Ce pool maintiendrait la balance osmotique (Siebers, 1972).

Chez C. maenas, la concentration en protéines est de l'ordre de 28 mg/ml. L'hémocyanine peut constituer jusqu'à 90 % de cette valeur; sa concentration varie en fonction du cycle de mue. Busselen (1970) et Cuzon (1972) ont observé que le taux de protéines varie de manière importante avec la salinité du milieu et la nutrition. Le taux d'hémocyanine diminue quant à lui avec le temps de jeûne, ce qui montre que l'hémocyanine joue aussi un rôle de protéine de réserve.

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes :

### 2.1.Choix du matériel:

#### 2.1.1. Intérêt de l'étude expérimentale des Crustacés :

De prime abord, l'étude des Crustacés peut paraître secondaire. Cependant, de nombreux pays y accordent de plus en plus de crédit étant donné leur importance économique grandissante ainsi que leur intérêt dans les domaines écologique et médical.

##### - Importance économique des Crustacés :

La chair des Crustacés s'avérant être riche en protéines et donc très nourrissante, une pêche effrénée s'en est suivie menaçant les populations de crevettes, de homards, d'écrevisses,...

L'économie de certains pays dont le Groenland et la Nouvelle-Zélande dépend en grande partie de la pêche de ces animaux. L'élevage peut apporter une solution au problème du déclin des populations mais il nécessite de nombreuses études étant donné l'existence de plusieurs stades dans le cycle larvaire des Crustacés et leur sensibilité aux infections ( Bauchau, 1966 )

##### -Importance écologique :

Les Crustacés occupent une place prépondérante dans la chaîne alimentaire ; certains d'entre eux sont carnivores tandis que d'autres constituent une source de nourriture appréciable pour de nombreux poissons. Enfin, une partie est détritivore participant ainsi au recyclage des déchets organiques ( Bauchau, 1966 ).

##### -Importance médicale :

De nombreux crabes véhiculent des hôtes dangereux pour l'homme. C'est le cas de certains crabes de rivière africains qui portent sur leurs péréiopodes les oeufs d'un Simuliidé les protégeant ainsi de la déshydratation. Or ce Simuliidé est le vecteur de la filaire Onchocerca volvulus qui provoque des cas de cécité dans des villages entiers. C'est

aussi le cas de certains crabes d'eau douce qui servent d'hôtes intermédiaires à la douve pulmonaire du genre Paragonimus. En cas d'ingestion, une pathologie comparable à la tuberculose peut se manifester.

La chitine ( polymère de N-acétylglucosamine ) de leur carapace peut être transformée en chitosan après déacétylation. Ce composé se présente sous la forme de fibres pouvant être implantées dans la peau sans risque d'allergie et avec résorption lente. De plus, les bactéries riches en lactase se développent facilement dans le chitosan. Dès lors, son administration à des individus permet une assimilation plus aisée des protéines du lait (Hackman R. H., 1971 ).

### 2.1.2. Intérêt de l'étude de l'hémolymphe de *Carcinus maenas* :

L'hémolymphe est un tissu particulièrement impliqué dans le phénomène de la mue. Celle-ci nécessite en effet un apport de matériau que seule l'hémolymphe peut garantir. Deux conceptions existent quant à l'origine de ce matériau :

- soit la quantité de chitine résorbée avant la mue est suffisante pour fournir non seulement le matériel requis pour la synthèse de la nouvelle cuticule mais aussi pour contribuer au métabolisme énergétique pendant la période où l'animal ne s'alimente pas. Cette conception est appuyée par les travaux de Urich et Speck ( 1972 ) et de Gwinn et Stevenson ( 1973 ) qui ont montré par des expériences de marquages radioactifs qu'avant la mue, l'écrevisse Orconectes limosus utilisait principalement la glucosamine libérée suite à la dégradation de l'ancienne cuticule. De plus, le contenu en chitine de l'écrevisse est élevé ( 51 mg/g du poids frais ) et l'accroissement en taille par mue est faible : 5 à 6 % ( Speck et al., 1969 ); ces conditions cadrent bien avec la conception proposée même s'il existe un léger excès de la demande sur l'offre.

- soit l'élaboration de la nouvelle cuticule nécessite l'utilisation du glycogène ( Renaud, 1949 ). En effet, chez C. maenas le contenu en chitine est faible ( 20 mg/g du poids frais ) et l'accroissement en taille par mue est important : 25 à 30 % ( Speck et al., 1969 ). Le matériel résorbé est donc insuffisant et il faut envisager un apport supplémentaire de matériau via l'hémolymphe qui en serait elle-même la source ou la véhiculerait à partir d'autres tissus.

## 2.2. Généralités :

### 2.2.1. Présentation de l'espèce étudiée :

C. maenas, appelé populairement " crabe enragé" est un Arthropode Crustacé commun dans les mers d' Europe. Les cinq paires de pattes et l'abdomen discret le rangent dans les Décapodes Brachyoures. Il appartient à la famille des Portunidae de par la présence de trois pointes mousses sur le bord du front et de cinq dents dirigées vers l'avant sur les bords antéro-latéraux de la carapace. Celle-ci est généralement verdâtre dorsalement et rougeâtre ventralement. A l'approche de l'hiver, ce crabe migre vers les eaux plus profondes. Il ne réintègre la zone de balancement de marées qu'en avril-mai; C'est l'époque à laquelle il se reproduit. Ce crabe mue régulièrement lorsqu'il est jeune mais ce phénomène se raréfie ou disparaît avec l'âge. Cette espèce est carnivore et se nourrit de poissons, de crevettes, de frai, de mollusques et de chair morte.

### 2.2.2. Récolte :

Les crabes étudiés ont été récoltés début juillet à la côte belge. Ce moment a été choisi pour le fait que c'est la seule époque de l'année à laquelle ils muent. Nous nous sommes limités à l'étude des crabes de sexe mâle, aisément reconnaissables à la forme triangulaire de leur abdomen, celui-ci étant arrondi chez les femelles. En effet, nos expériences requièrent des individus chez qui la mue constitue un évènement dominant. Or, la spermatogenèse est un phénomène moins perturbant pour la mue que l'ovogenèse qui demande une quantité importante de matériau. Parmi les individus mâles, nous n'avons retenu que ceux dont la largeur maximale du céphalothorax était comprise entre quatre et six centimètres .

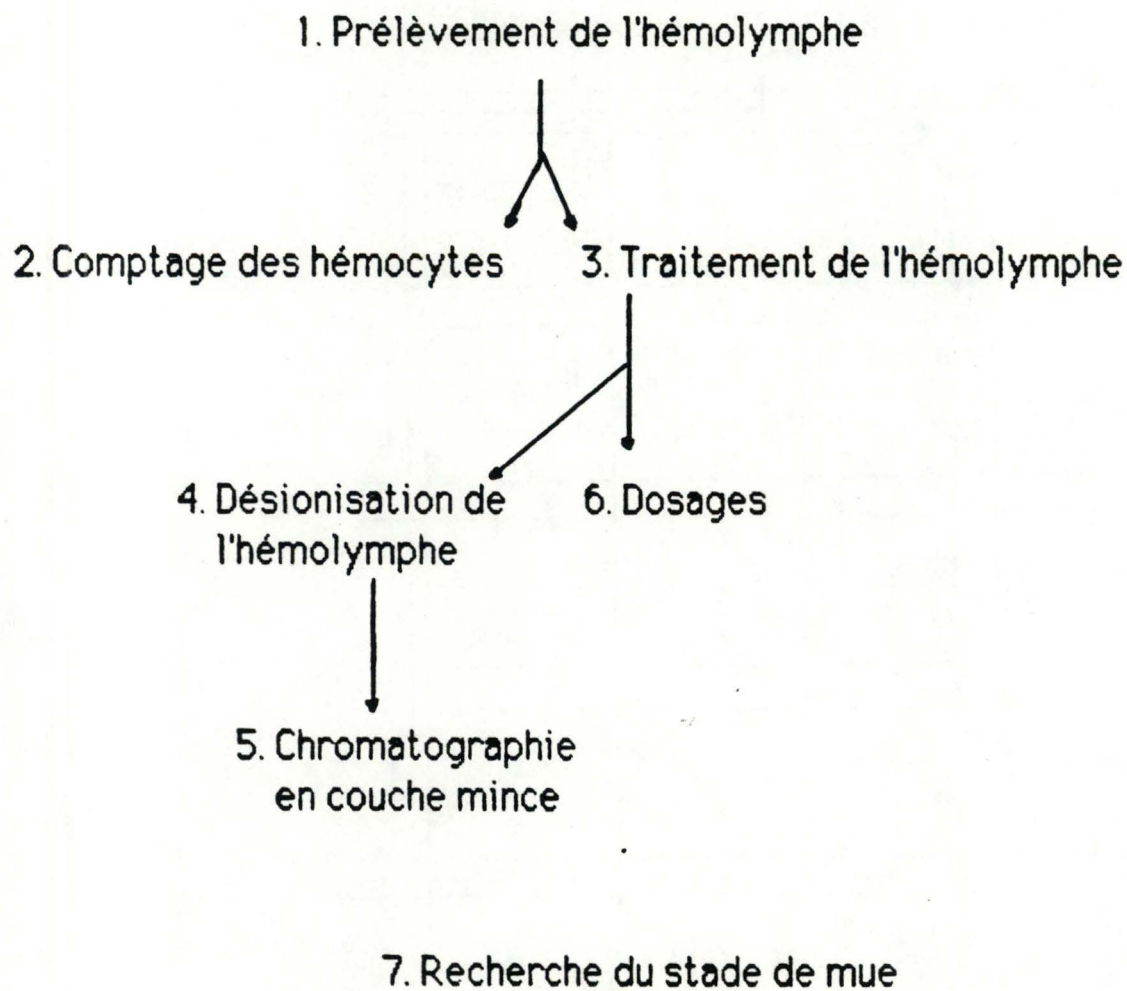
### 2.2.3. Elevage :

Ces crabes ont été ensuite maintenus plusieurs jours dans des conditions aussi proches que possible des conditions naturelles :

- salinité de l'eau : les crabes sont maintenus dans une eau de mer artificielle ( Vitakraft : 37,5 g/l ) continuellement filtrée et oxygénée.

- température : elle correspond à celle de la pièce, c.à-d. plus ou moins 20° pour la période estivale.
- éclairage : il est réalisé par la lumière naturelle.
- alimentation : les crabes sont nourris deux fois par semaine avec des moules Mytilus edulis.
- espace : la densité de la population est maintenue inférieure à douze crabes/m<sup>2</sup> afin d'éviter le stress dû à une surpopulation ( Johnston, 1972 ).

### 2.3. Démarche expérimentale générale.



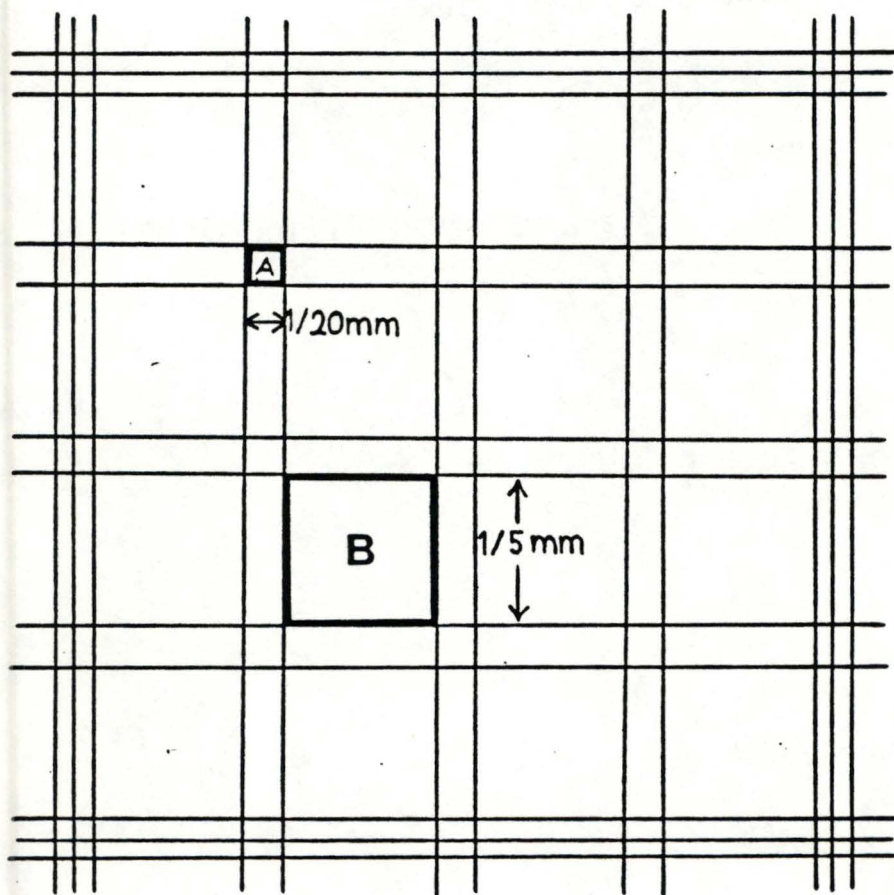


FIG. 17. Représentation d'un des 9 grands carrés  
compris dans un quadrillage de la cham-  
bre de BÜRKER

## 1. Prélèvement de l'hémolymphe :

Le prélèvement de l'hémolymphe est effectué deux jours après le nourrissage des crabes, délai qui s'avère être nécessaire pour la stabilisation de la glycémie ( Busselen, 1970 ). De plus, le prélèvement est effectué au même moment de la journée ( début d'après-midi ) pour éliminer les variations journalières du taux de glucose.

L'échantillon d'HL est prélevé à la base des pattes, au travers d'une membrane souple, la membrane articulaire. On dispose pour cela d'une seringue d'un ml ( Plastipak ) montée d'une aiguille stérile ( Microlance 23 G1 0,6-25 n° 16). La seringue a été préalablement rincée avec une solution anticoagulante constituée de NaCl 0,45 M; EDTA 10 mM ( gardée à froid ). Le NaCl permet d'obtenir un milieu isotonique à l'hémolymphe tandis que l'EDTA prévient l'agrégation des hémocytes ( Soderhäll, 1983 ). Afin de préserver l'intégrité structurale des hémocytes, on ôte l'aiguille avant de vider la seringue. Le prélèvement est répété sur le même animal en vue de disposer d'une quantité de matériel suffisante. Il est important d'utiliser une nouvelle seringue pour chaque prélèvement car des seringues de réemploi entraînent des coagulations intempestives. L'hémolymphe prélevée est diluée dans un volume fixe de la solution d'anticoagulant maintenue entre 0 et 5°.

## 2. Comptage des hémocytes :

Il s'effectue au moyen de la chambre de Bürker. Celle-ci consiste en une grosse lame de verre portant deux quadrillages gravés dans la masse et séparés par une dépression. On dépose le couvre-objet ( 24 X 50 mm ) sur les rebords humectés de la chambre de Bürker. Une goutte d'hémolymphe diluée dans l'anticoagulant est déposée sur le bord de la plaque et pénètre par capillarité entre lame et lamelle. L'espace compris entre le quadrillage et le couvre-objet est de 1/10 mm. Ce quadrillage comprend neuf grands carrés ayant chacun une surface de 1 mm<sup>2</sup> ( fig. 17 ). Ces grands carrés sont eux-mêmes composés de 16 petits carrés dont la surface est de 1/25 mm<sup>2</sup>, ce qui leur donne un volume de 1/250 mm<sup>3</sup>. La chambre de Bürker est placée sur la platine d'un microscope Zeiss standard et la préparation est observée en microscopie à fond clair. Les petits carrés dans lesquels se fait le comptage sont choisis au hasard mais de façon identique pour chaque comptage réalisé ( une diagonale de 5 des 9 grands carrés ). Les résultats du comptage nous permettent de calculer le nombre moyen

d'hémocytes pour  $1/250 \text{ mm}^3$  de mélange hémolymphe-anticoagulant et, en tenant compte de la dilution, le nombre moyen d'hémocytes par  $\text{mm}^3$  d'hémolymphe.

### 3. Traitement de l'hémolymphe :

- L'hémolymphe diluée dans l'anticoagulant est centrifugée 10 minutes à 100 g à froid; ceci permet d'isoler la fraction cellulaire. On sépare à l'aide d'une pipette " Pasteur " le plasma des hémocytes. Le plasma est ensuite déprotéinisé au moyen d'un mélange équimolaire ( 300 ul ; 0,15 M ) de solutions de  $\text{ZnSO}_4$  et de  $\text{Ba(OH)}_2$  suivie d'une centrifugation de 10 minutes à 1500 g. On récupère le plasma déprotéinisé au moyen d'une pipette " Pasteur ".

- En ce qui concerne les hémocytes, le culot obtenu est lavé dans un volume fixe d'anticoagulant et recentrifugé. Ce lavage permet d'éliminer au maximum une contamination du culot par le plasma. On resuspend le culot final dans volume fixe d'eau. Le milieu est alors soniqué 3 X 5" avec des intervalles de 15" ( Virsonic cell disrupter model n° 150 ) jusqu'à l'obtention d'une solution blanchâtre homogène. La sonication se fait à " Power 50 ". Cette solution est ensuite déprotéinée de la même manière que le plasma. Dans les deux cas, 1 ml est prélevé pour la chromatographie en couche mince ( CCM ) tandis que le reste est affecté aux différents dosages.

### 4. Désionisation :

Cette étape a été rendue nécessaire par le fait que lorsque l'échantillon a déposé sur la plaque de CCM contient des sels, ceux-ci perturbent la migration des sucres : après révélation de ces derniers, ils apparaissent non plus sous forme de taches mais sous forme de traînées, ce qui rend toute interprétation impossible. Or, l'hémolymphe de C. maenas présente les concentrations suivantes en ions ( mM/l ) : Na : 468; K : 12,1; Ca : 17,5; Mg : 23,6; Cl : 524.

Le Na et le Cl sont donc majoritaires.

Devant ce problème, nous avons essayé plusieurs techniques de désionisation mais sans succès :

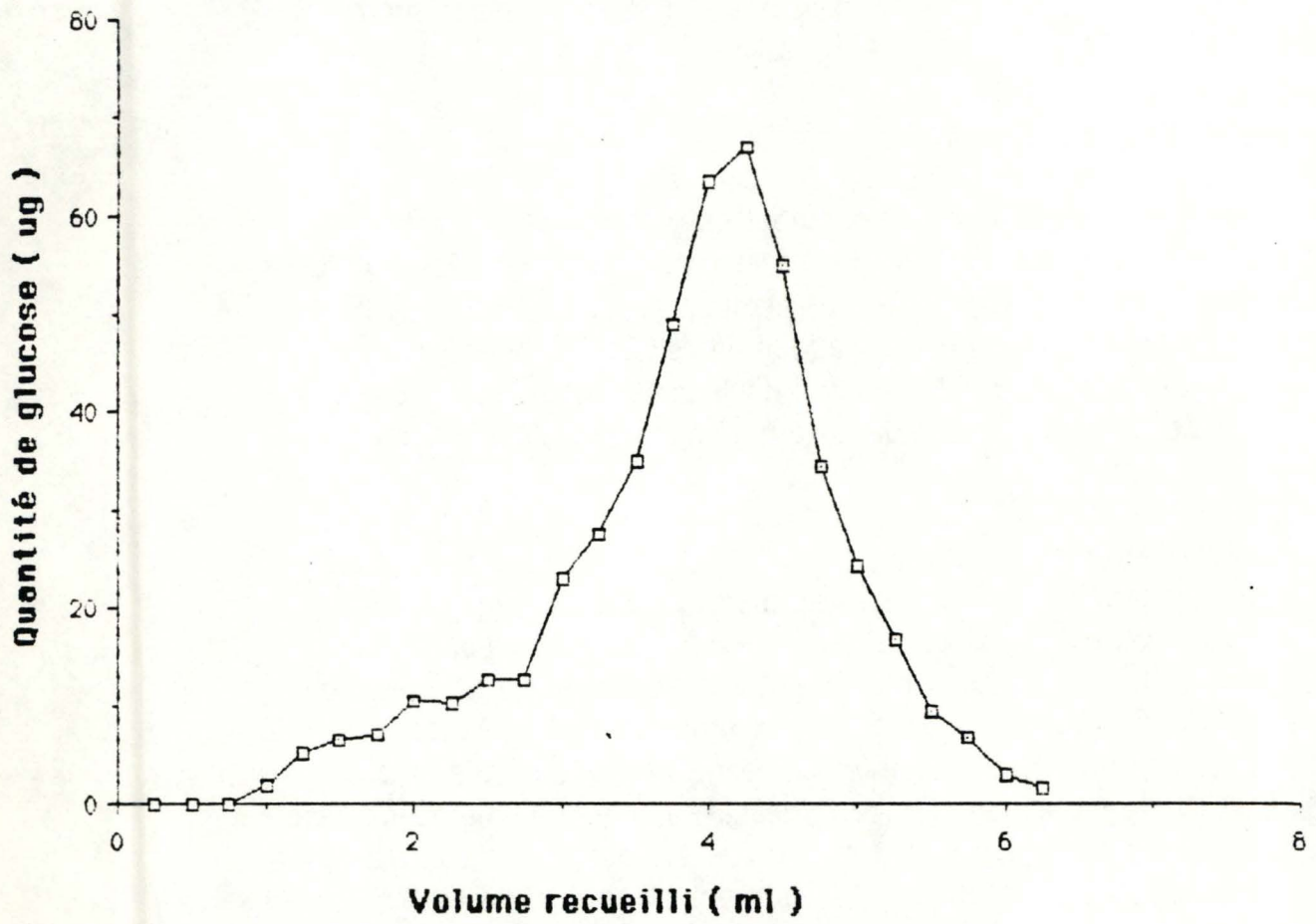


Fig.18 : quantité de glucose en fonction du volume d'éluat de la résine .

- La séparation des sucres et du NaCl sur tamis moléculaire ( Séphadex G-10 ) a permis d'obtenir deux pics distincts mais trop superposés. En conséquence, cette technique a été abandonnée.

- de même, le petit poids moléculaire des monosaccharides ne permet pas d'employer la technique de dialyse.

- nous avons ensuite employé une résine chargée à " lits mélangés " ( AG 501-X8 ); il s'agit d'un mélange en quantités équivalentes d'une résine échangeuse de cations (  $R-CH_2-N(CH_3)_3$  ) et d'une résine échangeuse d'anions (  $R-SO_3$  ). Cependant il est apparu que 50 % du glucose restait adsorbé sur la matrice de styrène-divinylbenzène (fig. 18 ). Lors de cette expérience, 1 ml d'une solution de glucose 0.1 % dans du NaCl 0.45 M a été déposé au sommet d'une colonne contenant 3 ml de la résine. Après avoir laissé pénétrer l'échantillon, nous avons recueilli des fractions de 0.25 ml. Du tampon phosphate Ph 7.4 0.4 M était utilisé comme éluant .

- nous avons finalement décidé d'employer successivement un gel échangeur d'anions ( DE 52 ) et un gel échangeur de cations ( trisacryl M SP LKB 2205-400 ). Le choix de ces gels a été guidé par leur facilité de préparation ( gels préhydratés ), leur stabilité chimique et leur adsorption non spécifique minimale. Le gel DE 52 échange un ion hydroxyle lié à son groupement fonctionnel ( diéthylaminoéthyl ) avec un anion dont l'affinité avec le groupement fonctionnel est nettement plus élevée. Le gel SP-trisacryl procède de même avec un proton et un cation.

La préparation de ces deux gels nécessite de les faire gonfler pendant 1/4 d'heure : 10 ml de SP-trisacryl sont mis à gonfler avec 10 ml de NaCl 1M tandis que 5 g de DE 52 sont mis à gonfler avec 30 ml d'eau. Il est nécessaire de mélanger constamment pour permettre une bonne hydratation. On dépose ensuite chaque gel hydraté dans une pipette ( 5 ml ) dont le fond a été préalablement obturé au moyen de laine de verre surmontée de quelques billes. On rajoute du gel jusqu'à un volume de 5 ml ( volume nécessaire pour que sa capacité d'échange soit de 1 méq. ). Le gel échangeur de cations est lavé avec deux fois son volume d'HCl N, puis avec deux fois son volume d'eau. Le gel échangeur d'anions est lavé uniquement avec deux fois son volume d'eau. Lorsque cette étape de préparation est terminée, la désionisation de la fraction plasmatique ou hémocytaire peut être abordée selon le procédé suivant ( à froid ) : on dépose précautionneusement 1 ml de la fraction choisie sur le sommet du gel

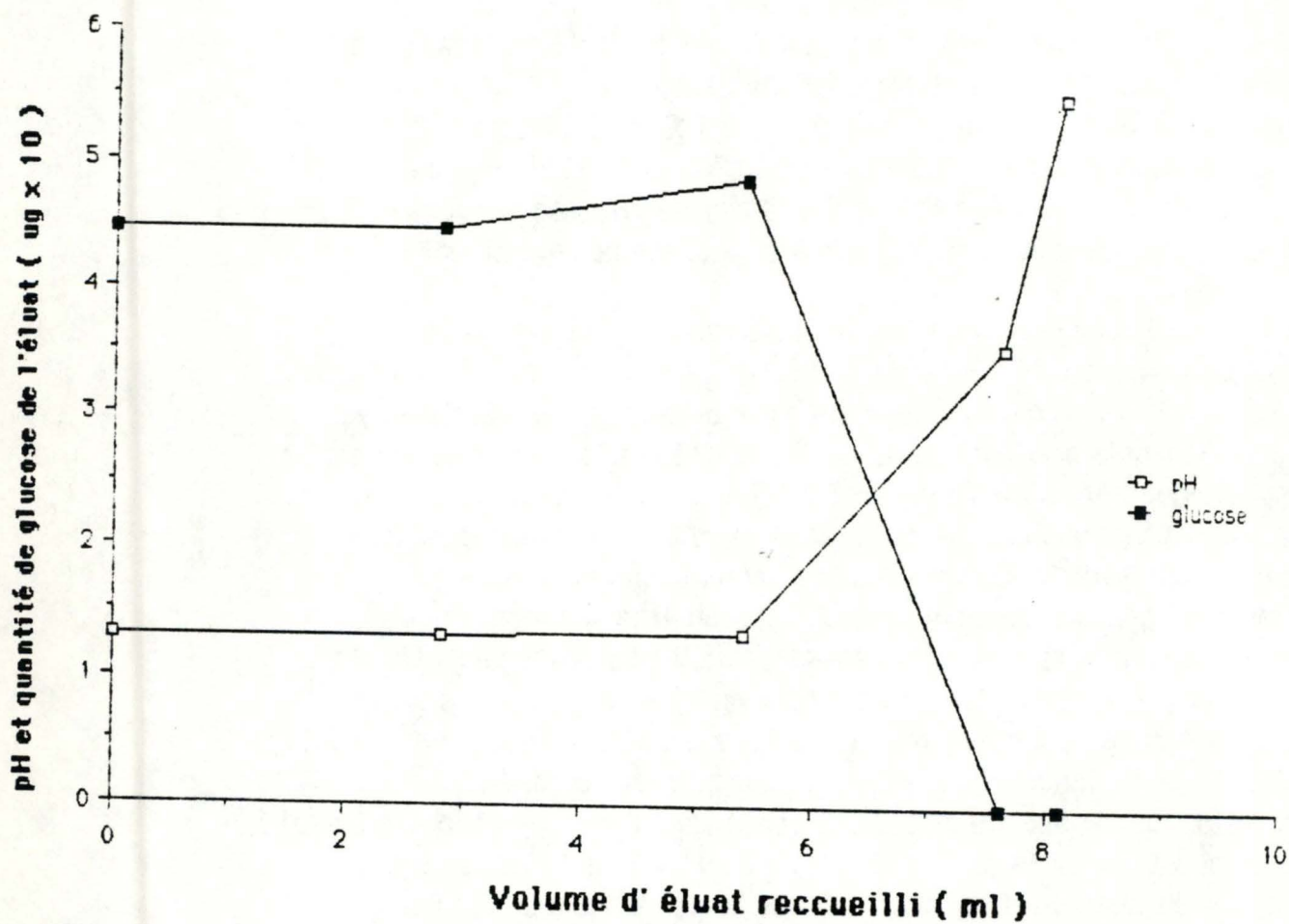


Fig.19 : pH et quantité de glucose en fonction du volume d'éluat du gel échangeur de cations.

échangeur de cations. Une fois pénétrée, elle est éluée avec de l'eau. On recueille uniquement la fraction dont le pH est acide : plus ou moins 6 ml. Lors d'une expérience préliminaire, nous avons déposé sur le gel échangeur de cations 1 ml d'une solution de glucose 0.01 % dans du NaCl 0.5 M; les résultats présentés à la fig. 19 montrent que la fraction acide contient la presque totalité du glucose (récupération = 95,2 %).

Cette fraction est ensuite déposée sur le sommet du gel échangeur d'anions; après l'avoir laissé pénétrer, on recueille 20 ml d'éluat. Ce volume correspond à la récupération complète des sucres. Ces 20 ml sont ensuite versés dans un petit récipient à fond plat et lyophilisés. Lorsque la lyophilisation est terminée, on resuspend le lyophilisat dans un volume d'eau minimal.

## 5. Chromatographie en couche mince ( CCM ) :

### 5.1. Principe de la technique :

La séparation par CCM se base sur le principe d'adsorption. Les constituants de l'échantillon sont entraînés par une phase mobile organique ( le solvant d'éluion ) à des vitesses différentes selon leur affinité pour la phase solide stationnaire. Celle-ci est constituée d'eau généralement adsorbée sur un support hydrophile tel que une couche mince de Silica-gel. La séparation de la phase aqueuse et de la phase organique s'opère d'elle-même sur le support. La silice étant capable de fixer 50 % de son poids d'eau, elle retient la phase aqueuse tandis que la phase organique poursuit sa progression. Les substances à séparer migrent à des vitesses différentes selon le rapport de leur solubilité dans les deux phases liquides, c.à-d. selon le coefficient de partage. Dans le cas particulier des sucres, les groupements hydroxyles sont très polaires; plus leur nombre est élevé, plus la substance est retenue par l'eau et plus son R<sub>f</sub> est faible; pour un même nombre de groupements hydroxyles, la vitesse de migration peut varier en fonction de la configuration spatiale de la molécule.

## 5.2. Réactifs et matériel utilisés pour la CCM :

- plaques chromatographiques : Silica Gel DC-FK 60, feuille de 20 X 20 cm ( Merck, Art. 5748 ).

- cuve chromatographique de verre, recouverte sur toute la hauteur des parois intérieures par une feuille de papier filtre imbibée du solvant d'élution, ce qui assure une saturation rapide et homogène de l'enceinte.

- solvant d'élution :

Composants : 2-Propanol; eau; pyridine.

Proportions respectives ( V/V ) : 60; 15; 25.

- étalons glucides :

Ils sont préparés à partir d'une solution aqueuse de chaque sucre ( 20 mM ); pour le glycogène la solution de départ était 0,01 mM. Le volume déposé sur la plaque est de 5  $\mu$ l . Après ajustement par dilutions, ce volume correspond à une quantité de :

. 10 nmôles ( plus ou moins 2  $\mu$ gr ) pour les monosaccharides ( glucose, fructose ).

. 5 nmôles pour les autres glucides, ce qui correspond à : plus ou moins 1  $\mu$ gr pour les disaccharides; 1,5  $\mu$ gr pour le maltotriose; 2  $\mu$ gr pour le maltotérose; 3  $\mu$ gr pour le maltohexose.

. 2,5  $\mu$ g pour le glycogène.

-révélateur des glucides .

Solution de naphthalène-diol 1-3 à raison de 20 mg dans 10 ml d'une solution alcoolique contenant 5 % d'acide sulfurique concentré.

## 5.3. Mode opératoire :

L'emploi de la plaque de chromatographie ne nécessite aucune préparation particulière. A l'aide d'une micropipette ( 20  $\mu$ l ), on dépose un volume défini de l'échantillon à analyser sur une ligne tracée à 1,5 cm du bord inférieur. On dépose de la même façon 5  $\mu$ l des différents étalons à 1,5 cm l'un de l'autre et de part et d'autre de l'échantillon. Chaque dépôt est réalisé en plusieurs fois avec chaque fois un séchage pour éviter l'étalement. Ensuite, on dépose la plaque dans la cuve. Une fois la migration achevée ( front du solvant ayant parcouru 11 cm ), on sèche la plaque et on la remet dans la cuve jusqu'à ce que le front atteigne 16 cm. Cette migration en deux étapes se justifie par le fait que, pour un solvant donné, les meilleures séparations sont obtenues après deux développements

successifs séparés par un bref séchage ( Bounias, 1976 ). Après ce dernier séchage, la révélation est effectuée par pulvérisation sur la plaque du révélateur suivie de 10 minutes de chauffage à 100°. Les glucides apparaissent en bleu sur un fond orangé uni.

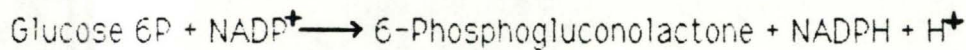
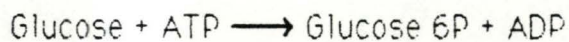
Nous avons envisagé d'employer une méthode spectrophotométrique pour déterminer la quantité de glucides présente dans les taches mais il s'est avéré qu'une estimation " de visu " suffisait pour les buts que nous nous étions fixés ( cfr chap discussion ).

## 6 Dosages :

### 6.1 Glucose :

#### 6.1.1 Principe :

Le choix du dosage décrit ci-dessous a été guidé par le fait qu'il est dix fois plus sensible que le dosage à la glucose-oxydase. De plus, il permet de doser le fructose et le glucose 6P.



En présence d'ATP et à pH 8,5, l'hexokinase ( HK ) catalyse la transformation du glucose en glucose 6P et la libération d'ADP

En présence de NADP et à pH 7,4, la glucose 6P-déshydrogénase ( G6P-DH ) catalyse la transformation du glucose 6P en 6-phosphogluconolactone ainsi que la réduction du NADP<sup>+</sup> en NADPH + H.

L'extinction à 340 nm est directement proportionnelle à la quantité de NADPH formé si les conditions de concentration des substrats, des cofacteurs et des enzymes sont adéquates.

Sensibilité du test :

Dans les conditions expérimentales choisies, une densité optique ( DO ) de 1000 correspond à 321 nmôles de NADP réduit ( équivalent au glucose ).

Le calcul suivant est donc nécessaire pour connaître la concentration du glucose ( PM = 198.18 ) :

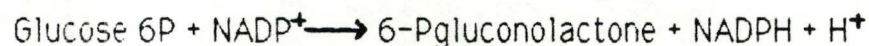
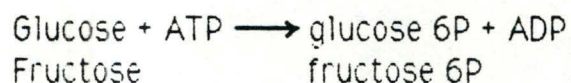
$$DO \times 321 / 1000 \times 198,18 \times \text{dilution} = \mu\text{g/ml}$$

- Fructose et fructose 6P :

Ce dosage est effectué en ajoutant dans le milieu une phosphoglucosomérase ( PGI ); cette enzyme catalyse la transformation du fructose 6P en glucose 6P.

Cette méthode ne nous permet pas de faire la distinction entre le fructose et le fructose 6P tout en dosant simultanément le glucose et le glucose 6P.

En conclusion, le dosage du glucose, du glucose 6P et du fructose peut être résumé comme suit .



-Saccharose .

Nous avons employé une invertase (  $\beta$ -fructosidase ) qui catalyse la transformation du saccharose en fructose et en glucose à PH 4,5. Le glucose est ensuite dosé selon la méthode précédemment décrite.

-Maltose et oligosaccharides ( Boehringer, 1970 ) :

Nous avons employé une maltase (  $\alpha$ -glucosidase ) qui catalyse la transformation du maltose et des oligosaccharides en glucose à pH 6,0.

- Sucres comprenant des liaisons  $\alpha$ 1-4 ou  $\alpha$ 1-6 :

L'amyloglucosidase hydrolyse à pH 5,0 tous les sucres qui comprennent des liaisons  $\alpha$ 1-4 ou  $\alpha$ 1-6; c'est le cas du glycogène, des glucides précédemment cités mais ce n'est pas le cas du tréhalose dont la liaison est de type  $\alpha$ 1-1'.

Cette particularité nous permet de connaître la concentration du tréhalose par différence entre ce dosage et celui des sucres réducteurs ( v. p. 40 )

#### 6.1.2. Mode opératoire :

- Répartition d'un échantillon de plasma pour les dosages :

100  $\mu$ l : glucose, fructose.

100  $\mu$ l : maltose.

100  $\mu$ l : saccharose.

100  $\mu$ l : glucides comportant des liaisons  $\alpha$ ,1-4 ou  $\alpha$ ,1-6.

- Répartition d'un échantillon d'hémocytes :

200  $\mu$ l : glucose, glucose 6P, fructose.

200  $\mu$ l : saccharose.

200  $\mu$ l : maltose.

50  $\mu$ l : glucides comportant des liaisons  $\alpha$ ,1-4 ou  $\alpha$ ,1-6.

- Transformation du maltose et des oligosaccharides en glucose :

On ajoute 250  $\mu$ l de tampon acétate pH 6,0 à l'échantillon puis on ajoute 10  $\mu$ l ( 0,4 U. ) de maltase. On incube à 37° C. pendant une heure.

- Transformation du saccharose en glucose et en fructose :

On ajoute 250  $\mu$ l de tampon acétate pH 4,5 à l'échantillon, puis on ajoute 10  $\mu$ l ( 0,4 U. ) d'invertase. On incube une heure à 37° C.

- Transformation des glucides comportant des liaisons  $\alpha$ 1-4 ou  $\alpha$ 1-6 en glucose :

On ajoute 100  $\mu$ l d' amyloglucosidase ( solution à 1 mg/5ml de tampon acétate M pH 5,0 ). On porte à 1 ml avec de l'eau et on incube une heure à 37° C.

- Mise à pH des solutions :

Lorsque les échantillons ont incubé, ils sont amenés à pH 7,8 avec les tampons suivants :

. Tampon Tris-HCl M pH 7,8 dans le cas du maltose et du saccharose.

. Tampon Tris-HCl M pH 8,1 pour les glucides comportant des liaisons  $\alpha$ ,1-4 ou  $\alpha$ ,1-6.

Le volume des cuvettes est porté à 1,5 ml avec le tampon approprié ou avec de l'eau dans le cas du glucose.

- Préparation du milieu de réaction :

ATP 50 mM : 0,2 ml ; concentration finale = 5 mM.

Mg (Ac)<sub>2</sub> 100 mM : 0,1 ml ; cc finale = 5 mM.

B-mercaptoéthanol 0,1 M : 0,1 ml ; cc finale = 5 mM.

NADP 10 mM : 0,1 ml ; cc finale = 0,5 mM.

Ce milieu est ajouté aux solutions tamponnées. Le volume final est donc de 2 ml.

- Dosage proprement dit :

Les solutions sont placées dans des cuvettes en verre ( "path" 1 cm ) de 3 ml. Le dosage s'effectue à 25° C. au moyen d'un spectrophotomètre ( LKB-ULTROSPECK 4050 ).

. Dans le cas du plasma, la marche à suivre est la suivante :

Ajouter 10  $\mu$ l ( 0,3 U ) d'HK à la solution

Régler l'absorbance à 0.

Ajouter 10  $\mu$ l ( 0,3 U. ) de G6P-DH.

Pour doser le fructose, il suffit d'ajouter 10  $\mu$ l ( 0,3 U. ) de PGI lorsque l'absorbance due au glucose n'augmente plus.

. Dans le cas des hémocytes, les modifications suivantes sont apportées :

Mise à 0 de l'absorbance.

Ajouter 10  $\mu$ l de G6P-DH ( dosage du G6P ).

Ajouter 10  $\mu$ l d'HK lorsque l'absorbance demeure stable ( dosage du glucose).

Ajouter 10  $\mu$ l de PGI lorsque l'absorbance demeure stable ( dosage du fructose 6P ).

Rm. : les valeurs réelles du maltose et du saccharose sont obtenues en soustrayant la valeur du glucose de celle obtenue pour le maltose et le saccharose.

## 6.2. Glycogène.

Ce dosage s'effectue en fixant le glycogène sur du papier Whattman ( E 31 ) qui a la propriété de le garder sélectivement lorsqu'il est lavé en milieu alcool 60 %.

Ce papier est découpé en carrés de 2 cm de côté. On y dépose 50  $\mu$ l de l'échantillon à analyser.

On réalise un lavage de ce papier à froid dans une solution 2/3 alcool-1/3 eau pendant 20 minutes. On répète ce lavage deux fois mais à température ambiante.

Lorsque ces lavages sont terminés, on sèche le papier à l'acétone. On le roule et on le plonge dans 1 ml de la solution d'amyloglucosidase ( v. p. 30 ). On incube une heure à 37° C.

Après l'incubation, on retire le papier et on dose le glucose sur 500  $\mu$ l selon la méthode décrite précédemment.

## 6.3. Sucres réducteurs ou composés d'unités réductrices :

### 6.3.1. Principe du dosage :

Le dosage des sucres réducteurs se fait au moyen d'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.

### 6.3.2. Préparation du réactif à l'anthrone :

On ajoute à 30 ml d'eau bidistillée 120 mg d'anthrone. On ajoute ensuite 60 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré ( 36 N ) à cette suspension ce qui a pour effet de solubiliser l'anthrone. Ce réactif ramené à température ambiante n'est stable qu'une semaine environ.

### 6.3.3. Mode opératoire:

Ce dosage se fait sur 1 ml d'échantillon. On lui ajoute 2 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré ( 36 N ) à froid, puis 3 ml de réactif à l'antrone et on laisse incuber le tout 10 minutes à 100°. 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 µg. Chaque mesure a été réalisée en double. Les étalons correspondent à 5, 10, 25 et 50 µg mesurés dans les mêmes conditions.

### 7. Recherche pratique des stades de mue :

- Le seul critère objectif pour différencier la postmue des stades suivants est l'absence ou la présence de la couche membraneuse. Ce test nécessite la mise à mort du crabe et la découpe de la carapace dorsale. Lorsqu'on la casse en deux, deux possibilités se présentent :

. soit les deux morceaux se séparent et le crabe est donc en postmue. Pour plus de précision, on suit la clef suivante :

Exosquelette mou : stade A

Méropodites pouvant être courbés : propodites des pinces souples : B1  
propodites des pinces rigides : B2

Méropodites aplatissables : C1

Méropodites durs : C2

Exosquelette rigide : C3

. soit les deux morceaux sont retenus par une peau qui est la couche membraneuse. Le crabe n'est plus en postmue.

- Pour différencier l'intermue de la prémue, il est nécessaire de faire l'examen de l'épipodite branchial externe. Deux cas peuvent se présenter :

a) L'épiderme est collé à l'exosquelette. Dans ce cas, le crabe est encore en intermue.

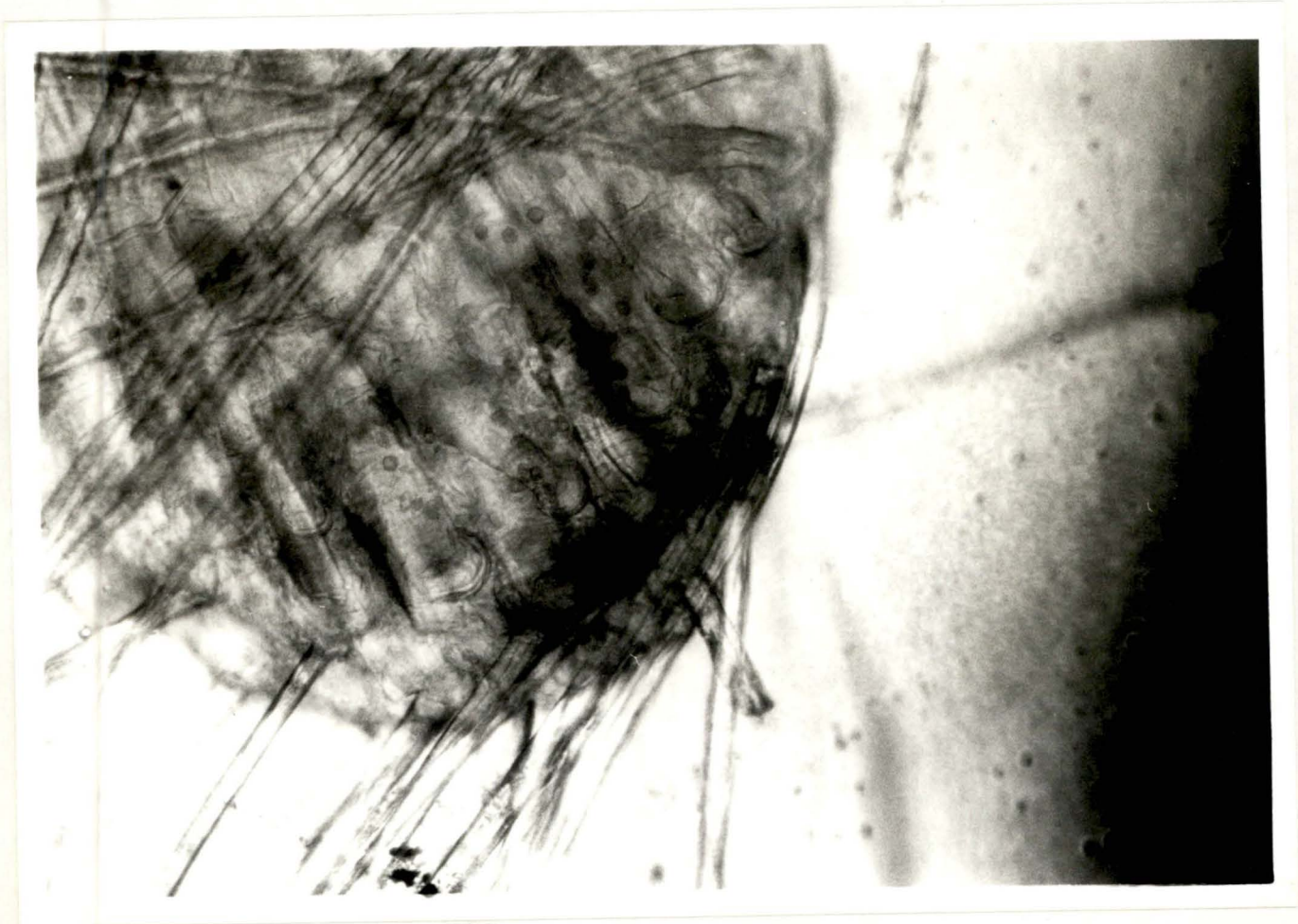


Photo 4. : épipodite branchial externe ( G = 800 )

b) L'épiderme est décollé de l'exosquelette. Dans ce cas, le crabe est en prémue. Ceci s'observe aisément lors de l'examen microscopique de l'épipodite branchial externe ( photo 4 ); celui-ci porte à son extrémité de très nombreuses soies. L'examen de l'un d'entre eux révèle très bien la rétraction de l'épiderme ( photo 5 ).

Diverses observations permettent de préciser le stade :

- 1) Test du dactylopodite : si on le casse, les deux morceaux se séparent aisément et l'épiderme sous-jacent apparaît décollé de l'exosquelette. Le crabe est au moins au stade D2 .
- 2) Si les lignes exuviales sont fragiles, le crabe est au stade D3 et si elles sont ouvertes, le crabe est au stade D4.

- Enfin, l'exuviation se manifeste par le soulèvement de l'ancienne carapace et le déplissement du nouvel exosquelette.

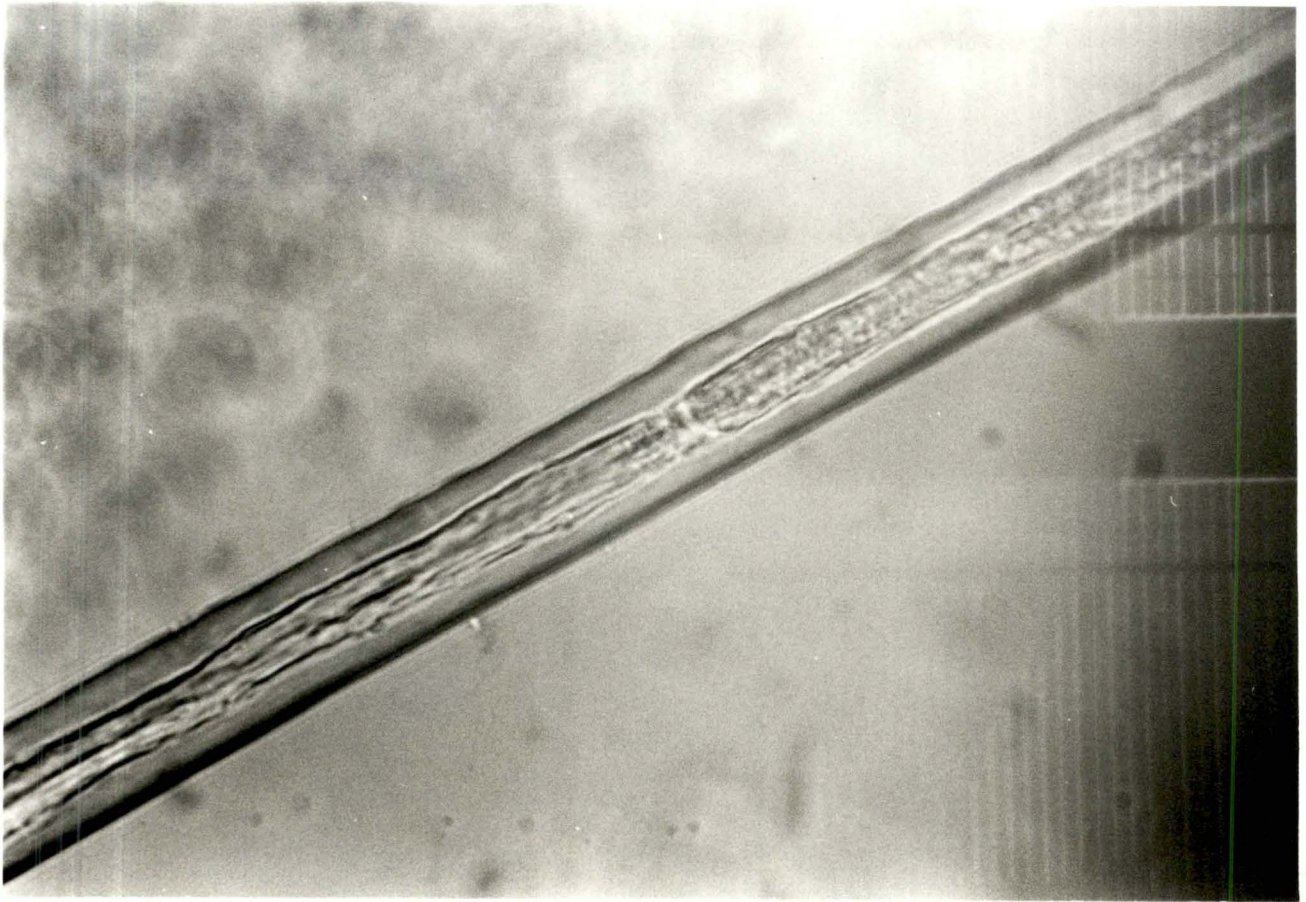


Photo 5. : soie de l'épipodite branchial externe ( G = 3200 )

## **Chapitre 3 : résultats et discussion :**

### **3.1. Chromatographie en couche mince ( CCM ) :**

#### **3.1.1. But de la méthode :**

Le dosage des différents glucides par la méthode de la G6P-DH présentait dès le départ quelques points criticables. Ainsi, cette méthode ne nous permet pas de doser directement le tréhalose dont la concentration n'est connue que par la différence entre les résultats obtenus par le dosage à l'anthrone et ceux obtenus par le dosage à l'amyloglucosidase.

De plus, l'utilisation de la maltase ne nous donne pas seulement la concentration en maltose mais aussi celle des oligosaccharides ( maltotriose, ... ).

Pour combler les lacunes de ce type d'identification, nous avons décidé d'employer la technique de CCM. Elle apporte une solution aux problèmes évoqués précédemment en permettant d'identifier directement le tréhalose et les oligosaccharides lorsque ceux-ci sont présents.

En outre, elle permet de vérifier les résultats des dosages biochimiques à la fois sur le plan qualitatif et quantitatif :

- Au point de vue qualitatif, elle permet de vérifier l'existence des sucres dosés. Elle peut de plus éventuellement révéler la présence d'autres sucres , ce qui n'a toutefois pas été le cas ici.

- Au point de vue quantitatif, elle permet une vérification grossière des concentrations obtenues par les dosages enzymatiques; cette technique est en effet semi-quantitative.

#### **3.1.2. Résultats :**

Pour chaque plaque chromatographique, il a été procédé à deux migrations successives du solvant d'éluion; comme dans ce cas, la notion de Rf perd une partie de son intérêt, il devient préférable de désigner la mobilité relative ( MR ) des composants via le rapport entre la hauteur qu'ils atteignent en fin de migration et celle du composant migrant le plus rapidement, lequel dans notre cas, est le saccharose.

Pour faciliter la comparaison des deux méthodes, les résultats des dosages biochimiques sont repris en parallèle ( fig. 21, 24, 27 ).

Etalons	MR
1. Maltotriose	0,83
2. Tréhalose	0,86
3. Maltose	0,92
4. Glucose	0,97
5. Fructose	0,95
6. Saccharose	1
Echantillon	
Tache n°2	0,86
Tache n°4	0,97
Tache n°6	0,99

Fig.20 : mobilités relatives des sucres - échantillon de plasma - stade C3.

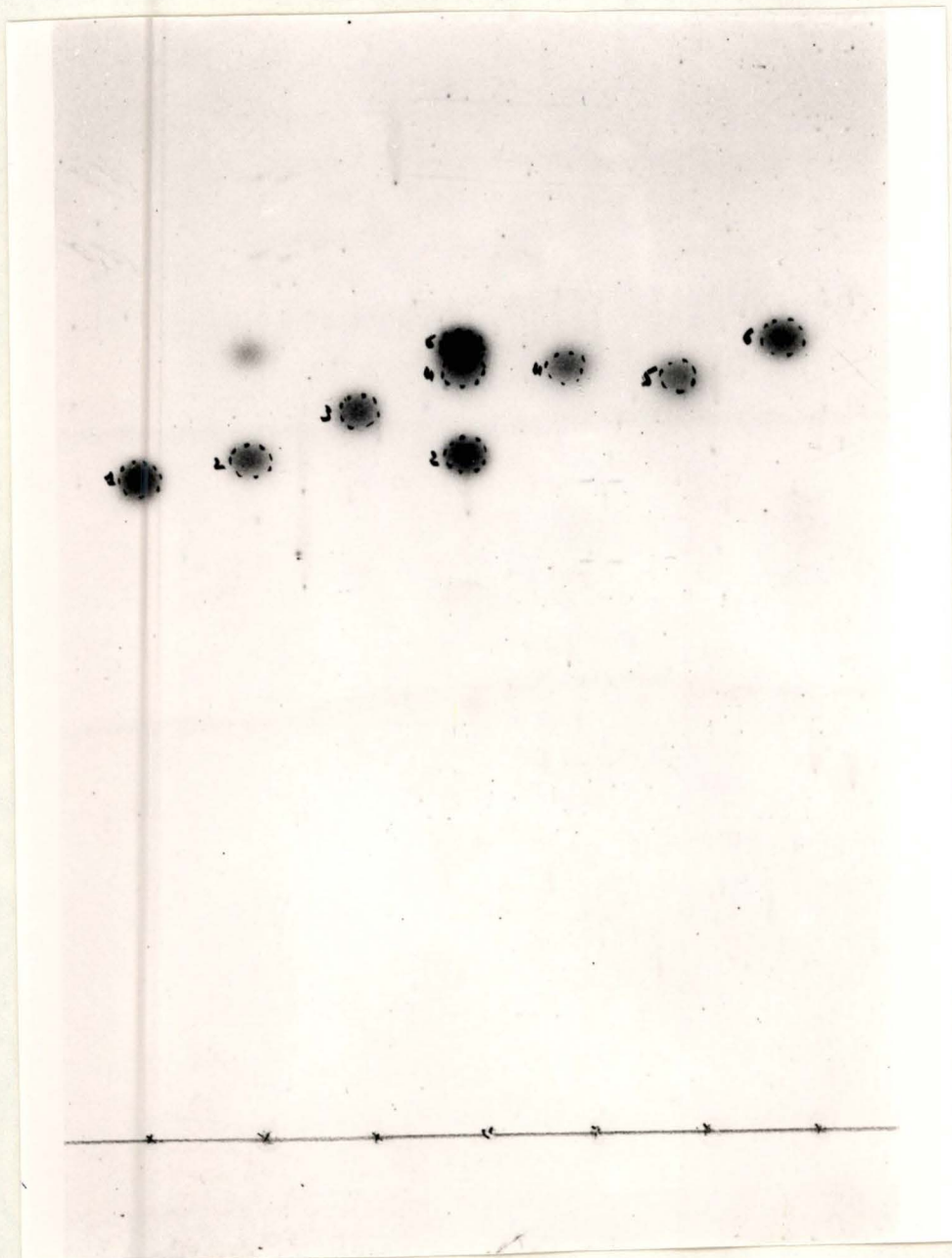


Photo 6. : chromatographie  
d'un échantillon de plasma d'un  
crabe au stade C3

µg/ml d'hémolymphe totale	Plasma	Hémocytes
Glucose	32,9	6,8
Glucose 6P	n.d.	0,1
Fructose-fructose 6P	4,6	1,0
Glycogène	n.d.	44,6
Maltose	n.d.	12,0
Saccharose	25,3	n.d.
Amyloglucosidase α1-4	64,3	63,0
α1-6		
Sucres totaux (anthrone)	87,2	62,3
Tréhalose	22,9	n.d.
Nombre d'hémocytes 10 <sup>9</sup> /ml d'hémolymphe totale	/	15,0

Fig.21 : dosages enzymatiques des sucres au stade C3.

Etalons	MR
1. Maltotétrose	0,85
2. Maltotriose	0,92
3. Tréhalose	0,93
4. Maltose	0,96
5. Glucose	0,98
6. Fructose	0,97
7. Saccharose	1
8. Malthexose	0,66
9. Glycogène	0
Echantillon	
Tache n°1	0,98
Tache n°2	0,95
Tache n°3	0,90
Tache n°4	0,83
Tache n°5	0

Fig.22 : mobilités relatives des sucres - échantillon d'hémocytes - stade C3.

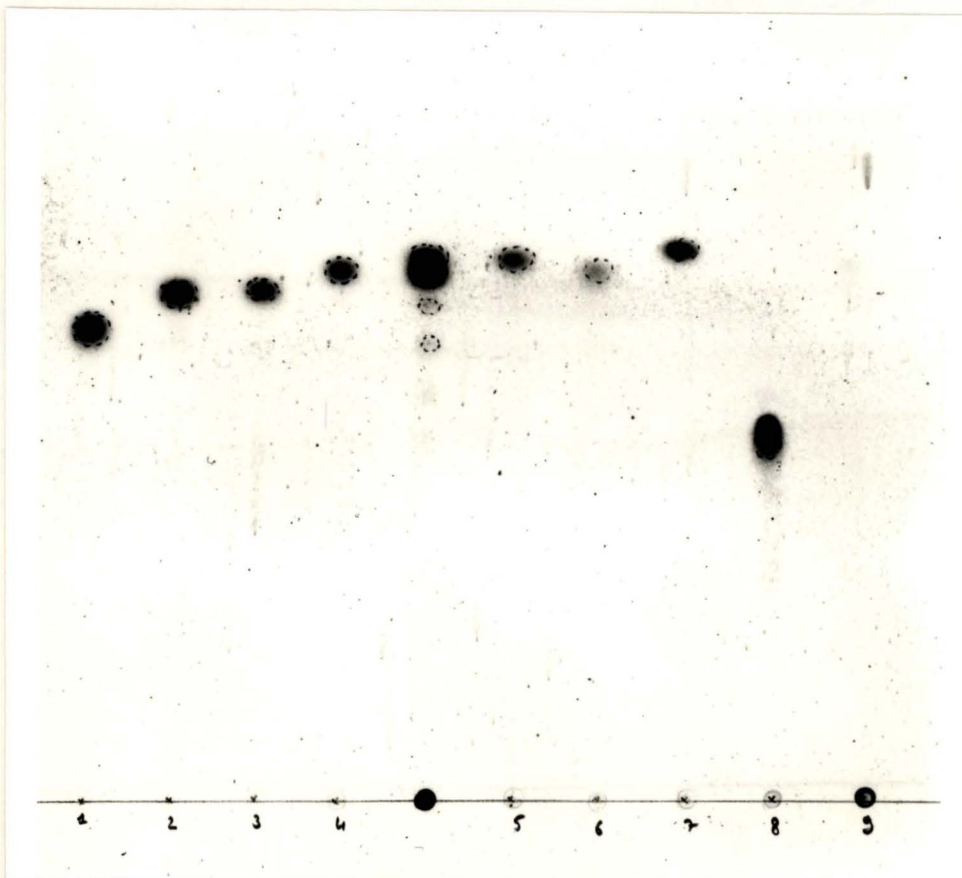


Photo 7. : chromatographie d'un échantillon d'hémocyte d'un crabe au stade C3

### 3.1.2.1. Crabe au stade C3 :

#### - Plasma :

. Aspect qualitatif ( fig. 20-photo 6 ) :

Par comparaison des MR, nous pouvons affirmer que les taches observées sont du tréhalose, du glucose et du saccharose. Aucune trace d'autres sucres n'est décelée.

. Aspect quantitatif :

Pour cet aspect, il est nécessaire de rappeler le schéma expérimental : 1 ml de plasma ( dil. = 7/3 ) est désionisé et resuspendu dans 200  $\mu$ l après lyophilisation. Un échantillon de 40  $\mu$ l est alors déposé sur la plaque de CCl<sub>4</sub>.

Pour rappel, les quantités d'étalon déposées sont de 2  $\mu$ g pour les monosaccharides, 1  $\mu$ g pour les disaccharides, 1,5  $\mu$ g pour le maltotriose, 2  $\mu$ g pour le maltotérose, 3  $\mu$ g pour le maltohexose et 2,5  $\mu$ g pour le glycogène. A partir de ces données, on peut estimer la concentration des sucres de la manière suivante :

+ Saccharose : estimation de la quantité contenue dans la tache :  $\pm 3 \mu$ g

$3 \times 5 \times 7/3 = 35 \mu$ g/ml ( dosage : 25,3  $\mu$ g/ml ).

+ Glucose : tache =  $\pm 2 \mu$ g

$2 \times 5 \times 7/3 = 23 \mu$ g/ml ( d. = 32,9  $\mu$ g/ml ).

+ Tréhalose : tache =  $\pm 2 \mu$ g

$2 \times 5 \times 7/3 = 23 \mu$ g/ml ( d = 22,9 mg/ml )

Ces résultats confortent donc ceux obtenus par dosage enzymatique.

#### - Hémocytes

. Aspect qualitatif ( fig. 22-photo 7 ) :

Par comparaison des MR, nous pouvons affirmer que les taches obtenues sont du glucose, du maltose, du maltotriose, du maltotérose et du glycogène.

Le dosage faisant intervenir la maltase correspond donc non seulement à du maltose mais également à du maltotriose et du maltotérose.

Etalons	MR
1. Maltotriose (°)	0,85
2. Tréhalose (°)	0,88
3. Maltose (°)	0,93
4. Glucose	0,98
5. Fructose	0,96
6. Saccharose	1
Echantillon	
Tache n°2	0,87
Tache n°4	0,98

Fig.23 : mobilités relatives des sucres - échantillon de plasma - stade C4.

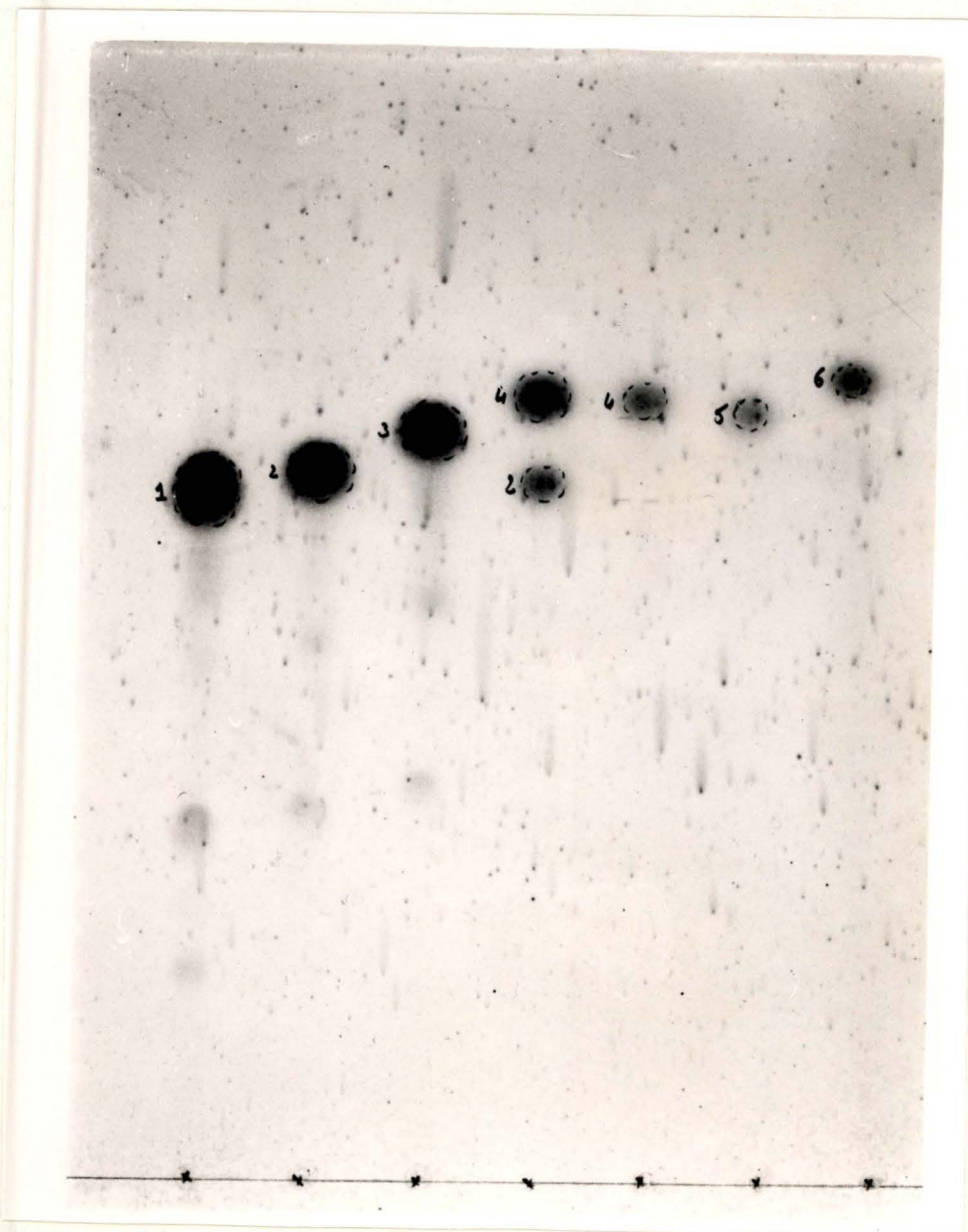


Photo 8. : chromatographie d'un échantillon de plasma d'un crabe au stade C4

. Aspect quantitatif :

Schéma expérimental : 1 ml ( concentration = 1,5 ) est désionisé et resuspendu dans 200  $\mu\text{l}$  après lyophilisation. Un échantillon de 40  $\mu\text{l}$  a été déposé sur la plaque de CCM.

Estimation de la concentration des sucres de l'échantillon :

+ Glucose : tache =  $\pm 2 \mu\text{g}$

$2 \times 5 \cdot 1,5 = 6,7 \mu\text{g/ml}$  ( d =  $6,8 \mu\text{g/ml}$  )

+ Maltose : tache =  $\pm 1,5 \mu\text{g}$

$1,5 \times 5 \cdot 1,5 = 5 \mu\text{g/ml}$

Maltotriose : tache =  $\pm 0,25 \mu\text{g}$

$0,25 \times 5 \cdot 1,5 = 1 \mu\text{g/ml}$

Maltotétraose : tache =  $\pm 0,25 \mu\text{g}$

$0,25 \times 5 \cdot 1,5 = 1 \mu\text{g/ml}$

La somme du maltose et des deux oligosaccharides équivaut donc à  $7 \mu\text{g/ml}$   
( d =  $12 \mu\text{g/ml}$  )

+ Glycogène : tache =  $\pm 10 \mu\text{g}$

$10 \times 5 \cdot 1,5 = 34 \mu\text{g/ml}$  ( d. =  $44,6 \mu\text{g/ml}$  ).

Les résultats de la CCM confortent ceux des dosages enzymatiques et démontrent en plus la présence d'oligosaccharides dans l'hémocyte au stade C3.

### 3.1.2.2. Crabe au stade C4.

- Plasma .

. Aspect qualitatif ( fig.23-photo 8 ) .

Par comparaison des MR, nous pouvons affirmer que les taches observées correspondent à du tréhalose et du glucose, ce qui est en accord avec les dosages enzymatiques.

. Aspect quantitatif .

Schéma expérimental : 1 ml de plasma ( dil. = 2 ) est désionisé et après lyophilisation resuspendu dans 150  $\mu\text{l}$ . Un échantillon de 25  $\mu\text{l}$  a été déposé sur la plaque.

Estimation de la concentration des sucres de l'échantillon:

+Glucose : tache =  $\pm 5 \mu\text{g}$



µg/ml d'hémolymphe totale	Plasma	Hémocytes
Glucose	59,7	3,9
Glucose 6P	n.d.	1,3
Fructose-fructose 6P	n.d.	n.d.
Glycogène	n.d.	118,1
Maltose	n.d.	2,0
Saccharose	n.d.	n.d.
Amyloglucosidase α 1-4 α 1-6	59,0	124,0
Sucres totaux (anthrone)	69,7	170,2
Tréhalose	10,7	46,2
Nombre d'hémocytes $10^9$ /ml d'hémolymphe totale	/	25,9

Fig.24 : dosages enzymatiques des sucres au stade C4.

Etalons	MR
1. Maltotétrose	0,79
2. Maltotriose	0,86
3. Tréhalose	0,88
4. Maltose	0,93
5. Glucose	0,97
6. Fructose	0,95
7. Saccharose	1
8. Maltohexose	0,64
9. Glycogène	0
Echantillon	
Tache n°1	0,97
Tache n°2	0,88
Tache n°3	0,73
Tache n°4	0,64
Tache n°5	0

Fig.25 : mobilités relatives des sucres - échantillon d'hémocytes - stade C4.

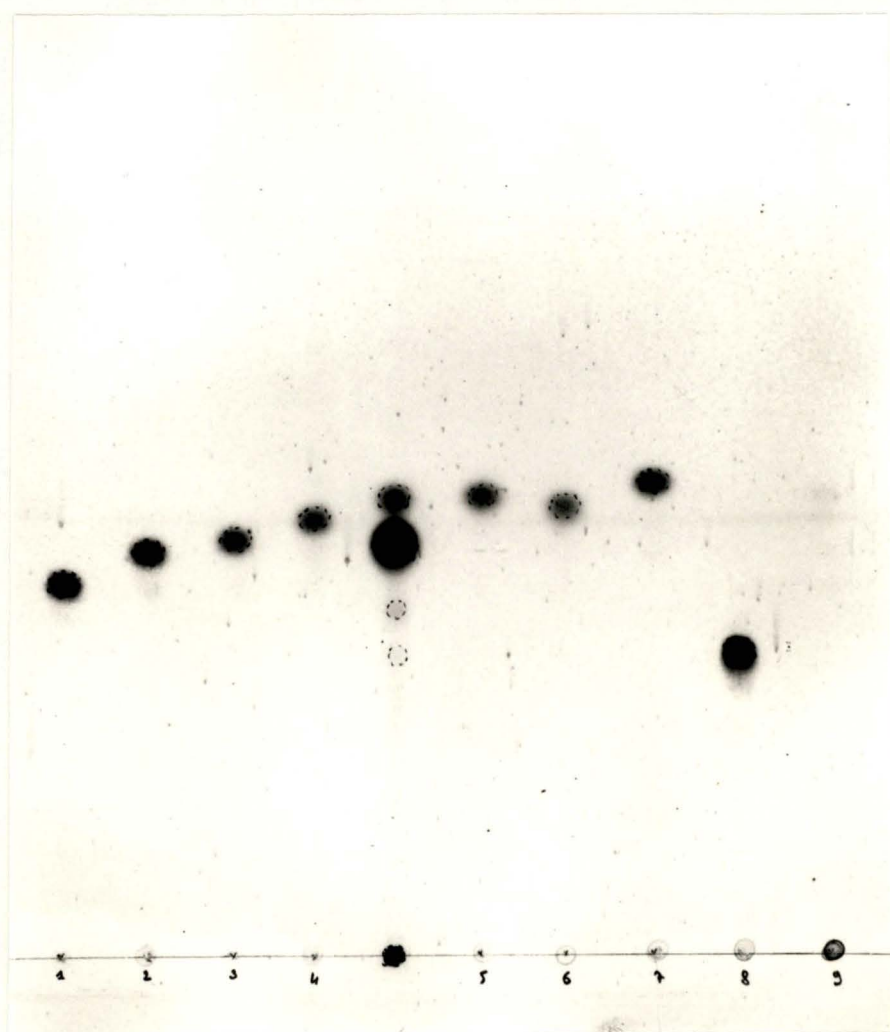


Photo 9 : chromatographie d'un échantillon d'hémocyte d'un crabe au stade C4

$$6 \times 5 \times 2 = 60 \mu\text{g/ml ( d. = 59,7 } \mu\text{g/ml )}$$

+Tréhalose : tache =  $\pm 1 \mu\text{g}$

$$1 \times 5 \times 2 = 10 \mu\text{g/ml ( d = 10,7 } \mu\text{g/ml )}$$

Les estimations de la CCM s'avèrent donc très proches des valeurs obtenues par dosage enzymatique.

- Hémodocytes :

. Aspect qualitatif ( fig.25-photo 9 ) :

Par comparaison des MR, nous pouvons admettre la présence de glucose, de tréhalose et de maltohexose. La tache n°3 correspond à une mobilité relative comprise entre celle du maltotétraose et celle du maltohexose : il s'agirait donc du maltopentose. Les sucres dosés via le traitement à la maltase pourraient donc être composés de maltopentose et de maltohexose.

. Aspect quantitatif :

Schéma expérimental : 1 ml ( dil. = 1,5 ) est désionisé et resuspendu dans 100 $\mu\text{l}$  après lyophilisation. Un échantillon de 40  $\mu\text{l}$  a été déposé sur la plaque.

Estimation de la concentration des sucres de l'échantillon :

+ Glucose : tache =  $\pm 1 \mu\text{g}$

$$1 \times 2,5 \times 1,5 = 3,75 \mu\text{g/ml ( d. = 3,9 } \mu\text{g/ml )}$$

+ Trehalose : tache =  $\pm 10 \mu\text{g}$

$$10 \times 2,5 \times 1,5 = 37,5 \mu\text{g/ml ( d. = 46,2 } \mu\text{g/ml )}$$

+ Maltohexose : tache =  $\pm 0,25 \mu\text{g}$

$$0,25 \times 2,5 \times 1,5 = 1 \mu\text{g/ml}$$

+ Maltopentose : tache =  $\pm 0,25 \mu\text{g}$

$$0,25 \times 2,5 \times 1,5 = 1 \mu\text{g/ml}$$

La somme de ces deux oligosaccharides équivaut donc à 2  $\mu\text{g/ml}$  ( d. = 2,0  $\mu\text{g/ml}$  ). Il faut donc en conclure que les sucres dosés via le traitement à la maltase était en fait composés pour moitié de maltopentose et pour moitié de maltohexose.

+ Glycogène : tache  $\approx 15 \mu\text{g}$

$$15 \times 2,5 \times 1,5 = 56 \mu\text{g/ml ( d. = 118,6 } \mu\text{g/ml )}$$

Les résultats de la CCM appuient donc ceux du dosage sauf en ce qui

Etalons	MR
1. Maltotriose	0,84
2. Tréhalose	0,87
3. Maltose	0,93
4. Glucose	0,98
5. Fructose	0,96
6. Saccharose	1
Echantillon	
Tache n°2	0,87
Tache n°3	0,93
Tache n°4	0,98

Fig.26 : mobilités relatives des sucres - échantillon de plasma - stade D3.

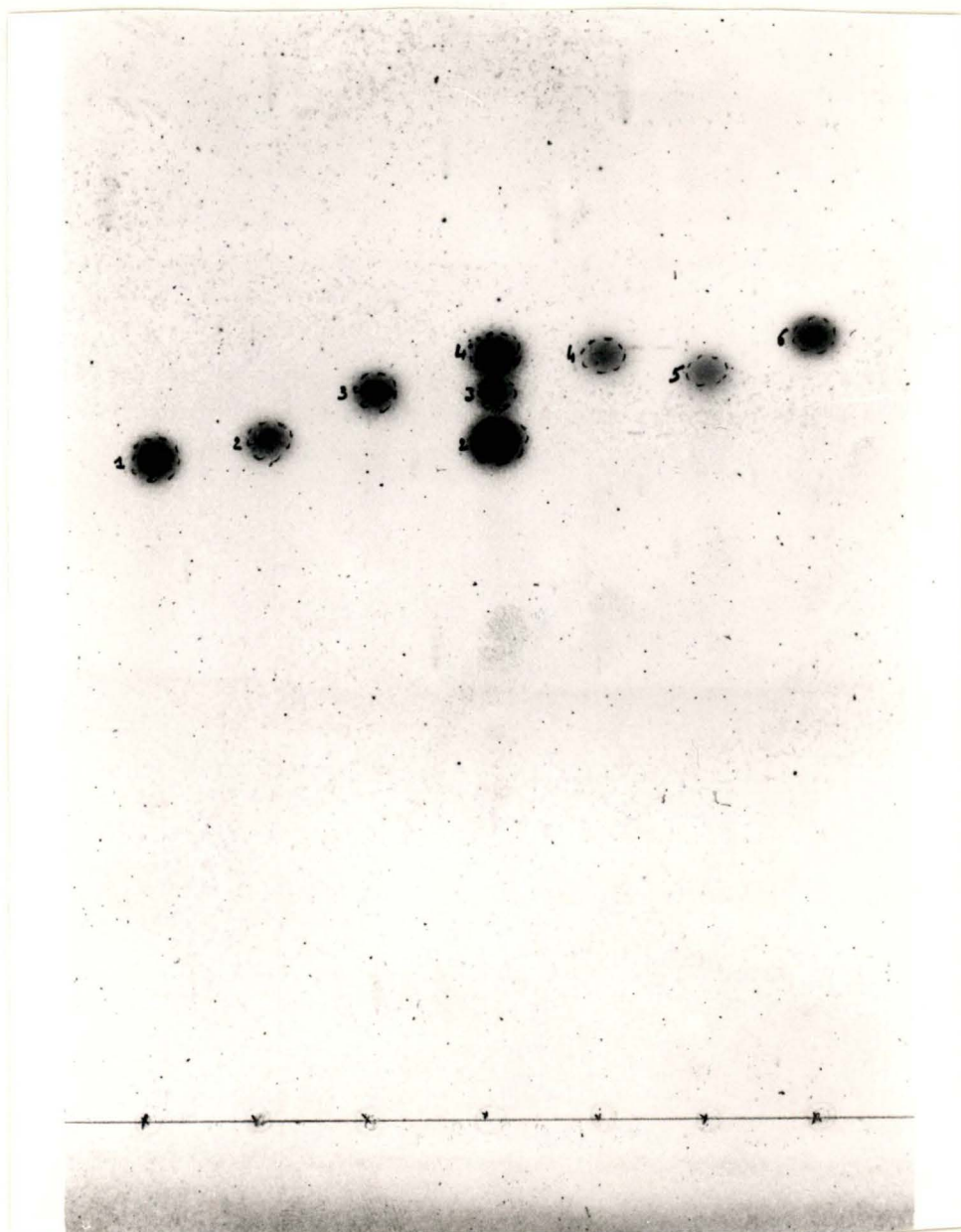


Photo 10. : chromatographie d'un échantillon de plasma d'un crabe au stade D3

Etalons	MR
1. Maltotétrose	0,76
2. Maltotriose	0,85
3. Tréhalose	0,87
4. Maltose	0,93
5. Glucose	0,97
6. Fructose	0,95
7. Saccharose	1
8. Maltohexose	0,62
Glycogène (°)	0
Echantillon	
Tache n°1	0,97
Tache n°2	0,92
Tache n°3	0,85
Tache n°4	0,75
Tache n°5	0

Fig.28 : mobilités relatives des sucres - échantillon d'hémocytes - stade D3.

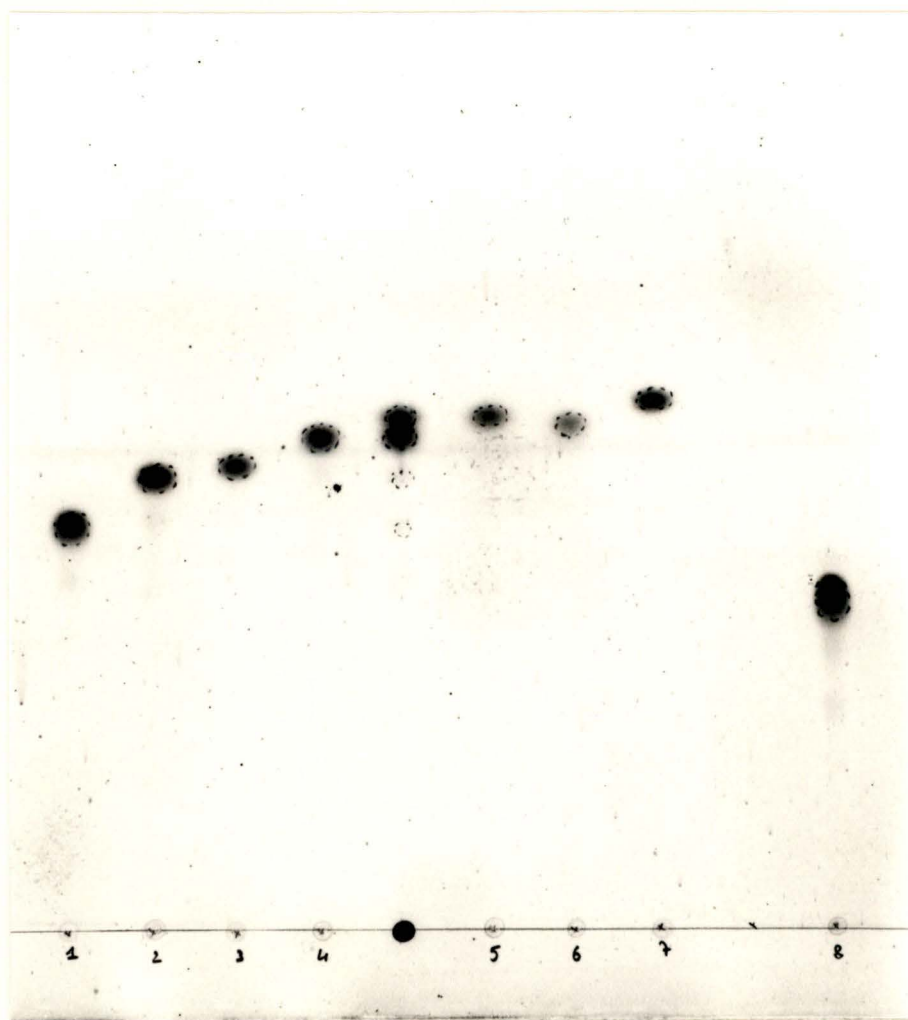


Photo 11. : chromatographie d'un échantillon d'hémocyte d'un crabe au stade D3

concerne le glycogène mais l'estimation de l'importance de la tache est difficile vu sa quantité élevée.

Deux oligosaccharides du maltose sont mis en évidence : le maltohexose et le maltopentose.

### 3.1.2.3 Crabe au stade D3 :

- Plasma :

. Aspect qualitatif ( fig.26-photo 10 ) :

Par comparaison des MR, nous pouvons affirmer que les taches observées sont du glucose, du maltose et du tréhalose.

. Aspect quantitatif :

Schéma expérimental : 1 ml de plasma ( dil. = 33/8 ) est désionisé et, après avoir été lyophilisé, est resuspendu dans 150  $\mu$ l. Un échantillon de 25  $\mu$ l est déposé sur la plaque.

Estimation de la concentration des sucres de l'échantillon :

+ Glucose : tache =  $\pm 4 \mu$ g

$4 \times 6 \times 33/8 = 99 \mu$ g/ml ( d. = 109,6  $\mu$ g/ml )

+ Maltose : tache =  $\pm 1 \mu$ g

$1 \times 6 \times 33/8 = 24,75 \mu$ g/ml ( d. = 33,3  $\mu$ g/ml )

+ Tréhalose : tache =  $\pm 3 \mu$ g

$3 \times 6 \times 33/8 = 74,25 \mu$ g/ml ( d. = 75,0  $\mu$ g/ml )

+ Saccharose : celui-ci n'apparaît pas car sa concentration est trop faible ( d. = 6,0  $\mu$ g/ml )

Les résultats de la CCM confirment donc ceux du dosage.

- Hémocytes :

. Aspect qualitatif ( fig.28-photo 11 ) :

Par comparaison des MR, nous pouvons admettre la présence de glucose, de maltose, de maltotriose, de maltotérose et de glycogène.

Les sucres dosés via le traitement à la maltase sont donc composés de maltose, de maltotriose et de maltotérose.

µg/ml d'hémolymphe totale	Plasma	Hémocytes
Glucose	109,6	13,5
Glucose 6P	n.d.	3,7
Fructose-fructose 6P	n.d.	n.d.
Glycogène	n.d.	167,2
Maltose	33,3	8,6
Saccharose	6,0	n.d.
Amyloglucosidase α1-4 α1-6	153,6	191,8
Sucres totaux (anthrone)	228,6	193,8
Tréhalose	75,0	2,0
Nombre d'hémocytes 10 <sup>9</sup> /ml d'hémolymphe totale	/	129,4

Fig.27 : dosages enzymatiques des sucres au stade D3.

Aspect quantitatif :

Schéma expérimental : 1 ml ( dil. = 30/8 ) a été désionisé et ensuite resuspendu dans 100 ml après sa lyophilisation. 50 $\mu$ l de cet échantillon ont été déposés sur la plaque.

Estimation de la concentration des sucres de l'échantillon :

+ Glucose : tache =  $\pm 2 \mu\text{g}$

$2 \times 2 \times 30/8 = 15 \mu\text{g/ml}$  ( d. = 13,5  $\mu\text{g/ml}$  )

+ Maltose : tache =  $\pm 1 \mu\text{g}$

$1 \times 2 \times 30/8 = 7,5 \mu\text{g/ml}$

+ Maltotriose : tache =  $\pm 0,25 \mu\text{g}$

$0,25 \times 2 \times 30/8 = 2 \mu\text{g/ml}$

+ Maltotétraose : tache =  $\pm 0,25 \mu\text{g}$

$0,25 \times 2 \times 30/8 = 2 \mu\text{g/ml}$

La somme du maltose et des oligosaccharides équivaut donc à 11,5  $\mu\text{g/ml}$  ( d = 8,6  $\mu\text{g/ml}$  )

+ Glycogène : tache =  $\pm 10 \mu\text{g}$  ( par comparaison avec l'étalon d'une autre plaque ).

$10 \times 2 \times 30/8 = 75 \mu\text{g/ml}$  ( d. = 129,4  $\mu\text{g/ml}$  ).

Les résultats obtenus lors de la CCM confortent donc ceux obtenus lors des dosages enzymatiques.

### 3.1.3. Conclusion :

Le but que nous nous étions fixé en adoptant cette technique a été totalement réalisé. En effet:

-D'un point de vue identification ( qualitatif ), les résultats concordent bien. L'incertitude laissée quant à la nature des différents sucres après traitement à la maltase est levée grâce à la technique de CCM qui permet l'identification des oligosaccharides. Ceux-ci sont essentiellement du maltotriose et du maltotétraose en C3 et en D3 alors qu'ils sont constitués de maltopentose et de maltohexose en C4. Peut-être faut-il y voir un rôle de réserve mineur pour ces métabolites à moins qu'ils ne représentent des produits de dégradation du glycogène.

La technique de CCM nous a également permis d'identifier le tréhalose.

-D'un point de vue quantitatif, les résultats concordent également. Cet aspect est à prendre moins au pied de la lettre, la technique de CCM étant semi-quantitative et toute estimation étant forcément approximative. Nous n'avons pas réalisé le dosage direct du tréhalose qui aurait nécessité la purification de tréhalase. Nous avons simplement supposé que la concentration en tréhalose devait correspondre à la différence entre le dosage de la totalité des sucres réducteurs ( anthrone ) et celui effectué grâce à l'amyloglucosidase. Cette supposition s'est avérée correcte comme le montrent les résultats concernant le tréhalose obtenus à partir des plaques de CCM.

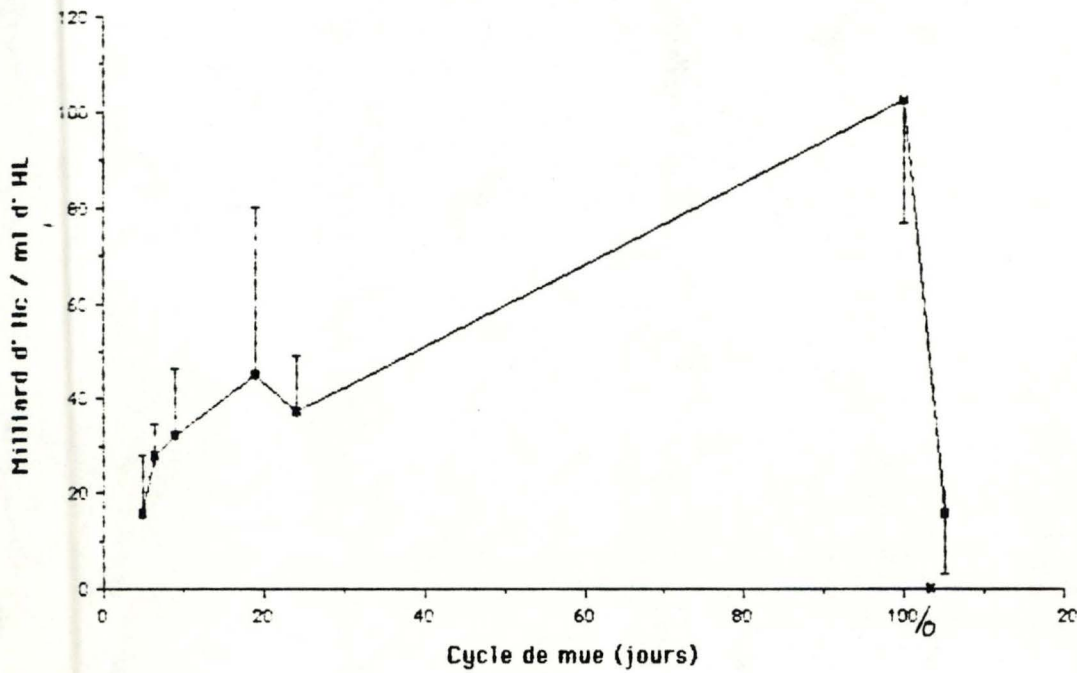


Fig. 29 : évolution du nombre d'hémocytes dans l'hémolymphe en fct du cycle de mue

Pour toutes les figures, chaque valeur représente une moyenne affectée de l'écart-type à la moyenne (sauf fig. 49 et 50).

Le nombre de dosages peut différer d'un stade à l'autre.

Chaque valeur (jours) correspond à un stade de mue dont voici la corrélation :

0 jour = D3

5 jours = A2

6,5 jours : B1

9 jours = C1

19 jours = C3

24 jours = C4

100 jours = D3

L'exuviation est marquée par une croix.

### 3.2. Evolution du nombre d'hémocytes au cours du cycle de mue :

La figure 29 montre trois variations distinctes du nombre d'hémocytes au cours de l'intermue :

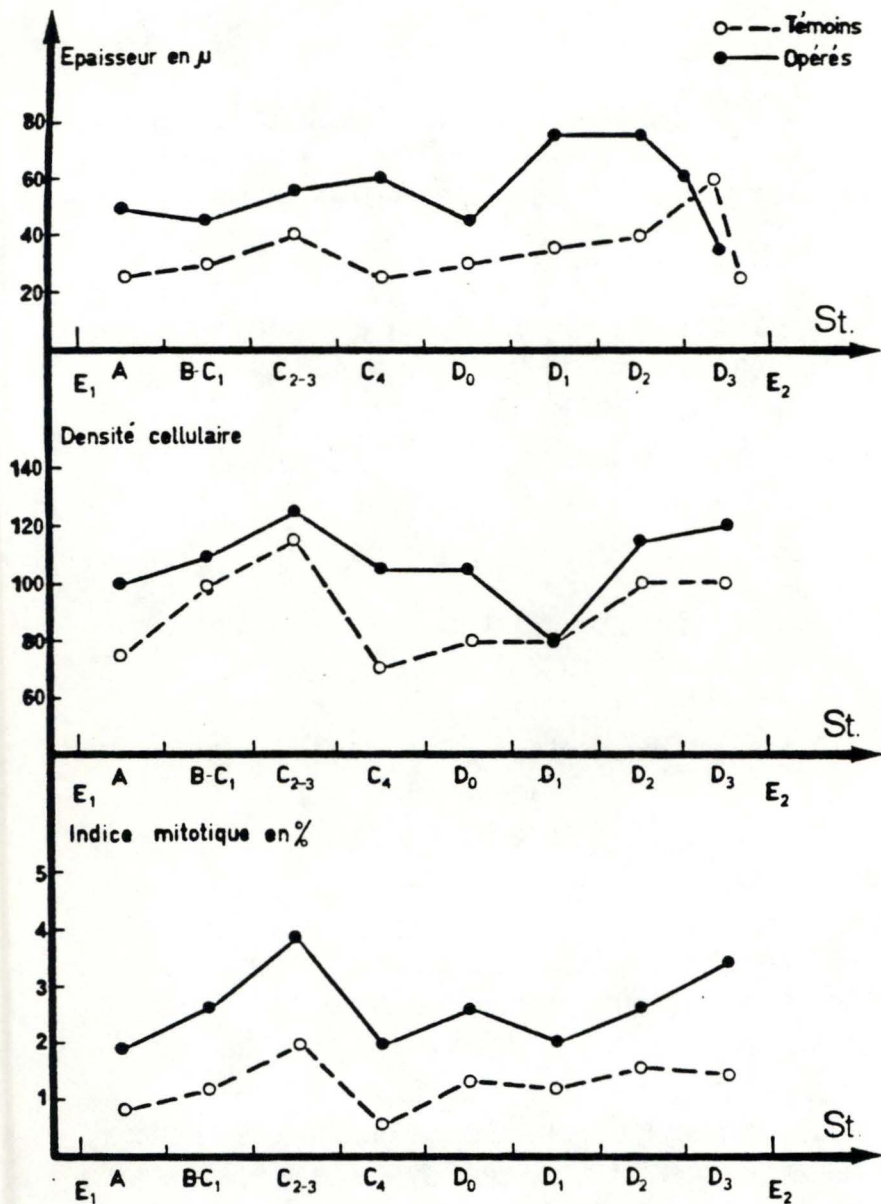
- Une augmentation en postmue.
- Une seconde augmentation lors de la prémue et enfin, une diminution brutale aux alentours de l'exuvation.

Ces observations cadrent exactement avec celles relevées dans la littérature. Ainsi, Charmantier ( 1972-1973 ) travaillant sur Pachygrapsus marmoratus présente les conclusions suivantes sur le cycle de la leucopoïèse ( fig. 30 ) :

- Du stade A au stade C2-C3 ( stades de postmue ), l'épaisseur de l'organe hématopoïétique et l'indice mitotique augmentent. Les nodules qui contiennent après l'exuviation ( stade A ) essentiellement des cellules souches peu serrées, se remplissent de leucocytes hyalins de plus en plus nombreux au cours des stades suivants. A la fin de leur différenciation, ces cellules hyalines sont libérées. C'est en C2-C3 que l'indice mitotique atteint son taux le plus élevé, soit 2 %.

- Au stade C4, les nodules sont devenus petits, clairs, disséminés et l'indice mitotique est à la valeur la plus faible de tout le cycle ( 0,6 % ). On trouve dans l'hémolymphe des hémocytes de type intermédiaire.

- De D0 à D3 ( stades de prémue ), l'activité reprend et va en s'intensifiant; les trois paramètres observés augmentent. L'épaisseur de l'organe est maximale en D3 ( 60  $\mu\text{m}$  ). L'accroissement de la densité cellulaire correspond à la présence de nombreux leucocytes de type hyalin. L'indice mitotique atteint 1,6 % en D0 puis reste stable. L'épaisseur de l'organe en D3 ne s'explique pas seulement par une augmentation de l'indice mitotique mais par une accumulation des leucocytes formés. Les hémocytes hyalins formés pendant les stades de prémue sont lâchés brusquement en D3 avant l'exuviation comme le montre la réduction brusque de l'épaisseur de cet organe à ce stade.



Courbes des variations d'activité de l'organe leucopoiétique de *Pachygrapsus marmoratus* au cours du cycle d'intermue. Témoins : crabes témoins ; opérés : crabes épédonculés ; St : stades du cycle d'intermue (nommés selon la méthode de DRACH) ; E<sub>1</sub> : première exuviation après l'ablation ; E<sub>2</sub> : deuxième exuviation.

Fig.30 : d'après Charmantier, 73.

Ces résultats peuvent être synthétisés comme suit :

L'organe leucopoïétique présente deux périodes d'activité séparées par une période de repos, le stade C4 :

- La première période correspond à la postmue; les leucocytes produits sont libérés au fur et à mesure de leur formation; ils poursuivent leur évolution dans l'hémolymphe et on les trouve au moment de l'exuviation sous la forme d'hémocytes granuleux qui sont supposés jouer un rôle dans la coagulation.
- La seconde période se situe en prémue. Cette fois, les leucocytes formés sont stockés dans l'organe jusqu'au stade D3, moment où ils sont libérés.
- L'eau de mer absorbée au moment de l'exuviation pourrait être en partie responsable de la chute brutale du nombre d'hémocytes par millilitre suite à leur dilution. En effet, lors de la mue, la taille du crabe augmente de 25 à 30% tandis que son volume double. Cette augmentation de volume est due pour une bonne part à l'eau de mer absorbée.

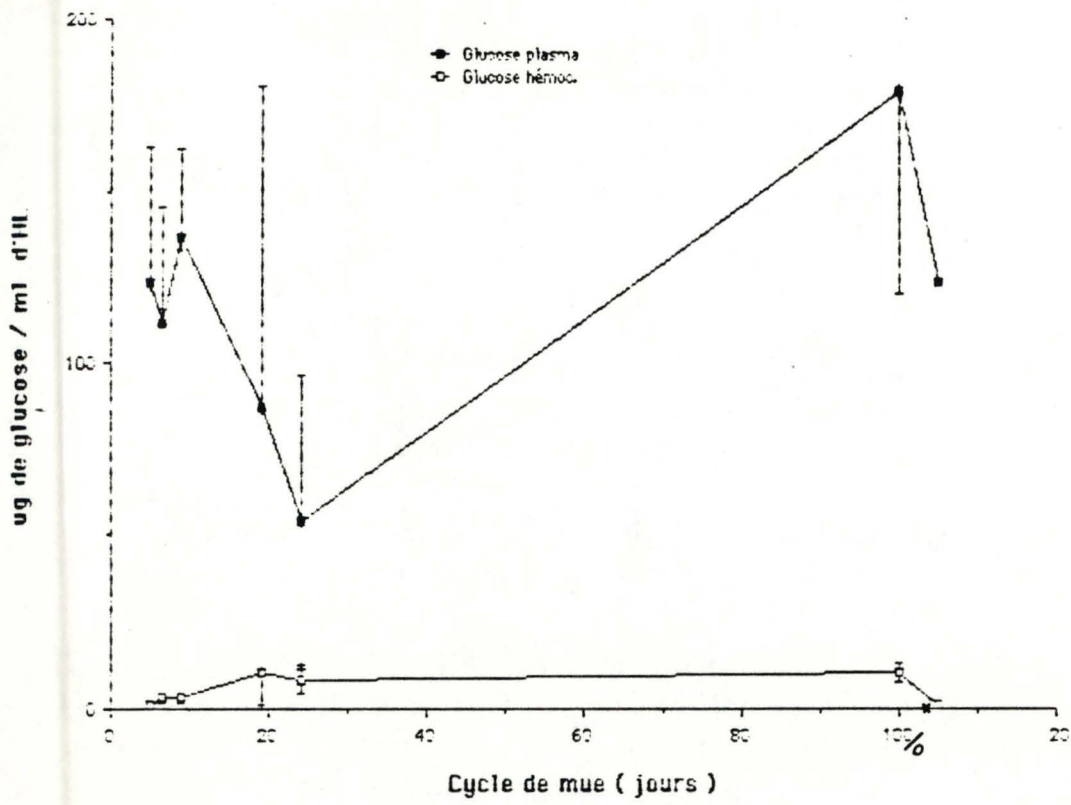


Fig.31 : évolution du taux de glucose dans le Pl. et les Hc. en fct du cycle de mue.

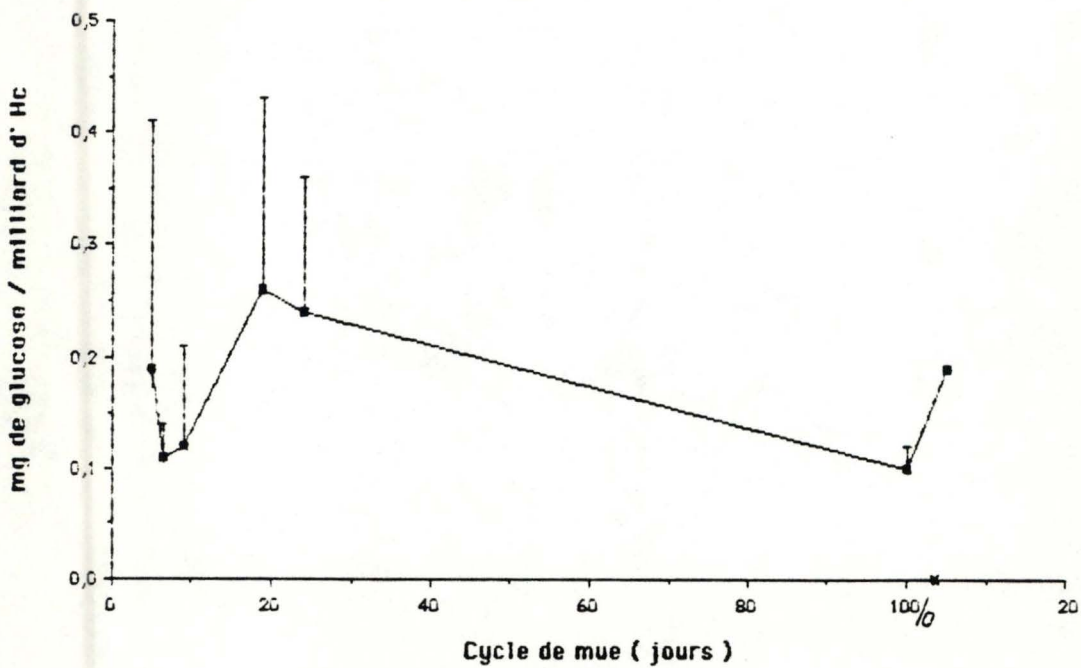


Fig.32 : évolution du taux de glucose dans les Hc. en fct du cycle de mue.

### 3.3. Dosages des métabolites:

#### 3.3.1. Le glucose :

Dans le plasma, le taux de glucose, stable au cours des premiers stades de la postmue décroît ensuite jusqu'en intermue. En prémue, il augmente fortement pour atteindre un maximum en D3 ( fig. 31 ).

Par contre, la charge hémocytaire en glucose augmente, elle, en postmue et diminue dès la prémue ( fig. 32 ). En moyenne, la quantité de glucose contenue dans les hémocytes est de l'ordre du dixième de celle du plasma ( fig. 31 ).

Telford (1968a ) travaillant sur l'hémolymphe totale de Homarus americanus note aussi une augmentation nette du glucose en prémue.

Par contre, Spindler (1976 ) travaillant sur C. maenas ne détecte pas de variations significatives du taux de glucose dans l'HL totale, quoique la valeur maximale soit atteinte en fin de prémue ce qui concorde avec nos résultats.

Notre étude apporte cependant un élément supplémentaire non négligeable, soit la répartition du métabolite entre la fraction cellulaire et le plasma. L'augmentation du taux de glucose dans l'hémolymphe en prémue est essentiellement limitée au plasma. Elle peut être mise en rapport avec l'observation d'une activité maximale en prémue et en début de postmue, de nombreux enzymes intervenant pour la synthèse de la chitine, notamment la glutamine transaminase ( c ) et la UDPAGm pyrophosphorylase ( f ); ( fig. 33 ; Gwinn-Stevenson, 1973 et Pahlic-Stevenson, 1978 ).

La quantité de glucose contenue dans les hémocytes est certes nettement inférieure à celle contenue dans le plasma mais en tenant compte des volumes respectifs occupés par le plasma et les hémocytes, on peut calculer que la concentration hémocytaire en glucose est certainement 5 à 10 fois plus élevée que celle du plasma; cette différence est la plus marquée en intermue, stade pendant lequel l'hémocyte accumule les réserves de glycogène. Ce gradient suggère l'existence d'un système de transport actif du glucose. Parmi le peu d'auteurs qui ont abordé ce sujet chez les Invertébrés, Ingermann ( 1985 ) qui a travaillé sur les hémocytes de Themiste dyscrita, décrit le type de transport des monosaccharides comme étant stéréospécifique, ne concentrant pas le glucose et indépendant du gradient de sodium. Ce transport semble donc différent de celui que nous postulons mais rien ne prouve que les hémocytes de ces deux espèces aient des rôles identiques.

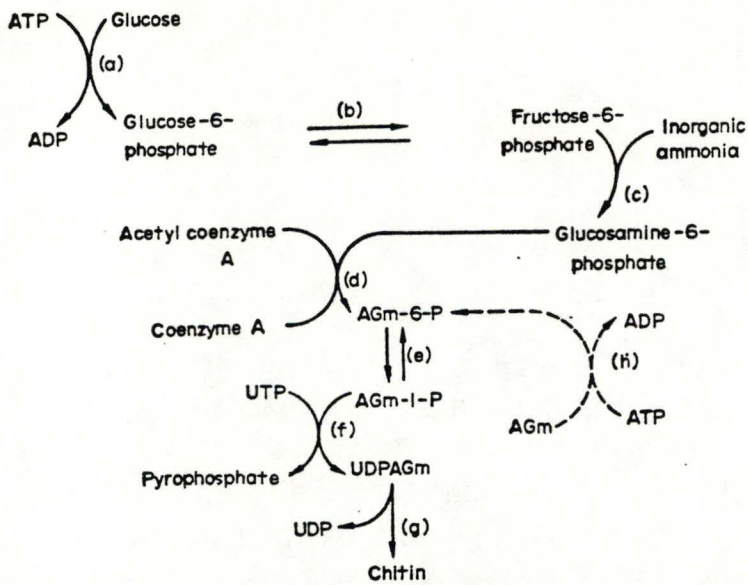


FIG. 2. Postulated scheme for chitin biosynthesis (solid arrows after Candy & Kilby, 1962, and Benson & Friedman, 1970). The enzymes involved are: a, hexokinase; b, phosphhexose isomerase; c, glucosamine phosphate isomerase; d, phosphoglucosamine transacetylase; e, phosphoacetyl glucosamine mutase; f, UDPAGm pyrophosphorylase; g, chitin synthetase; h, AGm kinase.

Fig.33 : d'après Gwinn-Stevenson, 73.

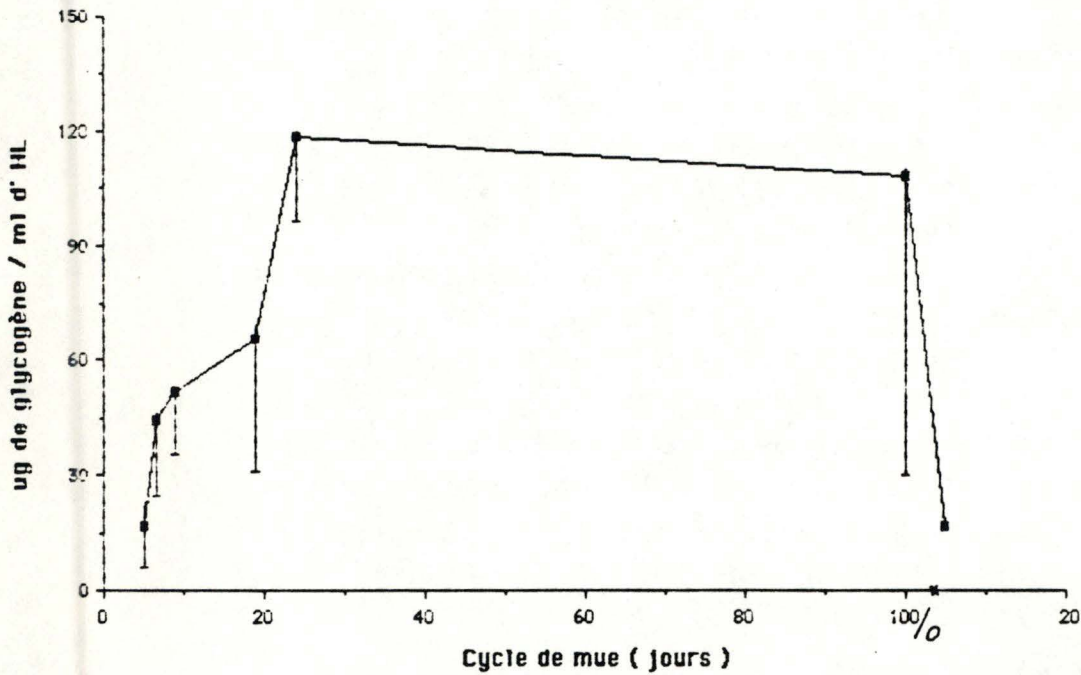


Fig.34 : évolution du taux de glycogène par ml d'HL totale en fct du cycle de mue.

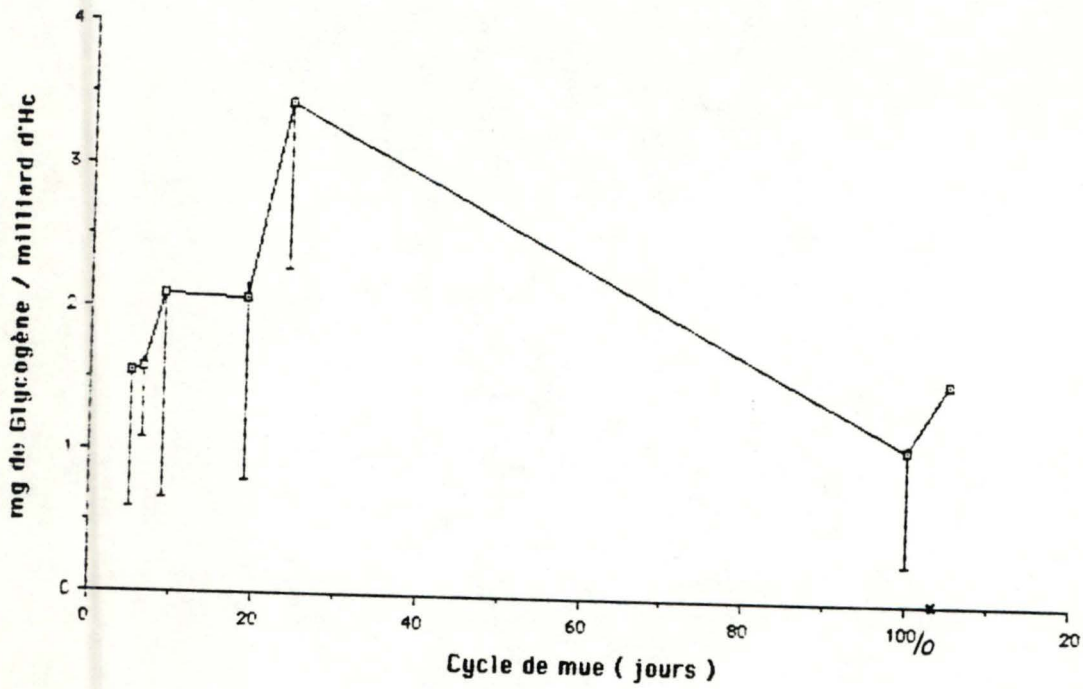


Fig.35 : évolution du taux de glycogène dans les Hc en fct du cycle de mue.

Un grande variabilité s'observe d'un animal à l'autre notamment au stade d'intermue : cette étape est la plus longue et un individu peut seulement y commencer à former la couche membraneuse de son épiderme ou bien se préparer à la prémue. De plus, c'est pendant l'intermue que se déroule la spermatogenèse. La physiologie de l'animal est donc soumise à d'importantes modifications métaboliques qui affectent son milieu intérieur ( Ceccaldi, 1969 ). Il faut également prendre en compte le nombre limité de nos dosages.

### 3.3.2. Le glycogène :

Un accroissement très net du taux moyen de glycogène se trouvant dans l'hémolymphe s'observe pendant toute la postmue. En prémue, il diminue fortement ( fig. 34 ). Son évolution suit celle du glucose, ce qui appuie le rôle de précurseur joué par ce dernier. Les observations de Spindler ( 1976 ) sur *Carcinus* s'accordent avec les nôtres. Cependant, le taux de glycogène qu'il signale en prémue ( 0,5 à 0,6 mg/ml d' HL ) est 5 fois plus élevé que celui que nous observons. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les animaux utilisés par Spindler sont très jeunes; ils muent plus régulièrement et leur métabolisme est plus élevé.

Le glycogène étant un métabolite intracellulaire, l'expression des résultats en fonction du nombre d'hémocytes devrait donner une image plus correcte du phénomène. La figure n°35 nous montre que la charge en glycogène des hémocytes s'effectue essentiellement en intermue. Elle diminue ensuite de façon intensive pendant la prémue. Ceci est à mettre en rapport avec le nombre élevé d'hémocytes observés en D3 ( fig. 29 ).

Tous ces résultats nous amènent à formuler l'hypothèse suivante : il faut considérer l'ensemble des hémocytes en D3 comme deux populations distinctes d'âge différent :

- Une population jeune, nouvellement synthétisée par l'organe hématopoïétique et comportant peu de réserves en glycogène.

- Une population plus vieille, synthétisée lors de la postmue, ayant accumulé du glycogène en intermue; la glycogène phosphorylase présentant un optimum en D2 ( prémue ), ce glycogène est dégradé et fournit tout ou partie du glucose plasmatique ( Fourneau, 1986 ).

En conséquence, nous trouvons au stade D3 deux populations de cellules pauvres en glycogène.

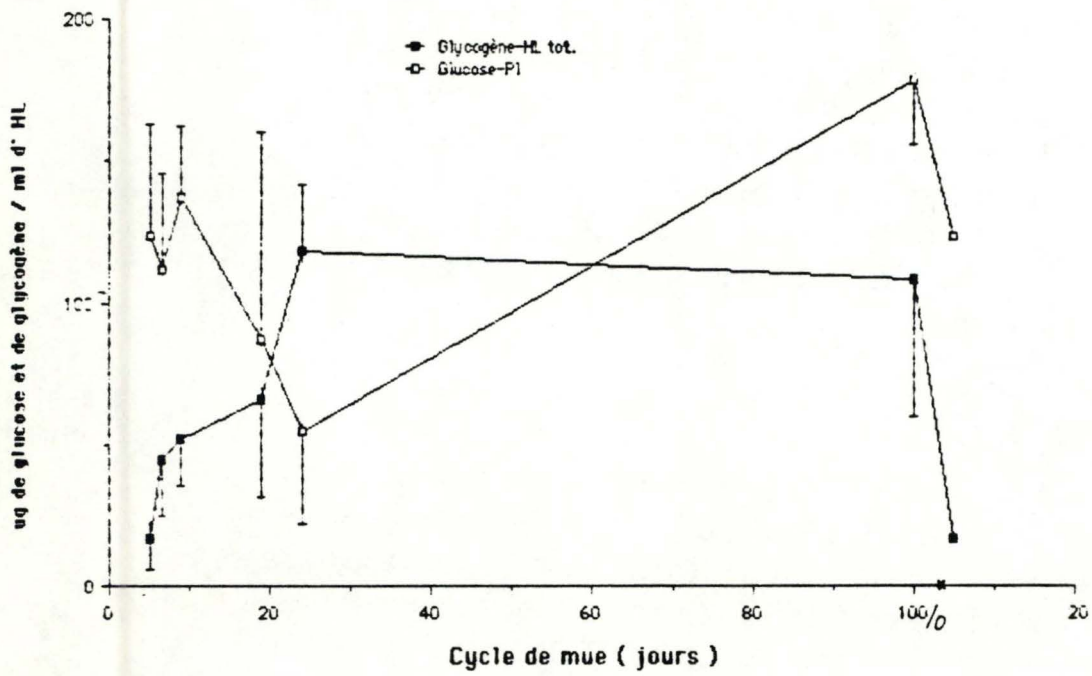


Fig.36 : évolution du taux de glucose plasmatique et de glycogène par ml d'hémolymphe totale en fct du cycle de mue.

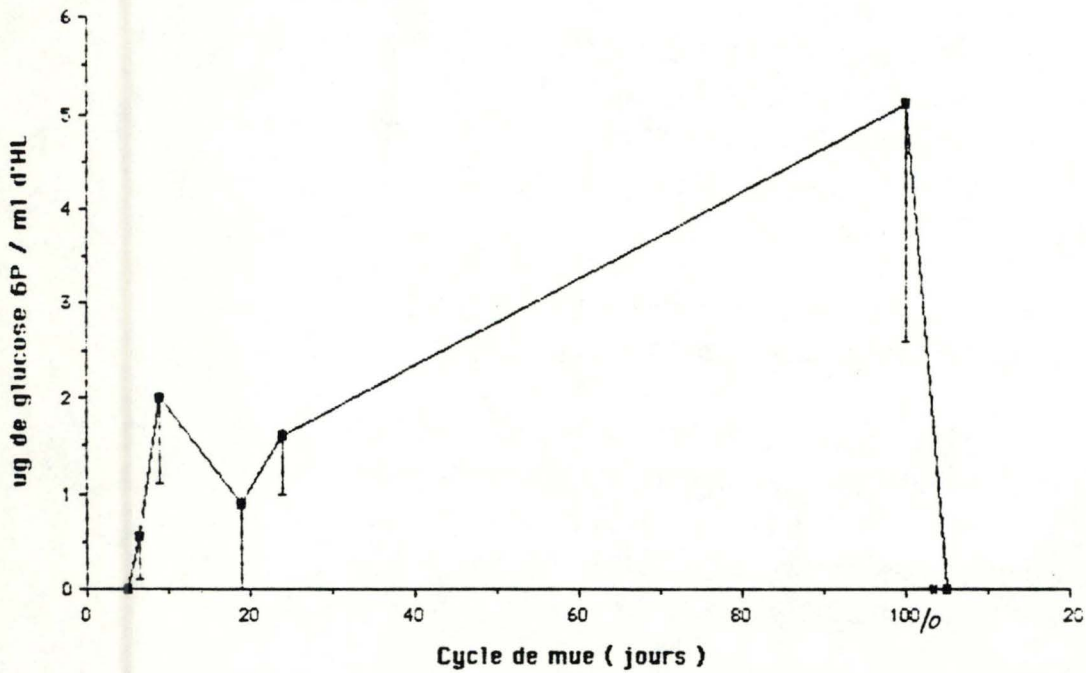


Fig.37 : évolution du taux de glucose 6P par ml d'HL totale en fct du cycle de mue.

Cette hypothèse est appuyée par la figure 36 où nous observons une relation claire entre l'évolution du taux de glucose et celle du taux de glycogène. En postmue et jusqu'en intermue, la charge hémocytaire croissante en glycogène correspond à une baisse du taux de glucose dans le plasma.

Tout se passe donc comme si les besoins étant moins importants, une réserve de glycogène se constituait à partir du glucose plasmatique. Ensuite, avec la prémue une demande élevée de métabolites se manifeste. Le taux de glucose augmente brusquement dans le plasma alors que le taux de glycogène diminue. De plus, ces variations concomitantes portent sur des quantités comparables, ce qui renforce la vraisemblance de l'hypothèse proposée. A ce moment, tout se passe comme si le crabe utilisait les réserves de glycogène qu'il a accumulées en intermue. Ces observations confortent l'hypothèse d'hépatocyte circulant attribué à l'hémocyte par Johnston ( 1972 ).

### 3.3.3 Le glucose 6P :

Les figures 37 et 38 présentent des allures similaires, ce qui prouve que toute variation du taux de G6P est dû à une variation de la charge hémocytaire de ce métabolite et non pas à une variation du nombre d'hémocytes.

Le taux de G6P augmente brusquement de C3 à C4 et également en prémue mais plus lentement; ceci pourrait s'expliquer par l'arrivée d'hémocytes jeunes qui masquent l'augmentation du G6P dans les cellules vieilles. En prémue, la glycogène phosphorylase dégrade activement le glycogène en G6P, ceci pourrait expliquer son augmentation.

Le G6P constitue une sorte de plaque tournante vis-à-vis de plusieurs chaînes métaboliques dont la glycogénosynthèse, la glycogénolyse, le cycle des pentoses-P et la glycolyse. Via le fructose 6P, il permet la synthèse de la chitine bien que l'existence de ce métabolisme ne soit pas démontrée dans l'hémocyte.

Etant donné son rôle d'intermédiaire dans toutes ces réactions métaboliques, il est difficile de relier ses variations de concentration à l'un ou l'autre de ces mécanismes.

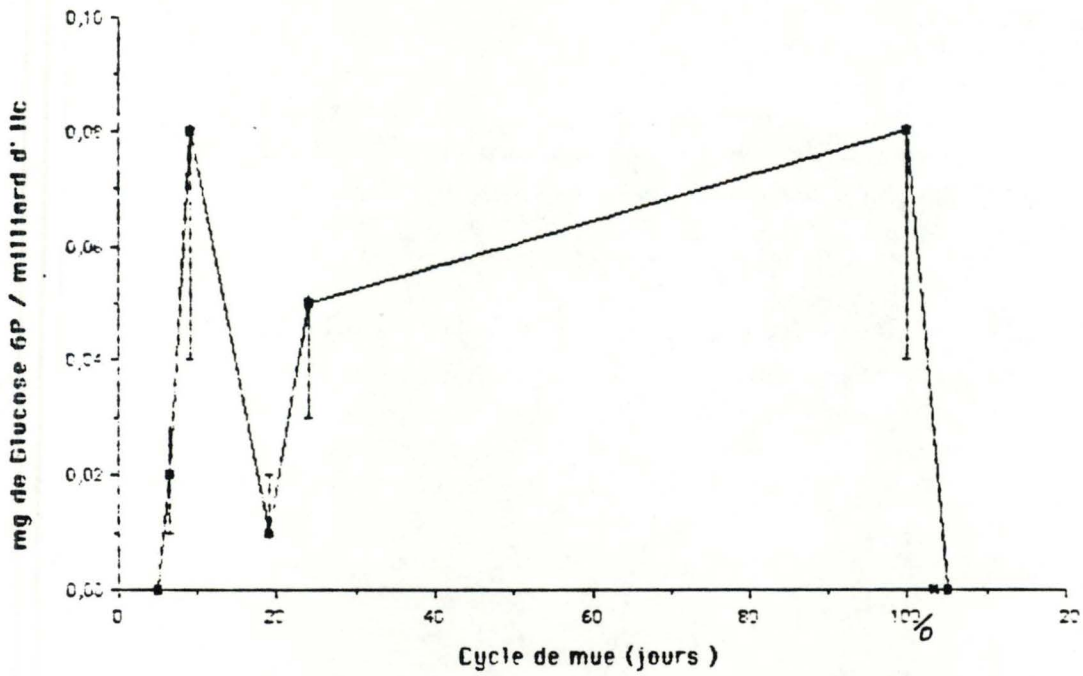


Fig.38 : évolution du taux de glucose 6P dans les Hc en fct du cycle de mue.

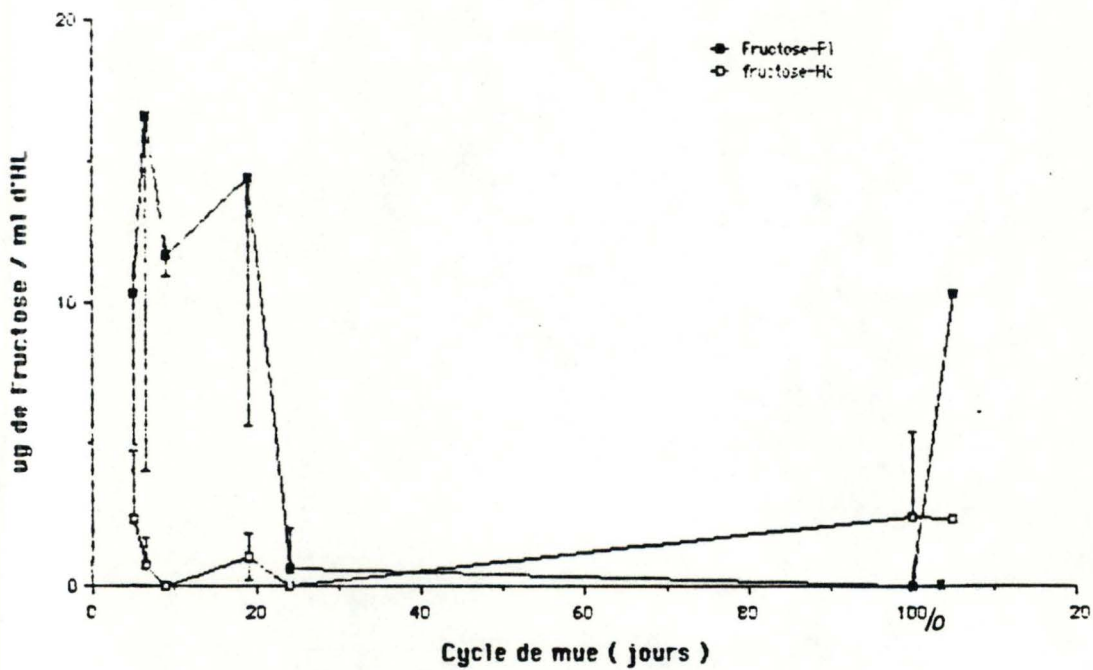


Fig.39 : évolution du taux de fructose et de fructose 6P dans le P1 et les HC en fct du cycle de mue.

METABOLISM OF HEXOSAMINES

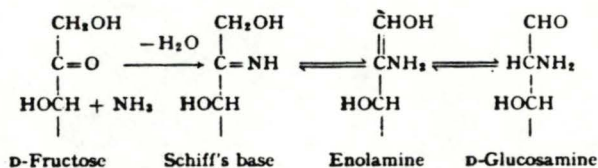


Fig.40 : transformation du fructose en D-glucosamine via l'énolisation d'une base de Schiff ( Warren, 1965 ).

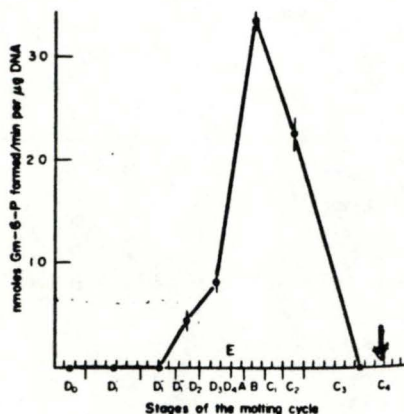


Fig.41: activité de la glutamine transaminase en fonction du cycle de mue ( Pahlic, 1978 ).

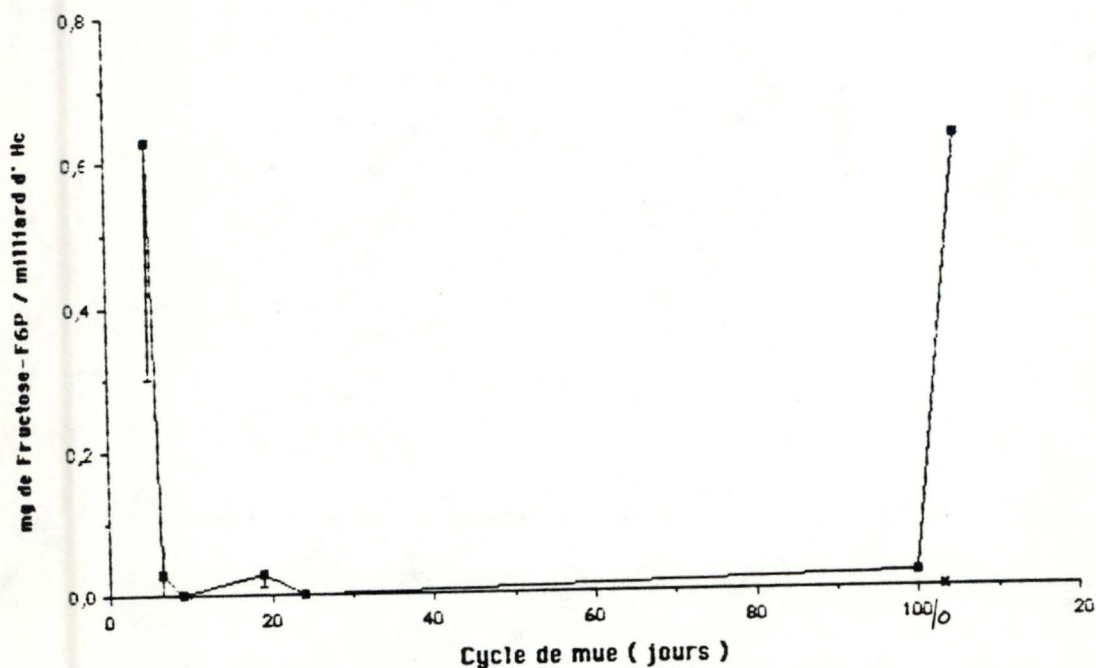


Fig.42 : évolution du taux de fructose et de fructose 6P en fonction du cycle de mue dans les hémocytes

### 3.3.4. Le fructose et le fructose 6P :

Il est important de signaler que la manière dont nous avons effectué les dosages enzymatiques ne nous a pas permis de différencier le fructose du fructose 6P lorsque ces deux métabolites sont présents ensemble ( cas des hémocytes ).

La figure 39 montre que la quantité globale de fructose est nettement moins élevée dans les hémocytes que dans le plasma. Dans celui-ci, ce métabolite ne semble pas jouer un rôle prépondérant en intermue et en prémue vu sa concentration pratiquement nulle.

Par contre, en postmue, elle est nettement plus élevée. Le fructose plasmatique constituerait un apport supplémentaire à celui du glucose pour la synthèse de la chitine du tégument; cette voie métabolique est en effet particulièrement active en fin de prémue et en début de postmue.

Le fructose plasmatique y sert de substrat de deux façons :

- Après avoir pénétré dans la cellule tégumentaire, il peut être transformé en glucosamine via l'énolisation d'une base de Schiff intermédiaire ( fig.40: Warren, 1965 ). La glucosamine est alors phosphorylée en glucosamine 6P ou acétylée en acétylglucosamine pour participer dans les deux cas à la synthèse de chitine ( fig.33-Gwinn-Stevenson, 1973 ).

- Ce fructose peut également être phosphorylé en fructose 6P par une hexokinase ( fig.33-Gwinn-Stevenson, 1973 ) et participer de cette façon à la formation de la chitine.

Il est frappant de constater que le taux élevé de fructose dans le plasma coïncide avec le moment où la glucosamine phosphate isomérase a son optimum d'activité ( fig.41-Pahlic, 1978 ). Or cette enzyme utilise précisément le fructose 6P comme substrat pour le transformer en glucosamine 6P ( fig.33-Gwinn-Stevenson, 1973 ).

Dans les hémocytes, le taux de fructose et de fructose 6P (qui doit représenter l'essentiel des deux ) reste faible pendant tout le cycle de mue sauf au moment de l'exuviation où il subit une brusque augmentation ( fig 42 ). A ce moment, la demande en fructose 6P serait très élevée pour satisfaire une consommation élevée en énergie ( activité glycolytique importante ).

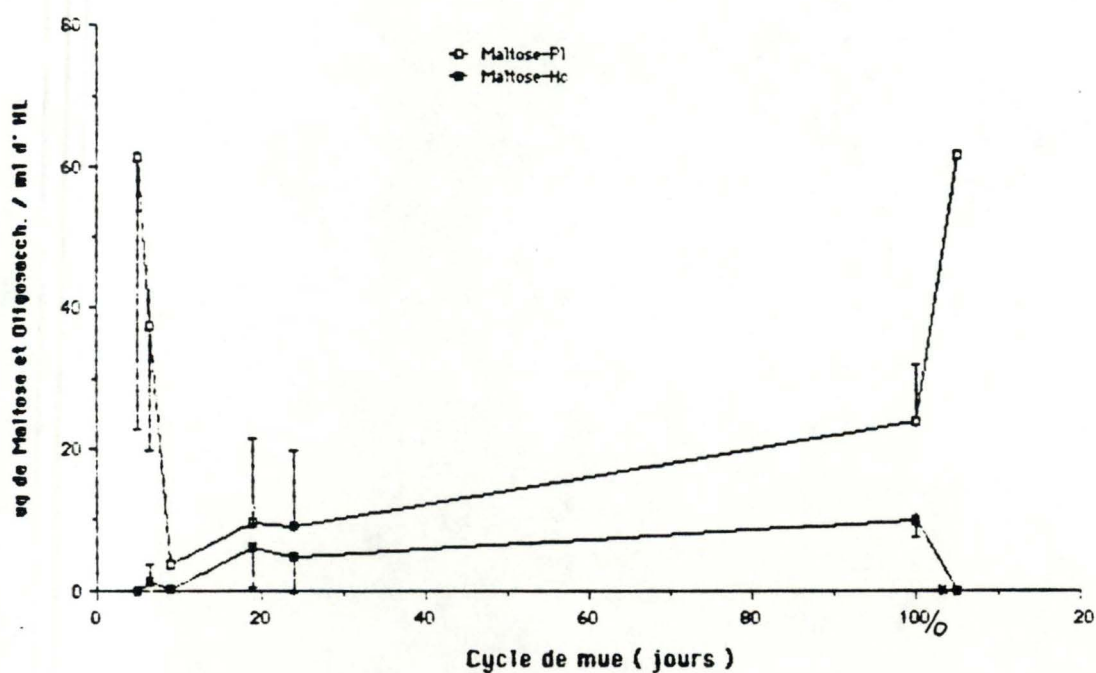


Fig.43 : évolution du taux de maltose et des oligosaccharides dans le P1 et les Hc en fonction du cycle de mue.

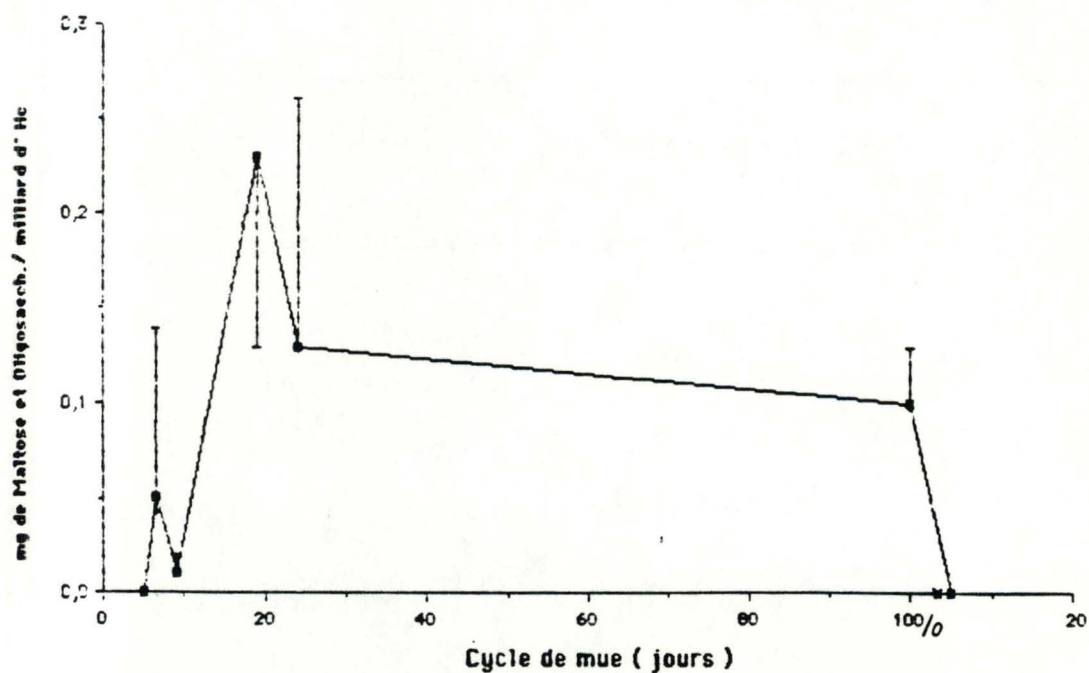


Fig.44 : évolution du maltose et des oligosaccharides en fonction du cycle de mue dans les hémocytes.

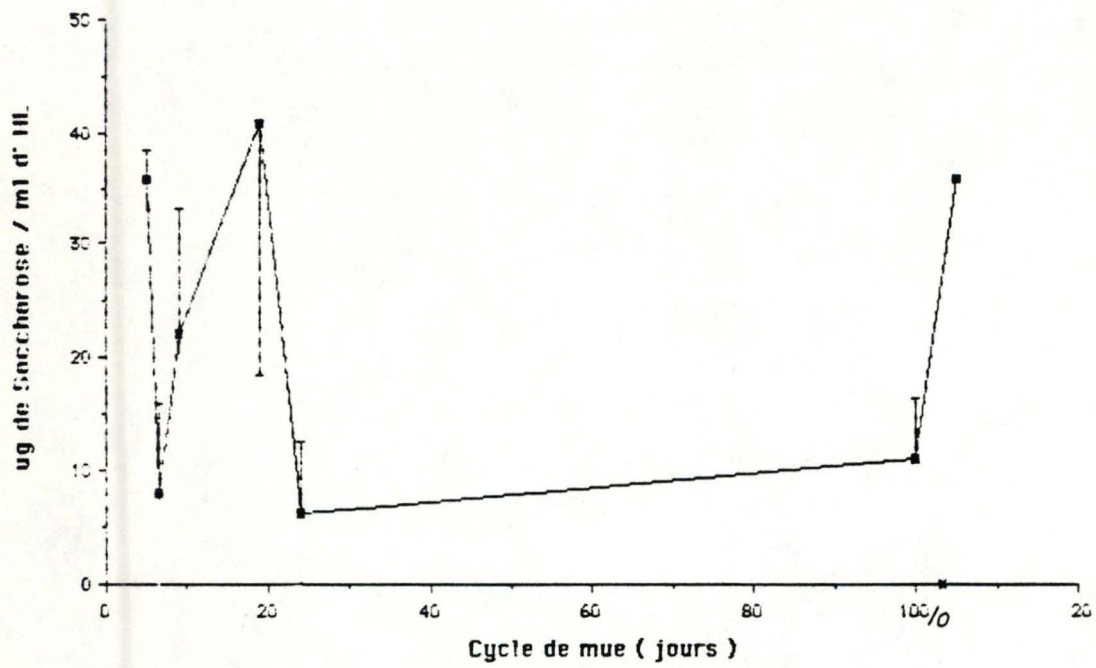


Fig.45 : évolution du saccharose dans le plasma en fonction du cycle de mue.

### 3.3.5. Le maltose et les oligosaccharides :

Nous savons par chromatographie en couche mince que le plasma comprend seulement du maltose. Sa concentration croît probablement lentement en prémue, brusquement aux alentours de l'exuviation puis chute en postmue. Comme l'avait montré Schwoch ( 1972 ), il pourrait participer au métabolisme de la chitine après sa transformation en glucose dans les cellules tégumentaires. Son rôle en tant que minitransporteur dans le mouvement des hydrates de carbone n'est certes pas négligeable mais relativement modeste ( fig.43 ).

La quantité de maltose et des oligosaccharides intrahémocytaires est la plupart du temps inférieure à celle du maltose plasmatique ( fig.43 ). La charge hémocytaire de ces sucres augmente en postmue jusqu'au stade C3 puis diminue jusqu'à l'exuviation ( fig.44 ). Ces sucres contribuent donc aux réserves hémocytaires mais dans une proportion nettement inférieure à celle du glycogène.

Ils pourraient représenter des produits de dégradation du glycogène hémocytaire. Si cette hypothèse est exacte, il faudrait que leur concentration augmente en prémue, moment où le glycogène est dégradé activement; ce n'est pas tout à fait le cas mais il se pourrait que ce phénomène soit masqué par l'arrivée de nouveaux hémocytes pauvres en oligosaccharides en D3.

### 3.3.6. Le saccharose :

D'après nos dosages, ce sucre est uniquement présent dans le plasma. Son taux moyen y est comparable à celui du maltose. La figure 45 nous indique qu'il reste élevé jusqu'en fin de postmue; il pourrait donc fonctionner comme transporteur de fructose et de glucose et ainsi approvisionner les cellules tégumentaires tant que la synthèse de chitine s'effectue, c.à-d. jusqu'en fin de postmue.

Il existe par ailleurs une correspondance étroite entre les variations du taux de fructose plasmatique et celles du taux de saccharose, ce qui est probablement l'indication d'une utilisation commune à la même période du cycle. Si l'on additionne leur taux moyen en postmue, on arrive à une concentration de +50  $\mu\text{g/ml}$  d'hémolymphe qui n'est certes pas négligeable puisqu'elle représente la moitié de celle du glucose à la même période. Enfin, comme sa brusque disparition avant l'intermue coïncide avec le

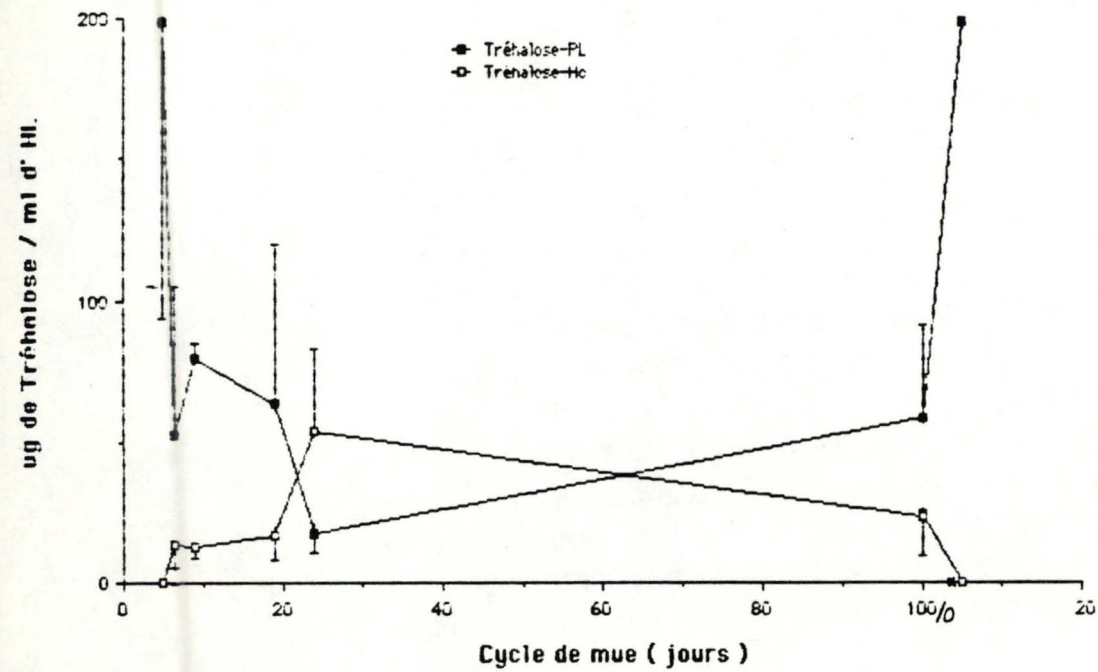


Fig.46 : évolution du tréhalose dans le plasma et les Hc par ml d'HL en fonction du cycle de mue.

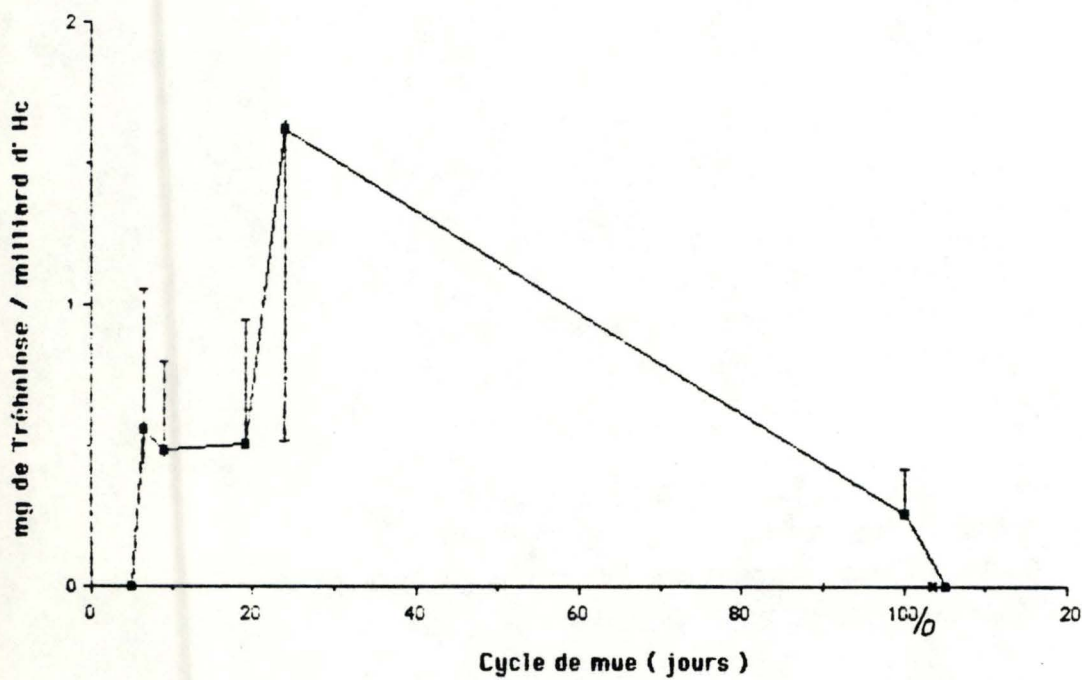


Fig.47 : évolution du tréhalose dans les Hc en fonction du cycle de mue.

moment où l'animal synthétise sa couche membraneuse( mucopolysaccharides neutres ), on ne peut donc pas exclure qu'il y joue un rôle.

### 3.3.7. Le tréhalose :

La figure 46 montre que les taux de tréhalose hémostatique et plasmatique subissent des variations tout à fait opposées au cours du cycle de mue. Alors qu'il augmente en postmue dans les hémostates, il diminue dans le plasma et l'inverse se produit en prémue. La "décharge" hémostatique observée en prémue( de 50 à 20  $\mu\text{g/ml}$  d'HL ) apparaît encore plus clairement à la fig.47 .

Elle pourrait se réaliser de deux façons :

- Soit le tréhalose peut traverser la membrane hémostatique par exocytose ce qui est peut-être le cas des cellules des muscles abdominaux qui synthétisent et libèrent le tréhalose dans le plasma.

Dans le cadre de cette hypothèse, l'hémostate pourrait être soit un simple lieu de stockage du tréhalose sans exclure qu'il soit également son lieu de synthèse, ce qui implique la présence de tréhalose synthétase. Le fait que le tréhalose se retrouve d'abord dans le plasma ( postmue ) puis dans les hémostates ( Intermue ) serait en faveur d'un stockage hémostatique suivi d'une utilisation ultérieure.

- Soit le tréhalose ne peut pas traverser la membrane hémostatique. Dans ce cas, c'est forcément l'hémostate lui-même qui synthétise le tréhalose. Lorsque les besoins augmentent, le tréhalose est transformé en glucose par la tréhalase et celui-ci passe dans le plasma où il provoque l'hyperglycémie observée en prémue. Si cette alternative se vérifiait, le tréhalose plasmatique ne proviendrait pas des hémostates mais bien des muscles abdominaux.

Quoiqu'il en soit, le tréhalose plasmatique semble constituer un mode de transfert important puisque son taux est souvent analogue à celui du glucose. Il pourrait intervenir dans le métabolisme de la chitine après sa transformation en glucose ( Schwoch, 1972 ).

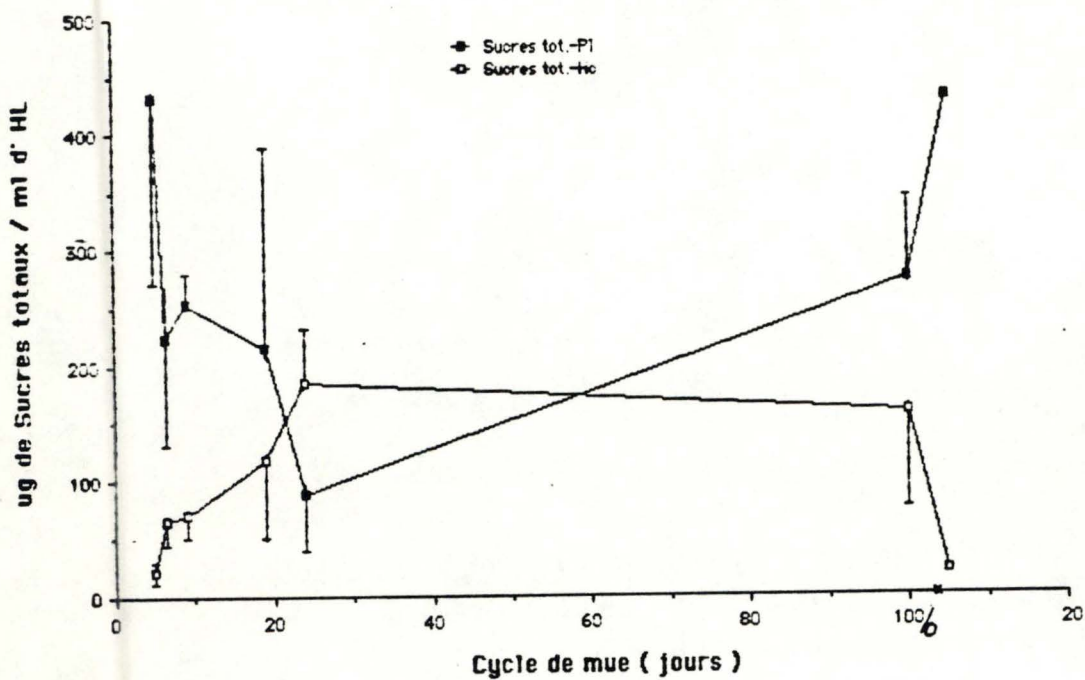


Fig.48 : évolution du taux des sucres réducteurs dans le plasma et les hémocytes en fonction du cycle de mue .

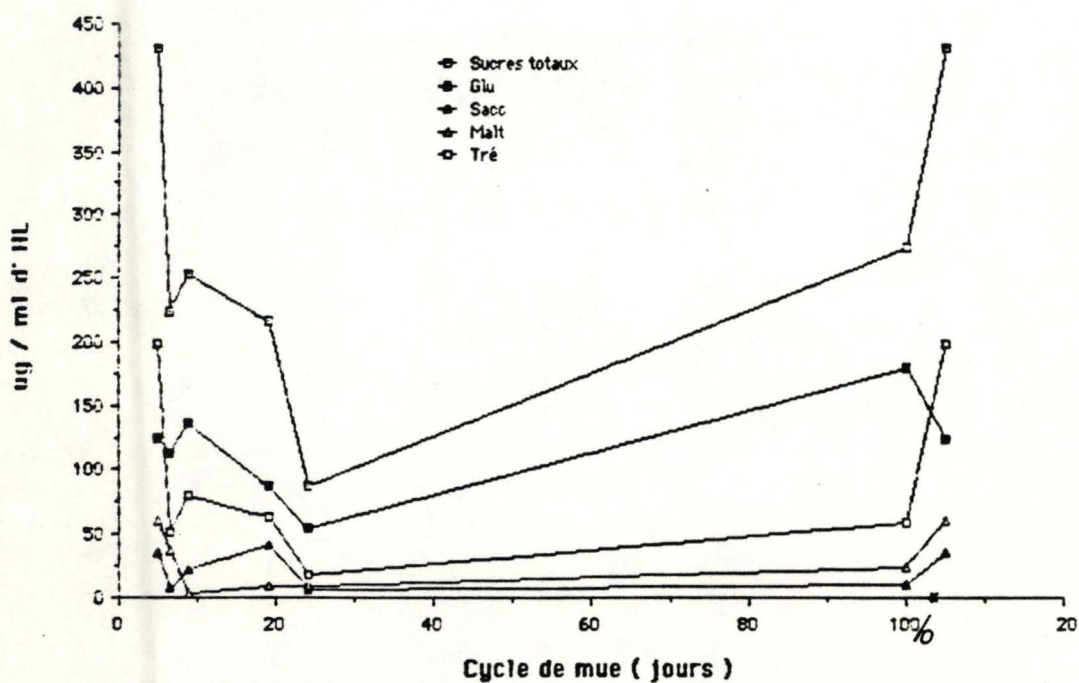


Fig.49 : évolution du taux des principaux glucides dans le plasma en fonction du cycle de mue.

### 3.3.8. Les sucres totaux :

La figure 48 indique que, de nouveau, les taux de glucides dans les fractions hémocytaire et plasmatique présentent des variations opposées. C'est donc un argument de plus en faveur de l'hypothèse d'une participation de l'hémocyte comme lieu de stockage des hydrates de carbone.

- Dans le plasma ( fig 49 ), ce sont principalement le glucose et le tréhalose qui rendent compte des variations observées pour les sucres totaux. Il y a moins de tréhalose que de glucose en prémue mais c'est le tréhalose qui représente la majeure partie des sucres totaux de l'hémolymphe du crabe fraîchement mué. Quant au maltose, au fructose et au saccharose, ils rendent compte d'une fraction mineure car leurs taux restent toujours relativement faibles ( de l'ordre de 10 % ).
- Si le glycogène des hémocytes joue un rôle de réserve majeur, celui du tréhalose hémocytaire n'est cependant pas négligeable ( fig.50 ). Le maltose et les oligosaccharides ne jouent qu'un rôle de réserve mineur ou représenteraient des produits de dégradation du glycogène. Quant au fructose 6P et au glucose 6P, leur position en tant qu'intermédiaires des différentes voies de synthèse et de dégradation fait que leurs taux représentent un état d'équilibre dynamique et non des réserves en tant que telles.

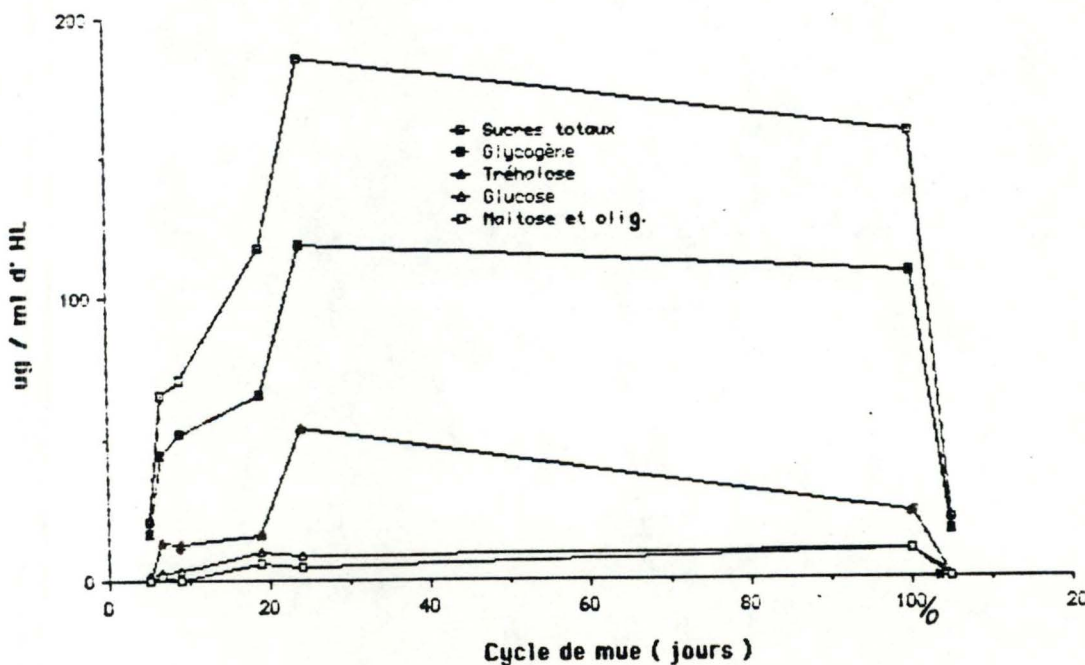


Fig.50 : évolution du taux des principaux glucides dans les hémocytes par ml d'HL en fonction du cycle de mue.

## **Conclusions :**

Le but de notre travail était de fournir des données expérimentales appuyant l'hypothèse de Johnston et al. ( 1971 ). Elle propose de considérer les cellules sanguines des Crustacés comme des hépatocytes circulants c.à-d. comme une population de cellules libres, capables d'accumuler, de transporter et de distribuer des matériaux glucidiques aux autres tissus selon leurs besoins variables aux différentes étapes du cycle de mue. Parallèlement, nous avons voulu établir un bilan le plus complet possible des glucides en distinguant le compartiment hémocytaire du compartiment plasmatique de manière à voir leurs interrelations.

La réalisation de ce projet s'est heurtée à plusieurs difficultés techniques essentiellement en relation avec la faible quantité de matériel disponible. Un échantillon d'hémolymphe de Carcinus maenas ne fournit en moyenne que l'équivalent de 2 mg d'hémocytes sur lesquels une série de dosages sont à effectuer.

De plus, il nous fallait disposer d'un nombre suffisant de crabes représentatifs de chacun des stades du cycle de mue. Pour ce faire, nous avons préféré procéder à plusieurs récoltes en milieu naturel plutôt que de rompre artificiellement la période d'arrêt de l'intermue, procédé assez aléatoire et perturbant pour le crabe ( Fourneau, 1986 ).

La présence de glucose et de glycogène dans l'hémolymphe totale ( plasma + hémocytes ) était connue ( Johnston, 1973; Spindler, 1976 ).

Nos résultats non seulement confirment ces données qualitatives mais ils les traduisent quantitativement.

De plus, nous sommes en mesure de présenter une répartition complète des glucides entre les fractions hémocytaire et plasmatique au cours du cycle de mue.

Celle-ci nous apprend que le glycogène s'accumule dans les hémocytes lors de l'intermue et est dégradé et libéré dans l'hémolymphe au cours de la prémue. Il en est de même pour le tréhalose, le maltose et les oligosaccharides.

Tout ceci suggère que les cellules jouent un rôle métabolique non négligeable dans le déroulement du cycle de mue.

D'autre part, la concentration du glucose hémocytaire supérieure à celle du plasma nous paraît postuler l'existence d'un transport actif de cette molécule à travers la membrane plasmique de ces cellules et donc d'un rôle

actif des hémocytes pour le stockage.

Quant aux disaccharides du plasma ( tréhalose, maltose, saccharose ), ils présentent tous un taux particulièrement élevé en prémue et aux alentours de l'exuviation. Leur rôle en tant que mode de transfert dans le mouvement des monosaccharides semble donc bien réel à un moment où le métabolisme de la chitine est particulièrement actif.

Nos résultats appuient l'hypothèse de Johnston en ce sens qu'ils montrent que, de fait, les hémocytes sont capables de stocker, transporter et de redistribuer des hydrates de carbone au moment voulu.

L'hypothèse de la synthèse du tréhalose par les hémocytes si elle s'avérait exacte argumenterait également en faveur de l'hypothèse de Johnston.

Nous n'avons pas abordé ici le problème de la destination finale des hydrates de carbone plasmatiques, qu'ils soient d'origine hémocytaire ou non. Sont-ils utilisés comme source d'énergie lors de la prémue, ou comme matériaux de synthèse de la chitine ou les deux à la fois ? D'autres recherches sont nécessaires pour en décider.

## Bibliographie

Abramowitz, A.A.; Hisaw, F.L.; Papandrea, D.N. ( 1944 )

The occurrence of a diabetogenic factor in the eyestalks of Crustaceans  
Biol. Bull., 86, n°1, 1-5.

Arnold, W.N. ( 1968 )

J. Theoret. Biol., 21, 33

Bauchau, A.G. (1966)

Anatomie interne et physiologie (chap.2 )  
in:La vie des crabes.Ed. P. Lechevalier-Paris  
Encyclopédie biologique : pp 33-45.

Bauchau, A.G. et De Brouwer, M.B. (1972 )

Ultrastructure des hémocytes d' Eriocheir Sinensis H.M. Edw  
Crustace Décapode Brachyoure.  
J. Microsc., 15, 171-179.

Bauchau, A.G. & Plaquet, J.C. (1973)

Variation du nombre des hémocytes chez les Crustacés Brachyours.  
Crustaceana, 24, 215-223.

Bauchau, A.G., De Brouwer, M.B., Passelecq-Gerin, E. et Mengeot, J.C. (1975)

Etude cytochimique des hémocytes des Crustacés Décapodes Brachyours.  
Histochem., 45, 101-113.

Bauchau, A.G. et Mengeot, J.C. (1978)

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

.Elanctet, M.F. ( 1974 )

Etude du contrôle hormonal du cycle d'intermue et de l'exuviation chez Orchestia gammarella par microcautérisation des organes Y et suivie d'introduction d'écolysterone.

C.R. Acad. Sc. Paris, t.278, série , 509-512.

.Eounias, M. ( 1976 )

Micro-analyse quantitative par chromatographie en couche mince de quelques métabolites de l'hémolymphe d'insectes.

I. - Les glucides libres.

Analysis, 1976, V.4, n°2, p.87 à 93.

.Eucher, T. & Klingenberg, M ( 1958 )

Angew. Chem., 70, 552.

.Busby, S.J.W. et al. (1976)

Regulation of glycogen phosphorylase system—from physical measurements to biological speculation.

In : Current Topics in Cellular Regulation, 10, 89-160

.Busselen, P. ( 1970 )

Effects of moulting cycle and nutritional conditions on haemolymph proteins in Carcinus maenas.

Comp. Biochem. Physiol., 37, 73-83.

.Busselen, P. (1971)

The presence of haemocyanin and of serum proteins in the eggs of Carcinus maenas, Eriocheir sinensis and Portunus holtsatus.  
Comp Biochem Physiol., 38 A, 317-328

.Calib, E ; Leloir, L.F. ( 1958 )

Biosynthesis of trehalose phosphate.  
J Biol. Chem. 231, 259-275.

.Candy,D.S. & Kilby,B.A. (1961)

The biosynthesis of trehalose in the locust fat body.  
Biochem J., 78, 531-536.

.Cassels F.J., J.J. Marchalonis and G.R. Vasta. ( 1986 ).

Heterogeneous humoral and hemocyte-associated lectins with N-acylaminosugar specificities from the blue crab Callinectes sapidus, Rathburn.  
Comp. Biochem. Physiol., 95B (1) : 23.

.Cavier,R. &Savel,R. (1960)

Rev. Espan. Fisiol., 16 (Suppl.1), 317.

.Ceccaldi, H.J.; Martin, J.L.M.; Chalozonitis, M.N. ( 1969 )

Evolution des protéines de l'hémolymphe chez Carcinus maenas (L.) durant l'ovogenèse.  
Sc. Soc. Biol., 163, 2638-2639.

.Chang,C.K., Liu,F. & Feng,H. (1964)

K'un Ch' ung Hsuch Pao, 13, 494.

.Charmantier, M. (1972)

Etude préliminaire de la leucopoïèse chez Pachygrapsus marmoratus

(Crustacé, Décapode) au cours du cycle d'intermue.  
C. A. Acad. Sc. Paris, 275, 683-686.

.Clegg, S.S. & Evans, D.R. ( 1961 )

The physiology of blood trehalose and its function during flight in the blowfly.

J. Exp. Biol. ( 1961 ), 38, 771-792. Printed in Great Britain.

Cowgill, B.W. ( 1959 )

Lobster muscle phosphorylase : purification and properties.

F. Biol. Chem., 234, 3146-3153.

.Cuenot, L. ( 1891 )

Les globules sanguins et les organes lymphoïdes des Invertébrés.

Arch. Anat. Microsc., 1, 153-192.

Cuzon, G. et Ceccaldi, H. J. ( 1972 )

Evolution des protéines de l'hémolymphe de Penacus kerathurus durant le jeûne.

Tethys, 3 ( 2 ), 247-250.

.Dean, J.M.; Vernberg, F.J. ( 1965 )

Variations in the blood glucose level of Crustacea.

Comp. Biochem. Physiol., 14, 29-34.

.De Wulf, H.; Stalmans, W.; Hers, H.G. (1970)

The effect of glucose and of a treatment by glucocorticoids on the activation in vitro of liver glycogen synthetase.

Europ. J. Biochem., 15, 1-8

.Dos Santos, E. A. and Pinto Colares, E. ( 1986 )

Blood glucose regulation in an intertidal crab, Chasmagnathus granulata (Dana, 1851 ).

Comp Biochem Physiol., 83a, N°4, 673-675

.Durliat, M. & Vranckx, R. ( 1976b )

Analyse des protéines hémoctaires d'Astacus leptodactylus.

C.R. Acad. Sc. Paris, 282 D, 2215-2218.

.Elbein, A.D. & Mitchell (1973)

J. Bacteriol., 113, 863.

.Evans, P.D. (1972)

The free amino acid pool of the hemocytes of Carcinus maenas (L.).

J. Exp. Biol., 56, 501-507.

.Fahrenbach, W.H. ( 1970 )

The cyanoblast. Hemocyanin formation in Limulus polyphemus

J. Cell. Biol., 44, 445-453.

.Fairbairn, D.J. (1958)

Trehalose and glucose in the helminths and other Invertebrates

Can. J. Zool. 36, 787-795.

.Fourneau, M. ( 1986 )

Caractérisation de l'hémolymphe et des hémoctes comme transporteurs de matériau et d'énergie au cours de la mue.

Mémoire en sciences zoologiques, F.N.D.P.

Gabe, M ( 1953 )

Sur l'existence chez quelques Crustacés Malacostracés, d'un organe comparable à la glande de mue des insectes.

C.R. Acad. Sc. Paris, 237, 1111-1113.

Ghiretti-Magaldi, A; Milanesi, C.; Togon, G. (1977)

Hemopoiesis in Crustacea Decapoda : origin and evolution of hemocytes and cyanocytes of Carcinus maenas

Cell Differentiation, 6, 167.

Gomorosova, S.A. ( 1976 )

Glycogen synthetase and fructose diphosphatase activity in the tissue of Mollusks ( Mytilus galloprovincialis ) and Crustaceans ( Balanus improvisus, Carcinus maenas ).

Zh. Evol. Biokhim. Fiziol., 12, 364-367.

Gwinn, J.F.; Stevenson, J.R. ( 1973 )

Role of acetylglucosamine in chitin synthesis in crayfish.

I : correlation of <sup>14</sup>C-acetylglucosamine incorporation with stages of the moulting cycle.

Comp. Biochem. Physiol., 45, 769-776.

Hackman, R. H. ( 1971 )

The integument of Arthropoda

In: Chemical Zoology, vol. 6, Part B, 1-62.

Hanstrom, B. ( 1931 )

Hormones in Invertebrates, 198, Oxford univ.

Heath, J.R.; Barnes, H. ( 1970 )

Some changes in biochemical composition with season and during the

moulting cycle of the common shore crab, Carcinus maenas (L.)  
J. Exp. Mar. Ecol., 5, 199-233.

.Horn, D.H.S.; Faux, A. ( 1968 )

Molting hormones of crab during ecdysis.  
Chem. Commun., 175-176.

.Hu, A.S.B.L. ( 1958 )

Glucose metabolism in the crab Hemigrapsus nudus.  
Archs Biochem. Biophys. 75, 387-395.

Ingermann, R. L.; Hall, R. E.; Bissonnette, J. M. and Terwilliger (1985 )  
Monosaccharide transport into hemocytes of a sipunculan worm Themiste  
dyscrita  
Am. J. Physiol., 249: R 139- R 144

.Johnson, P.T.; Steward, J.E.; Arie, B. (1981)

Histopathology of Aerococcus viridans infection in the lobster Homarus  
americanus and a comparison with histological reactions to a  
gram-negative species, Pseudomonas perolens.  
J. Invert. Pathol., 38, 127-148.

.Johnston, M.A et Davies, P.S. (1971)

Possible hepatic function of crustacean blood cells.  
Nature, 230, 471-472.

.Johnston, M.A.; Elder, H.Y.; Davies, P.S. (1973)

Cytology of Carcinus haemocytes and their function in carbohydrate  
metabolism.  
Comp Bioch Physiol., 46, 569-581.

.Jones, J.C. ( 1962 )

Current concepts concerning insect hemocytes  
Amer. Zool., 2, 209-246.

Keller, R. ( 1977 )

Comparative electrophoretic studies of phore-stimulating hormones from isolated sinus glands.

J. Comp. Physiol., 77 B, 122 : 359-373.

Kleinholz, L. H. and Little, B. C. ( 1949 )

Studies in the regulation of blood sugar concentration in crustaceans. I.

Normal values and experimental hyperglycemia in Libinia emarginata.

Biol. Bull. 96, 218-227.

Mantel, L.H. ( 1968 )

Am. Zoologist, 8, 433

Meenakshi, V.R. and B.T. Scheer ( 1961 )

Metabolism of glucose in the crabs Cancer magister and Hemigrapsus nudus.

Comp. Biochem. Physiol., 3, 30-41.

Nowosielski, J.W. & Patton, R.L. (1964)

Sciences, 144, 180.

Pahlic, M.;Stevenson, J. ( 1978 )

Glucosamine 6P synthesis in the epidermis.

Comp. Biochem. Physiol., 66b, 282-285

Parvathy Rajan K., H. H. Kharouf and A.P.M. Lockwood ( 1975 )

Rhythmic Cycles of Blood Sugar Concentrations in the Crab Carcinus maenas.

Passano, L.M. ( 1953 )

Neurosecretory control of molting in crabs by the X-Organ Sinusgland

complex.

Physiol. Compar. Oecol. 3, 155-189.

.Pequeux, A. ( 1979 )

Blood proteins as related to osmoregulation in Crustacea.

Comp. Biochem. Physiol., 64, 433-435.

.Ramamurthi, R.;Mumbach, M.W.; Scheer, B.T. (1969)

Endocrine control of glycogen synthesis in crabs.

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

.Ratcliffe, N.A.;Rowley, A.F. ( 1979 )

A comparative synopsis of the  
structure and function of the blood cells of insects and other  
Invertebrates.

Dvlpt. Comp. Immun., 3, 189-243.

.Ravindranath, M.H ( 1974 )

The haemocytes of an isopod Ligia exotica  
Roux J. Morph., 144, 11-22.

.Renaud, L. ( 1949 )

Le cycle des réserves organiques chez les Crustacés Décapodes.  
Ann. Inst. Océanog. Paris, 24, 259-357.

.Renwrantz, L. (1983)

Involvement of agglutinins (lectins) in Invertebrate defense reactions : the  
immuno-biological importance of carbohydrate-specific binding molecules.  
Dvlpt. Comp. Immun., 7, 603-60

.Sacktor, B. (1955)

Cell structure and the metabolism of insect flight muscle.  
J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 29-46.

.Santiago D., P.A. Santiago, A. McB.  
Block, and F. Sagardia. ( 1974 )

Purification and properties of glycogen phosphorylase a from the muscle of  
the blue crab, Callinectes danae.  
Arch. Biochem. Biophys., 163, 679-687.

.Schwoch, G. (1972)

Studies on trehalose metabolism in the crayfish.  
Comp. Biochem. Physiol. 43 B, 905-917.

.Sewell, M.T. (1955)

Lipo-protein cells in the blood of Carcinus maenas and their cycle activity  
correlated with the moult.  
Quantit. J. Microsc., 96, 73-83.

.Siebers, G. ( 1972 )

Mechanisms of intracellular isosmotic regulation of the amino acid concentration in the crayfish, Orconectes limosus  
Z. Vergl. Physiol., 76, 97-114.

.Söderhall, K.; Smith, V.J. ( 1983 )

Separation of the haemocyte populations of Carcinus maenas and other marine Decapods, and prophenoloxylase distribution.  
Dvlpt. Comp. Immun., Z, 229-229.

.Speck, V. et al. ( 1969 )

Das Kohlenhydratspektrum in den Organen des Fluzkrebse Orconectes limosus und seine Veränderungen im Jahresablauf.  
z. Vergl. Physiol. 65, 51-69.

.Spindler-Barth, M (1976 )

Changes in the chemical composition of the common shore crab, Carcinus maenas, during the molting cycle.  
J. Comp. Physiol., 105, 197-205.

.Stalmans W., H. De Wulf and H.-G. Hers ( 1971 )

The control of liver glycogen synthetase phosphatase by phosphorylase.  
Eur. J. Biochem., 18, 582-587.

.Tait, J. (1911)

Types of crustacean blood coagulation.  
J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 9, 191-198.

Telford, M ( 1968 )

Changes in blood sugar composition during the molt cycle of the lobster  
Homarus americanus.  
Comp. Biochem. Physiol., 26, 917-920.

Telford, M. (1968a)

The identification and measurements of sugars in the blood of three  
species of Atlantic crabs.  
Biol. Bull., 135, 574-584

Treherne, J.E. ( 1960 )

The nutrition of the central nervous system, in the cockroach, Periplaneta  
americana L. The exange and metabolism of sugars.  
J. Exp. Biol., 37, 513-533.

Vranckx, R.; Durliat, M. ( 1977 )

Etude des hémocytes circulants de quelques Crustacés Décapodes.  
Corrélations entre polymorphisme et mode de prélèvement.  
C.R. Acad. Sc. Paris, 285D, 1045-1047.

Wang, D.H.; Scheer, B.T. (1963)

UDPG-glycogen transglucosylase and a natural inhibitor in crustacean  
tissues.  
Comp. Biochem. Physiol., 9, 263-274.

Warren, L. ( 1964 )

The biosynthesis and metabolism of amino sugars and amino  
sugars-containing compounds.

.Webster S.G (1986)

Neurohormonal control of ecdysteroid biosynthesis by Carcinus maenas  
Y-organs in vitro, and preliminary characterization of the putative  
Molt-inhibition hormone (M.I.H.).  
Gen.Comp End., 61, 237-247.

.Wiens, A.W. & Gilbert, L.I. ( 1967 )

The phosphorylase system of the silkmoth, Hyalophora cecropia  
Comp. Biochem. Physiol., 21, 145-159.

.Williams J.A., Lutz P.L. (1975)

Blood cell types in Carcinus maenas and their physiological role.  
J.Mar.Biol.Assoc. U.K., 55, 671-674.

Williams J.A. ( 1985 )

An endogenous tidal cycle of blood-sugar concentrations in the shore crab  
Carcinus maenas (L.)  
Comp. Biochem. Physiol., 81, 627-631.

.Zélény, C ( 1905 )

The relation of degree of injury to the rate of regeneration.  
J. Exper. Zool., 2, 347-369.