



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Contrôle du stockage et de l'utilisation du glucose dans quelques situations physiologiques chez le crabe *Carcinus maenas* L.

Noël, Patrick Noël

*Award date:*  
1985

*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

---

Contrôle du stockage et de l'utilisation  
du glucose dans quelques situations  
physiologiques chez le crabe, Carcinus  
maenas L.

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

NOËL            Patrick

1984 - 1985

## Errata

p. 6, ligne 22 : lire "absorbent" et non "absobent".

p. 12, §III.2.2.2., ligne 4 : lire "sténohalins" et non "sténoalins".

p. 30, §III.5.1., ligne 10 : lire "(Telford, 1968)" et non "(Telfoul, 1968)".

p. 33, §III.5.3.1., ligne 7 : lire "euryhalins" et non "eurylins".

p. 35, §IV.1.2., ligne 6 : lire "poissonnerie" et non "poissonerie".

p. 37, §IV.2.1., ligne 2 : lire "céphalothorax" et non "céphalotorax".

p. 40, §IV.3.2.1., ligne 4 : lire "dont le glucosyl est marqué au C<sup>14</sup>".

p. 46, §V.1.1.1., ligne 1 : lire "développerons" et non développerons".

p. 57, §V.1.1.3., ligne 20 : lire "incubation" et non "incubat".

p. 60, ligne 2 : lire "Ces conditions expérimentales sont comparables à  
celles utilisées ...".

ligne 10 : lire "ce type d'expérience "in vitro" montre donc que la ...".

p. 71, ligne 2 : lire "demeure" et non "dmeure".

p. 73, §V.2.4., ligne 8 : lire "montrent" et non "montre".

§V.2.5., ligne 4 : lire "consisterait" et non "consist".

ligne 15 : lire "il semblerait" et non "il semblait".

T 129



Au terme de ce travail, il m'est agréable de remercier sincèrement tous ceux qui m'ont permis sa réalisation.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude au Professeur P. Devos qui m'a accepté dans son département et m'a prodigué une aide attentive et inlassable tout au long de cette année.

J'exprime aussi ma reconnaissance au Professeur A. Bauchau ainsi qu'à Marie - Thérèse Fontaine pour leurs judicieux conseils et leur constante disponibilité.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous les membres du département de Biologie animale pour leur gentillesse et leur patience.

Enfin, que mes parents qui m'ont permis de suivre ces études et m'ont toujours soutenu dans mon travail trouvent ici l'expression de ma reconnaissance la plus sincère.

TABLE DES MATIERES

I .	Orientation du travail	1
II .	Liste des abréviations	2
III .	Introduction	3
III.1.	Intérêt de l'étude expérimentale des crustacés	3
III.2.	Quelques notions d'anatomie et de physiologie des crustacés	4
III.2.1.	Etude de l'hépatopancréas et des branchies	4
III.2.1.1.	L'hépatopancréas	4
III.2.1.2.	Les branchies	8
III.2.2.	Respiration et osmorégulation chez les crustacés	8
III.2.2.1.	Respiration	8
	a) respiration aquatique	11
	b) respiration aérienne	11
III.2.2.2.	Régulation osmotique et ionique	12
	a) les branchies	13
	b) le système digestif	13
	c) les glandes antennaires	14
III.3.	Etude générale du glycogène et de la régulation de son métabolisme	15
III.3.1.	Le glycogène	15
III.3.1.1.	Structure du glycogène	15
III.3.1.2.	Synthèse et dégradation du glycogène	16
III.3.2.	Les enzymes clefs du métabolisme du glycogène	16
III.3.2.1.	La glycogène - synthase	16
III.3.2.2.	La glycogène - phosphorylase	19
III.3.2.3.	Les enzymes interconvertants	21
	a) La phosphorylase - phosphatase	21

b) La synthase - phosphatase	21
c) La phosphorylase - kinase	22
d) Les protéines - kinases	22
III.3.3. Conclusions sur la régulation du métabolisme du glycogène	23
III.4. Etude de la régulation du métabolisme du glycogène chez les crustacés	23
III.4.1. Contrôle hormonal de la glycémie chez les crustacés	25
III.4.2. Autres facteurs contrôlant la glycémie des crustacés	27
III.4.2.1. Régulation interne	27
III.4.2.2. Régulation externe	28
III.4.3. Conclusion sur les variations de la glycémie chez les crustacés	29
III.5. Importance relative des autres métabolites chez les crustacés	30
III.5.1. Les glucides	30
III.5.2. Les lipides	32
III.5.3. Les protides	33
III.5.3.1. Les acides aminés	33
III.5.3.2. Les protéines	33
IV . Matériel biologique et méthode	35
IV.1. Matériel biologique	35
IV.1.1. L'espèce <u>Carcinus maenas</u>	35
IV.1.2. Récolte	35
IV.1.3. Elevage	35
IV.2. Prélèvement des tissus	37
IV.2.1. Préparation de l'hépatopancréas	37
IV.2.2. Préparation des branchies	38
IV.3. Dosages enzymatiques	38

IV.3.1.	La glycogène - phosphorylase	38
IV.3.1.1.	Principe de la réaction	38
IV.3.1.2.	Mode opératoire	38
IV.3.1.3.	Préparation des réactifs	40
IV.3.2.	La glycogène - synthase	40
IV.3.2.1.	Principe de la réaction	40
IV.3.2.2.	Mode opératoire	40
IV.4.	Dosages des métabolites	41
IV.4.1.	Dosage des protéines	41
IV.4.1.1.	Principe de la réaction	41
IV.4.1.2.	Préparation des réactifs	42
IV.4.1.3.	Mode opératoire	42
IV.4.2.	Dosage des sucres totaux	42
IV.4.2.1.	Principe de la réaction	42
IV.4.2.2.	Préparation des réactifs	43
IV.4.2.3.	Mode opératoire	43
IV.4.3.	Dosage du glucose	43
IV.4.3.1.	Principe de la réaction	43
IV.4.3.2.	Préparation des réactifs	44
IV.4.3.3.	Mode opératoire	44
IV.4.4.	Dosage du glycogène	44
IV.4.4.1.	Principe de la réaction	44
IV.4.4.2.	Mode opératoire	45
V .	Résultats expérimentaux et discussion	46
V.1.	Mesure de l'activité de la phosphorylase et de la synthase	46
V.1.1.	Dosage de la phosphorylase	46
V.1.1.1.	Dosage sur hépatopancreas et branchies	46
	a) température d'incubation	46
	b) milieu d'homogénéisation	48
V.1.1.2.	Facteurs agissant sur l'activité de la phospho- rylase	53

a) température de préincubation	53
b) pH	53
c) dilution du milieu d'homogénéisation	56
d) temps d'incubation	56
V.1.1.3. Régulation "in vitro" de l'activité de la phosphorylase branchiale	57
V.1.2. Dosage de la synthase	60
V.1.2.1. Dosage sur hépatopancréas	60
V.1.2.2. Dosage sur branchies	62
V.1.2.3. Régulation "in vitro" de l'activité de la synthase branchiale	62
V.2. Relation entre activité enzymatique et situation physiologique	64
V.2.1. Exposition à des salinités variables	64
V.2.2. Exposition à l'air pendant différents temps	67
V.2.3. Recherche d'un facteur activateur de la phosphorylase	69
V.2.3.1. Facteurs externes	69
a) stress de manipulation	69
b) stress de surpeuplement	71
V.2.3.2. Facteur interne : la reproduction	71
V.2.4. Effet de l'ablation des P.O. sur l'activation de la phosphorylase	73
V.2.5. Activation de la synthase	73
VI . Conclusions générales	75
	78



## I . ORIENTATION DU TRAVAIL

Le stockage et l'utilisation des ressources énergétiques qu'elles soient protéiques, lipidiques ou glucidiques est un phénomène primordial pour la survie de tout animal. Parmi celles - ci, les glucides occupent une place particulière car il s'agit d'un type de réserve directement utilisable par l'organisme. C'est pour cette raison que notre travail expérimental s'est limité à l'étude du stockage et de la libération du glucose à partir du glycogène de certains organes chez les crustacés. En effet, nous avons essayé de mettre en évidence une relation entre des situations physiologiques où l'animal reconstitue ou dégrade ses réserves de glycogène et des adaptations métaboliques qui leur correspondent. Le mode d'approche s'est fait via l'étude cinétique des enzymes limitants pour la glycogénosynthèse et la glycogénolyse. Il s'agit respectivement de la glycogène - synthase et de la glycogène - phosphorylase.

Dans un premier temps, nous avons réalisé un travail de biochimie comparée qui a consisté en la mise au point du dosage de ces enzymes par l'adaptation à un invertébré supérieur (crustacé Brachyoure du genre Carcinus) des méthodes bien maîtrisées dans le cas des vertébrés supérieurs. Notre étude a porté à la fois sur l'hépatopancréas et les branchies qui sont reconnus comme organes à transfert énergétique important chez les crustacés.

Une fois cette mise au point réalisée, nous nous sommes intéressé à des situations physiologiques naturelles reproductibles en laboratoire dans lesquelles l'activation ou l'inactivation de ces enzymes limitants avaient le plus de chance d'apparaître. Il s'agit plus précisément du comportement du tissu branchial à ce point de vue en fonction de deux paramètres qui sont respectivement l'exposition à l'air et l'adaptation à différentes salinités.

---

II . LISTE DES ABREVIATIONS

AA	: acide aminé.
AANS	: acide aminonaphtol sulfonique.
AMP	: adénosine - 5' - monophosphate.
AMPc	: adénosine - 3', 5' - monophosphate cyclique.
ATP	: adénosine - 5' - triphosphate.
EDTA	: éthylène diaminotétraacétate.
GOD	: glucose oxydase.
G1P	: glucose - 1 - phosphate.
G6P	: glucose - 6 - phosphate.
HP	: hépatopancréas.
IMP	: inosine - 5' - monophosphate.
MAA	: molybdate acide d'ammonium.
Pi	: phosphate inorganique.
P.O.	: pédoncule oculaire.
POD	: peroxydase.
PMSF	: phényl méthane sulfonyl fluoride.
TCA	: acide trichloroacétique.
TRIS	: tris (hydroxyméthyl) aminoéthane.
UDP	: uridine diphosphate.
UDPG	: uridine diphosphoglucose.
[U - <sup>14</sup> C] UDPG	: uridine diphosphoglucose dont le glucose est uniformément marqué au C <sup>14</sup> .

---

### III . INTRODUCTION

#### III.1. Intérêt de l'étude expérimentale des crustacés.

Les avantages que l'on peut retirer de l'étude fondamentale des crustacés ne sont pas évidents pour tout le monde. Pourtant ils sont nombreux et comme prémisse à ce travail, voici quelques exemples qui soulignent l'importance des crustacés et justifient l'intérêt de ce type d'étude.

Les crustacés ont une importance économique indéniable et cela à plusieurs titres : d'abord, il est un fait que bon nombre de crustacés sont utilisés à des fins culinaires de par la saveur particulière de leur chair. De plus, ils ont un pouvoir nutritionnel considérable essentiellement en raison de leur contenu en matières protéiques et en sels minéraux.

A titre d'exemple et ce, uniquement pour les crustacés Brachyours (crabes), les représentants des familles suivants sont régulièrement consommés à travers le monde : Lithodidae (Anomura), Maïdae, Cancridae, Portunidae, Xanthidae, Potamidae, Geryonidae, Gecarcinidae et Oxypodidae. ↳ Potamon?

Toujours du point de vue économique, l'existence des crustacés n'a pas que des retombées positives et il arrive même qu'ils soient un fléau pour l'homme : dans certains élevages ostréicoles, le crabe Carcinus maenas peut faire des ravages considérables. Le crabe terrestre du genre Cardisoma peut envahir certains champs de riz et détruire toutes les jeunes pousses.

Le rôle des crustacés dans l'équilibre écologique est aussi à prendre en considération : en effet, ils représentent un maillon indispensable dans la chaîne alimentaire; ils constituent la nourriture potentielle de nombreux poissons et de plus, bon nombre d'entre eux sont détritivores. Par conséquent, ils peuvent aussi bien se situer en début qu'en fin de chaîne alimentaire.

Les retombées médicales de l'étude des crustacés sont très importantes elles aussi et cela pour plusieurs raisons : citons le cas de Simulium; diptère vecteur de la filaire Onchocerca volvulus pouvant provoquer des cas de cécité dans des villages entiers le long de plusieurs fleuves africains. Cet insecte pond ses oeufs sur les périopodes de certains

crabes de rivière, ce qui leur permet de passer la saison sèche sans problème de déshydratation. On peut aussi mentionner le cas de plusieurs espèces de crabes d'eau douce, hôtes intermédiaires de la douve pulmonaire du genre Paragonimus. Ces crabes, ingérés par l'homme peuvent provoquer une pathologie dont les symptômes sont comparables à la tuberculose. Les crustacés peuvent aussi avoir une utilité non négligeable en chirurgie : en effet, la chitine (polymère de N - acétylglucosamine) qui compose leur carapace (fig.1), une fois transformée en chitosan (polymère de glucosamine déacétylé), se présente sous la forme de fibres pouvant être implantées dans la peau, sans risque d'allergie et avec résorption lente. Il s'agit donc là, d'un matériau de choix pour les sutures chirurgicales.

Par ces quelques exemples illustrant les rôles prépondérants que jouent les crustacés aux niveaux économique, écologique et médical, il apparaît que leur étude n'est pas dénuée d'intérêt.

### III.2. Quelques notions d'anatomie et de physiologie des crustacés.

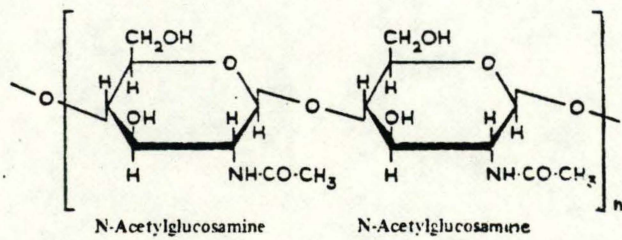
#### III.2.1. Etude de l'hépatopancréas et des branchies

Notre travail expérimental visait à étudier des variations métaboliques dans l'hépatopancréas. Mais suite à des problèmes techniques, nous avons polarisé notre attention sur les branchies qui sont, elles - aussi, des organes physiologiquement très actifs: Il convient de faire, par conséquent, une brève présentation de ces 2 types d'organes.

##### III.2.1.1. L'hépatopancréas.

Depuis le début de son étude, l'hépatopancréas à connu une variété très grande de dénominations (foie, pancréas, glande gastrique, glande, diverticule ou organe digestif, glande médiointestinale, etc...). Il s'agit, en tout cas, d'un organe vital pour les crustacés du fait qu'il est impliqué dans une multitude d'activités métaboliques : il est premièrement responsable de la synthèse et de la sécrétion

Fig.1 -chitine



d'enzymes digestifs et consécutivement à cela de l'absorption de matériel nutritif, mais il est aussi impliqué dans l'excrétion, le cycle de mue, le stockage de réserves inorganiques et le métabolisme plus particulièrement des lipides et des hydrates de carbone.

Une étude cyt~~x~~ologique très poussée de l'hépatopancréas a été réalisée par Gibson et Baker (1979). Elle a permis d'expliquer bon nombre de fonctions de cet organe. Il est composé de 4 types de cellules dont les interactions sont très importantes (fig. 2). Les cellules E ou "embryonnaires" sont indifférenciées et subissent de nombreuses mitoses. Les cellules F ou "fibrillaires" (appelées de la sorte à cause de leur structure lamellaire formée de réticulum endoplasmique observé en M.O.) absorbent les éléments nutritifs et synthétisent des enzymes digestifs. Par la suite, elles se différencient en cellules B ou "Blasenzellen" (qui signifie "cellules volumineuses" à cause de la présence d'une énorme vacuole dans le cytoplasme) qui secrètent les enzymes concentrés dans cette vacuole. Les cellules R ou "Restzellen" (ce qui veut dire "cellules trouées" aspect dû à l'élimination des lipides lors de la préparation des coupes) absorbent les produits de digestion et les stockent principalement sous forme de lipides et de glycogène. Lorsque ces cellules dégènèrent, elles secrètent des produits émulsifiants dans le jus gastrique. Les cellules R représentent près de 80 % des cellules épithéliales de l'hépatopancréas. Elles contiennent comme nous l'avons signalé, de grosses quantités de lipides et de glycogène, mais aussi d'après les études de Huner (1979) des granules de carbonates et de phosphate de calcium (Becker, 1974; Guary, 1981) qui sont utilisés dans la calcification de l'exosquelette et dans la détoxification de l'organisme vis à vis des métaux lourds en excès qui sont piégés dans ces granules et éliminés dans la lumière de l'hépatopancréas (Guary, 1981).

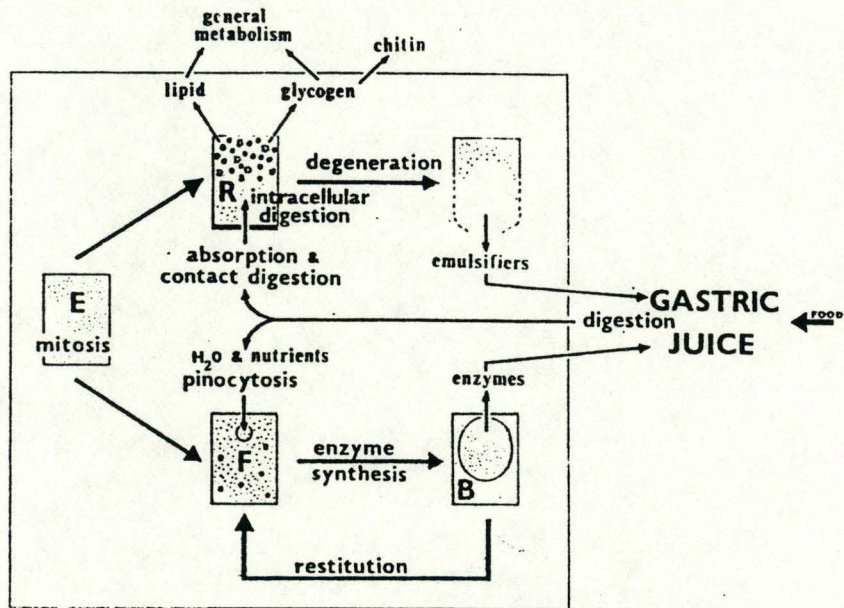


Fig.2 - Représentation schématique des principales activités associées avec les différentes cellules de l'HP de Décapodes dans la digestion et l'absorption de matériel nutritif

### III.2.1.2. Les branchies.

Les branchies de crustacés sont fortement impliquées dans les mécanismes de respiration, mais aussi de régulation osmotique et ionique (voir § III.2.2.). Leur nombre variable suivant les espèces, est en général de neuf par chambre branchiale (fig.3). Chacune est composée d'un rachis médian portant latéralement deux rangées de nombreux saccules lamellaires empilés où circule l'hémolymphe (fig.4). Le tégument des branchies correspond à une fine couche de chitine recouvrant un épithélium composé principalement de deux types de cellules : des cellules pavimenteuses de 1 à 2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur qui permettent à l'oxygène de diffuser facilement et des cellules de 10 à 20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur qui jouent un rôle important dans les transports d'ions et d'eau lors de l'osmorégulation.

### III.2.2. Respiration et osmorégulation chez les crustacés

Comme nous avons décidé d'étudier les conséquences métaboliques, au niveau de la régulation des hydrates de carbonés, des mécanismes essentiellement de type respiratoire et osmorégulateur, il convient de faire une description générale de leur fonctionnement chez les crustacés.

#### III.2.2.1. La respiration.

Si on fait une brève étude phylogénétique de la respiration chez les crustacés, on remarque que ce mécanisme s'est fort diversifié. En effet, les crustacés primitifs développent une respiration tégumentaire, tandis que d'autres ont mis au point une respiration par prise orale et anale d'eau. Le tube digestif est donc utilisé comme soutien principal de la respiration. Par contre chez les crustacés supérieurs tels que les crabes, la respiration est assurée par des structures spécialisées, les branchies, aidées en cela par une respiration tégumentaire plus ou moins importante suivant les espèces.

Le mécanisme de la respiration peut être divisé en plusieurs étapes : il y a d'abord la ventilation des chambres branchiales qui correspond au transport de l'oxygène depuis l'environnement vers les organes d'échanges respiratoires



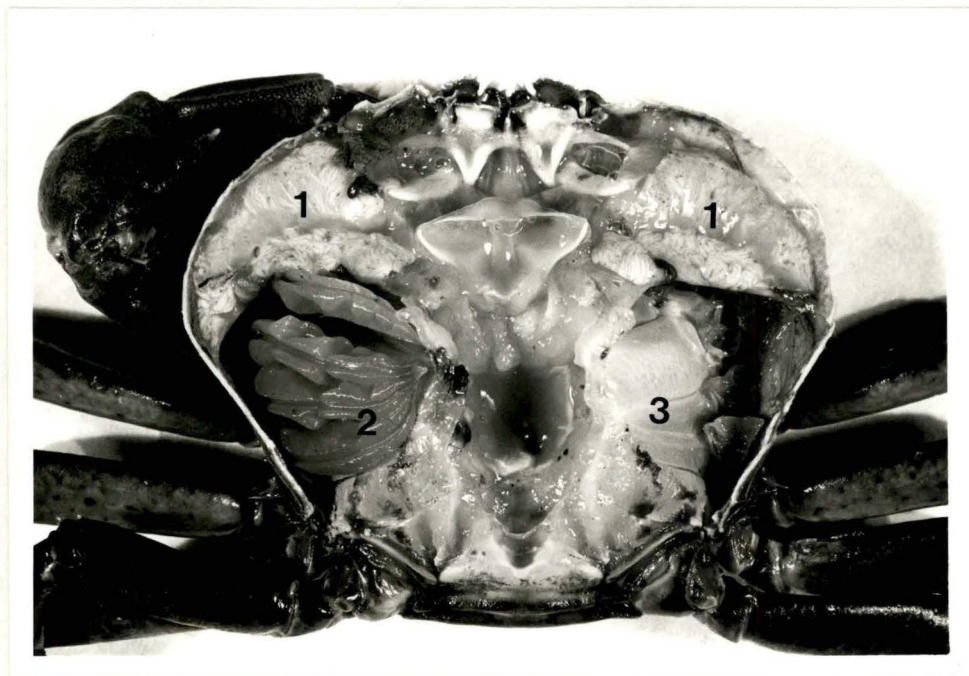
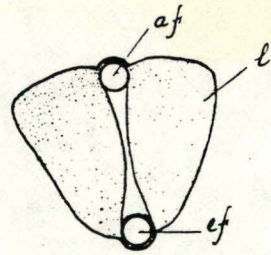


Fig.3 - Anatomie interne du crabe. 1: hépatopancréas;  
2: branchies; 3: chambre branchiale.

Fig. 4 — Coupe transversale d'une branchie, montrant le rachis médian, flanqué latéralement de deux saccules lamellaires (*l*). Le sang arrive par un vaisseau dorsal (*af*.) et quitte la branchie par un vaisseau ventral efférent (*ef*.).



(branchies). Ensuite vient la prise d'oxygène proprement dite qui correspond à son passage du milieu où baigne les branchies à travers la paroi de celles - ci. Cette étape est suivie par la perfusion qui correspond à la libération de l'oxygène par les branchies, au transport de celui - ci par l'hémolymphe et à son utilisation par les tissus. Il est intéressant de connaître plus en détail tous ces mécanismes dans 2 conditions qui sont respectivement la respiration en immersion et la respiration en émergence.

#### a) la respiration aquatique

Beaucoup d'études ont déjà été faites au niveau des sites d'échanges gazeux. De ces travaux, il résulte que la prise d'oxygène et l'élimination du dioxyde de carbone dans l'eau à travers les surfaces respiratoires ne se ferait que par diffusion et jusqu'à présent, aucun processus de transport actif n'a été démontré (Taylor, 1978).

La ventilation est un phénomène important chez les crabes car les branchies sont enfermées dans des cavités branchiales et la génération d'un courant ventilatoire est due à 2 phénomènes : il y a d'abord, la mobilité relative des branchies qui sont insérées à la base des péréopodes. Ensuite, il existe un organe spécialisé, le scaphognathite, dont les battements complexes génèrent, par un système de pompage, un flux d'eau à travers les chambres branchiales, du pore inhalant situé à l'arrière de l'animal vers le pore exhalant situé dans sa région buccale.

Chez les crustacés décapodes les plus évolués, l'échange gazeux entre l'eau et l'hémolymphe se fait à contre - courant, ce qui a pour effet d'augmenter le rendement du système. Une fois l'oxygène dans l'hémolymphe, il est capté par les pigments respiratoires ce qui maintient un gradient de diffusion à travers les branchies.

#### b) la respiration aérienne

Comme l'air contient de 20 à 40 fois plus d'oxygène que l'eau, se trouvant en équilibre avec lui, et que sa densité est 1000 fois inférieure à celle de l'eau, l'exposition à l'air chez les crustacés entraîne en général une diminution des dépenses énergétiques nécessaires pour la ventilation des chambres branchiales (Newell, 1972).

Les études de Truchot (1975) ont démontré que le crabe de rivage, Carcinus maenas, qui supporte des expositions aériennes pendant plusieurs jours, est souvent exposé à des émergences entre les marées pendant plus ou moins 6 heures. Cela suggère donc que l'animal doit être capable de maintenir un métabolisme aérobie en respirant l'air à marée basse. Ce phénomène nécessite des adaptations particulières qui varient suivant les espèces : en effet, lors de l'exposition à l'air, la diffusion passive de l'oxygène à travers les surfaces respiratoires augmente et cela aurait pour conséquence de provoquer une élévation de la tension partielle en oxygène dans l'hémolymphe si certains mécanismes n'étaient pas mis en place; la plupart des espèces ralentissent leurs battements cardiaques et diminuent ainsi leur métabolisme pour que la prise d'oxygène soit minimale. Certaines espèces collapsent leurs branchies, ce qui entraîne une diminution de la surface d'échange et par conséquent une limitation des échanges gazeux. Par contre, il apparaît chez les Carcinus maenas ainsi que chez beaucoup d'autres crabes de la zone intertidale, un durcissement des branchies pour prévenir un collapse trop important, ce qui permet aux individus de maintenir une consommation en oxygène en moyenne plus élevée lors de la transition eau - air (Taylor, 1978). Il s'agit d'un phénomène qui n'est pas encore expliqué.

D'une manière générale, on observe donc une diminution du métabolisme lors de l'exposition à l'air afin d'éviter une tension partielle trop élevée en oxygène dans l'hémolymphe.

#### III.2.2.2. La régulation osmotique et ionique.

L'observation du monde marin et plus particulièrement celle des crustacés, nous montre qu'il existe 2 types d'individus : les animaux, ne tolérant que des variations étroites de salinité du milieu, qui sont dits "sténoalins" et ceux qui supportent de larges variations de salinité externe, les "euryhalins". Carcinus maenas fait partie de ce dernier groupe et il convient donc d'étudier plus spécialement les mécanismes d'osmorégulation propres aux euryhalins.

Les études de Krogh (1965) ont défini deux groupes d'osmorégulateurs euryhalins. Il existe d'abord les hyperos-

moregulateurs (Carcinus maenas, Eriocheir sinensis) qui une fois dans les eaux dont la dilution est supérieure à l'hémolymphe, doivent faire face à un problème de gain d'eau et de perte d'ions. L'autre groupe est celui des hypoosmorégulateurs (Pachygrapus crassipes, Artémia salina) qui maintiennent leur hémolymphe à une concentration inférieure à celle de l'eau environnante. De nombreuses études réalisées sur les hyperosmorégulateurs, il résulte que plusieurs organes interviennent dans la régulation osmotique et ionique.

#### a) les branchies

Les études "in vitro" de King (1969) ont démontré l'existence d'un transport actif d'ions à travers les branchies de certains crabes dont Carcinus maenas. En général, on observe chez les crustacés en osmorégulation une augmentation de leur activité métabolique quand ils sont dans de l'eau de mer diluée, tandis que ceux, qui sont en osmoconformité, la maintiennent à un niveau plus bas. Cette activité métabolique élevée chez les individus en osmoregulation fait intervenir l'activation d'un enzyme, l'ATPase, qui permet le transport de cations dans les tissus de beaucoup de vertébrés, dans les branchies et les glandes antennaires des crustacés. On observe chez les hyperosmorégulateurs une activité plus élevée de l'ATPase des branchies, si l'animal doit s'adapter à un milieu dilué (Mantel, 1977).

Les études faites par Chapelle (1977) sur Eriocheir sinensis semblent mettre en évidence un rôle particulièrement important des lipides dans l'osmorégulation, mais cela n'est pas accepté par tous et ils semblerait que le rôle du glycogène dans ce phénomène ne soit pas à négliger.

#### b) Le système digestif

Comme on vient de le voir, les branchies jouent un rôle primordial dans l'osmorégulation, mais elles sont aidées dans cette tâche par d'autres organes dont fait partie le tube digestif (Ahearn, 1977).

En effet, une absorption orale et anale d'ions a été observée chez beaucoup d'espèces (Fox, 1952). La preuve du rôle actif du système digestif dans l'osmorégulation a été apportée par les études de Towle (1981) qui a mis en évidence sur Carcinus maenas une activité ATPasique importante lors des prises ou des libérations d'ions.

### c) les glandes antennaires

Les glandes antennaires, ou organes rénaux, interviennent dans la réabsorption compensatoire de Na Cl. Lorsque Carcinus maenas est maintenu dans de l'eau de mer diluée, la production d'urine augmente après quelques minutes et ce, avant que le volume interne n'augmente significativement (Norfolk, 1980). Cette observation a permis de postuler l'existence d'un médiateur chimique activé ou produit en réponse à des changements de salinités enregistrés par un récepteur externe. Ce mécanisme qui augmente la production d'urine si la pression interne devient trop élevée, pourrait être relié au système qui diminue la perméabilité de Carcinus maenas exposé à de l'eau de mer diluée (Spaargaren, 1974). Il apparaît donc que chez cette espèce, il existe un système qui opère de telle sorte que l'animal change sa perméabilité, son taux de flux d'urine et aussi sa prise de sel en réponse aux variations du milieu ambiant. Il est évident que, pour un animal d'estuaire comme Carcinus maenas exposé continuellement à des changements de salinités, un tel système permet d'éviter des variations trop importantes du milieu interne.

### III.3. Etude générale du glycogène et de la régulation de son métabolisme

#### III.3.1. Le glycogène

##### III.3.1.1. Structure du glycogène.

Le glycogène est le principal polysaccharide de réserve des cellules animales. Il se présente dans beaucoup d'organes sous forme de gros granules de diamètre variable, les particules  $\alpha$ . Elles sont des amalgames de granules plus petits, les particules  $\beta$ , de diamètre fixe cette fois. Son poids moléculaire pouvant atteindre plusieurs centaines de millions, varie en fonction du nombre d'unité  $\beta$  dont il se compose.

D'un point de vue biochimique, il est constitué d'unités glucosyles unies entre elles par des liaisons  $\alpha$ -1,4 - glucosidiques formant des chaînes linéaires qui sont greffées les unes aux autres par des liaisons  $\alpha$ -1,6 - glucosidiques, ce

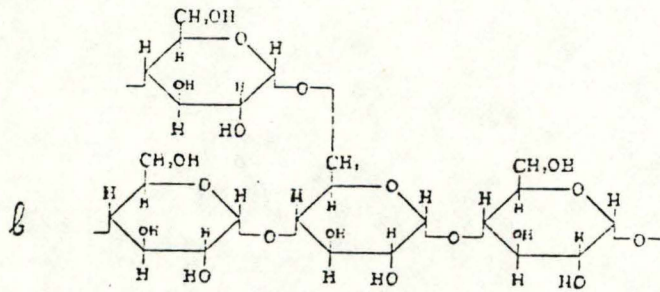
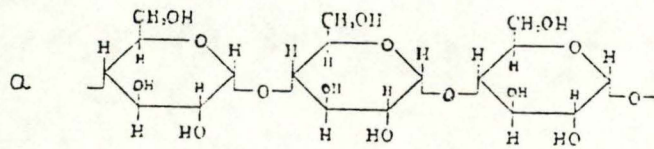
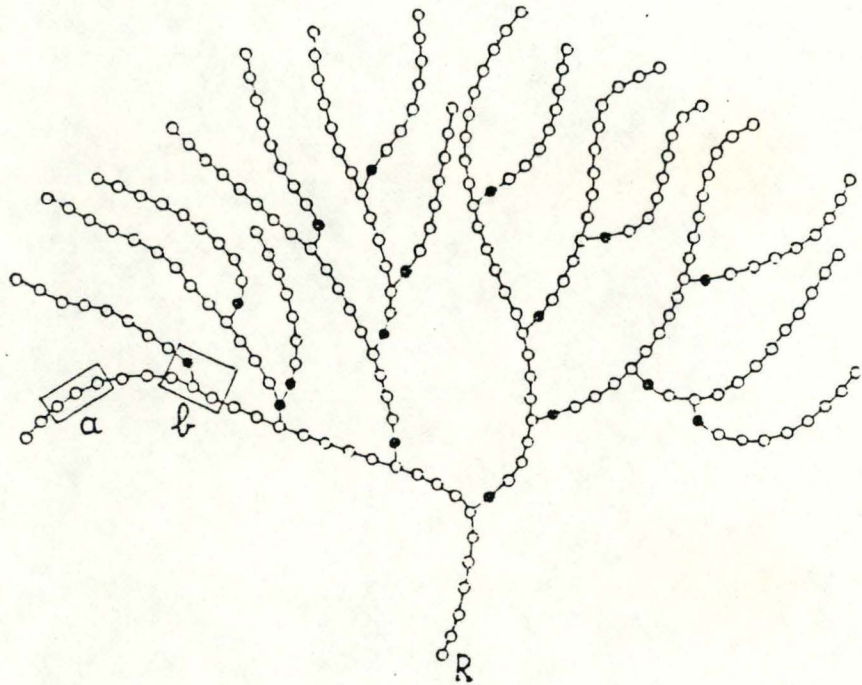


Fig. 5 - Structure du glycogène (schéma selon Cori, 1955). Les unités glucosyles rattachées par des liaisons  $\alpha$ -1,4-glucosidiques sont représentées par les cercles clairs; les unités glucosyles rattachées par une liaison  $\alpha$ -1,6-glucosidique sont représentées par les cercles noirs. R représente l'extrémité réductrice du glycogène. La structure des fragments a et b est donnée plus en détail.

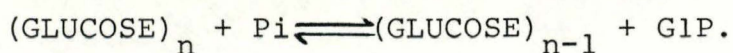
qui confère à la molécule une structure arborescente (fig.5 ). les chaines internes, soit les segments linéaires compris entre deux points de ramification, sont composés en moyenne de 3 à 4 unités glucosyles; les chaines externes, plus longues, contiennent environ 10 unités.

### III.3.1.2. Synthèse et dégradation du glycogène.

La synthèse comme la dégradation du glycogène comportent une série d'étapes enzymatiques (fig.6 ). Deux enzymes parmi toutes celles mentionnées dans cette figure, ont particulièrement retenu notre attention : la glycogène - synthase et la glycogène - phosphorylase.

La glycogène - synthase est l'enzyme limitant de la glycogénosynthèse; elle catalyse le transfert du glycosyl de l'UDPG sur les extrémités non réductrices du glycogène, suivant l'équation : 
$$\text{UDPG} + (\text{GLUCOSE})_n \longrightarrow \text{UDP} + (\text{GLUCOSE})_{n+1}$$

La glycogène-phosphorylase est l'enzyme limitant de la glycogénolyse. Elle catalyse la phosphorylation des extrémités non réductrices du glycogène suivant l'équation :



### III.3.2. Les enzymes clefs du métabolisme du glycogène

Nous décrirons dans ce paragraphe les principales caractéristiques de la glycogène - synthase, de la glycogène - phosphorylase et des enzymes permettant leur interconversion (phosphorylase - phosphatase, synthase - phosphatase, phosphorylase - kinase, protéine - kinase). La fig.7 schématise le rôle des différentes protéines et situe le lieu d'action de certains effecteurs.

#### III.3.2.1. La glycogène - synthase.

La glycogène - synthase peut se trouver sous 2 formes interconvertibles par un processus de phosphorylation au dépend de l'ATP, en présence de Mg ++, ainsi que par un processus de déphosphorylation. Une synthase - kinase est responsable de sa phosphorylation. L'enzyme ainsi phosphorylée est quasi inactif "in vivo", mais peut-être activé "in vitro" par



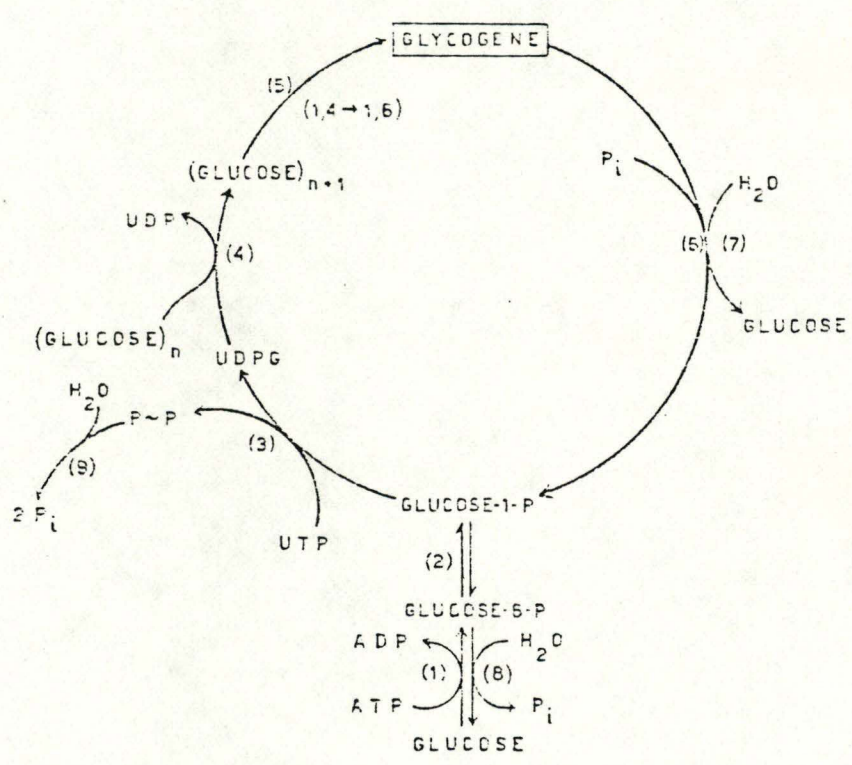


Fig. 6 - Voies métaboliques de la synthèse et de la dégradation du glycogène.

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

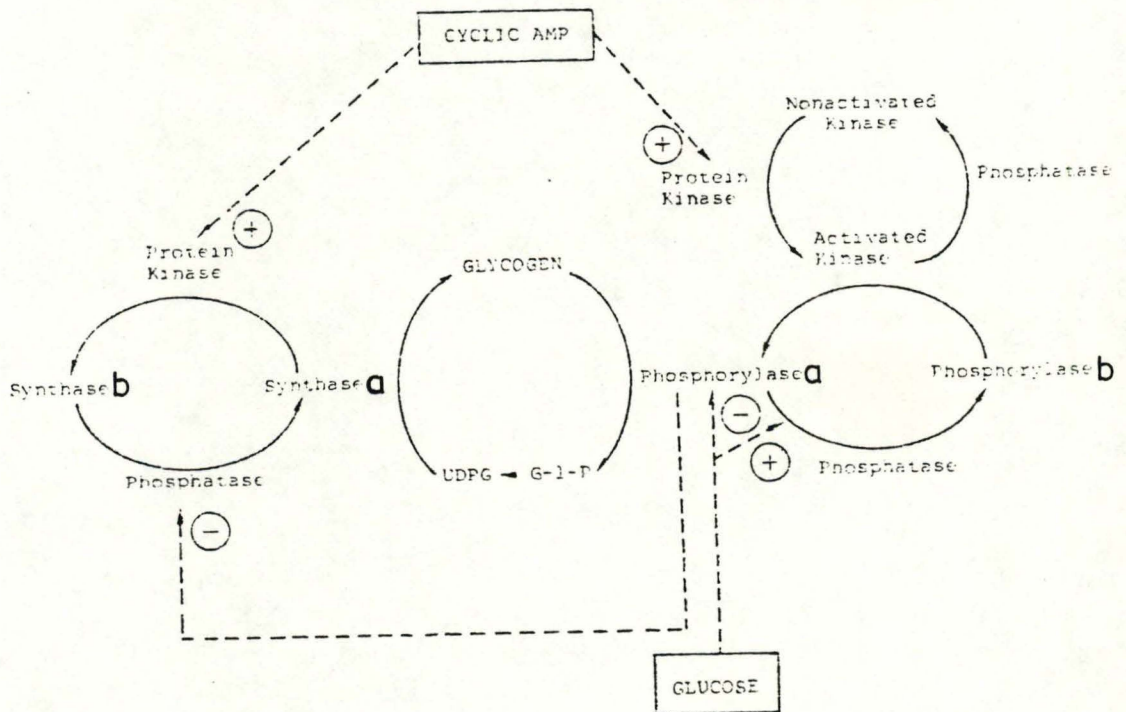


Fig. 7 - Interconversion des deux formes de la glycogène-phosphorylase et de la glycogène-synthase dans le foie, et son contrôle par l'AMP-cyclique et par le glucose.

le G6P (de Wulf, 1968); l'enzyme fut appelé D en raison de cette dépendance vis - à - vis de l'hexose - phosphate. L'enzyme déphosphorylé est, lui, actif indépendamment du G6P, d'où son nom de synthase I. Cette dénomination d'enzymes I et D portait à confusion et on proposa donc l'appellation de synthase a (enzyme actif) et synthase b (enzyme moins actif) par analogie avec la phosphorylase (voir § III.3.2.2.).

Le Pi, ion bien représenté dans la cellule, joue un rôle important dans l'activité de la synthase : il stimule la synthase a mais est sans effet sur la synthase b. De plus, chez les vertébrés, en quantité physiologique, il a pour effet d'annuler la stimulation de la synthase b par le G6P et de lever l'inhibition de l'ATP sur la synthase a (de Wulf, 1968). Il a été observé aussi que l'ion Mg<sup>++</sup> a sur les 2 formes de l'enzyme un effet similaire au G6P, ce qui explique peut-être que l'ATP - Mg, forme prévalente du nucléotide, est moins inhibiteur que l'ATP seul (de Wulf, 1968). Le sulfate a des effets comparables au Pi (de Wulf, 1968). Cette observation est très importante d'un point de vue méthodologique. En effet, le dosage spécifique de la synthase a peut être fait aussi bien en présence d'ions sulfate que phosphate, ce qui est avantageux car le Pi pourrait favoriser la phosphorylation des unités glucosyles qui ont été incorporées au glycogène et dès lors entraîner un risque de sous - estimation de l'activité enzymatique.

La synthase se trouve essentiellement sous la forme d'un dimère de poids moléculaire plus ou moins égal à 170.000; mais on peut la trouver également sous forme de tétramère.

#### III.3.2.2. La glycogène - phosphorylase.

La glycogène - phosphorylase se trouve aussi sous 2 formes interconvertibles, la phosphorylase a (enzyme actif) et la phosphorylase b (enzyme moins actif). L'inactivation est, cette fois, le résultat d'une déphosphorylation catalysée par la phosphorylase - phosphatase. La réaction inverse qui correspond à l'activation de la phosphorylase b est catalysée par une phosphorylase - kinase en présence d'ATP et Mg<sup>++</sup> (Wiens, 1967; Stalmans, 1970). "In vitro", en présence d'un excès de G1P par rapport au Pi, la phosphorylase peut catalyser la synthèse de glycogène.

"In vivo", étant donné l'important excès de Pi par rapport au GlP existant dans la cellule, elle opère exclusivement dans le sens de la dégradation du glycogène (Busby, 1976).

La phosphorylase a été purifiée à partir de beaucoup d'organismes dont les crustacés chez qui elle se trouve plus ou moins sous la même forme que chez les vertébrés, il s'agit d'un dimère de poids moléculaire proche de 180.000, mais elle peut aussi se retrouver sous la forme d'un tétramère (Santiago D., 1974).

L'inhibition de la phosphorylase a par le glucose qui diminuait l'affinité de celle-ci pour le GlP a été démontré à maintes reprises chez les vertébrés (Stalmans, 1970) ainsi que chez les crustacés (Santiago P.A., 1974). Elle est activée par l'AMP (Busby, 1976) et il existe en outre, chez les vertébrés, un antagonisme entre l'AMP et le glucose, chacun de ces ligands s'opposant à la liaison de l'autre sur la phosphorylase (Stalmans, 1970). La caféine et la théophylline sont aussi des inhibiteurs de la phosphorylase de vertébrés mais cet effet est contrecarré par l'AMP (Stalmans, 1970; Busby, 1976).

Le glucose, l'AMP, la caféine en plus de leur effet sur la phosphorylase a de vertébrés confèrent à celle-ci des conformations qui influencent l'activité de la phosphorylase - phosphatase (voir § III.3.2.3.a).

Des études cristallographiques de la phosphorylase de vertébrés suggèrent qu'elle est composée de monomères possédant 3 sites de liaison importants : le "site actif" auquel se lie le substrat (GlP) ou ses inhibiteurs (glucose ou G6P), le "site nucléotide" qui a une forte affinité pour l'activateur allostérique, AMP et enfin le "site nucléosides" auquel se lient toute une série d'inhibiteurs allostériques tels que caféine ou théophylline (Dombardi, 1980). La liaison de chaque effecteur à son site propre fait varier de façon allostérique l'affinité de la phosphorylase pour le GlP. Ces études cristallographiques montrent également que la liaison de l'AMP au "site nucléotides" celle du glucose au "site actif" celle de la caféine ou d'autres inhibiteurs au "sites nucléosides" donnent à la phosphorylase a une conformation qui cache (dans le cas de l'AMP) ou qui expose (dans le cas du glucose ou de la caféine), le groupement phosphate impliqué dans la réaction avec la phosphorylase - phosphatase.

La phosphorylase b de vertébrés est totalement active en présence d'AMP ainsi qu'en présence de différents anions (sulfate, fluorure), son activité est inhibée par la caféine et fortement influencée par le pH. On peut tirer parti de ces propriétés pour doser spécifiquement la phosphorylase a en présence de caféine, ou la phosphorylase totale (a + b) en présence d'anions, d'AMP et à pH 6,5, conditions dans lesquelles la phosphorylase b est aussi active que la phosphorylase a (Stalmans, 1975).

### III.3.2.3. Les enzymes interconvertants.

#### a) La phosphorylase - phosphatase -

La phosphorylase - phosphatase, chez les vertébrés est inhibée par le Na F, L'AMP et l'IMP et est stimulée par la caféine et le glucose (Stalmans, 1970). On sait actuellement que tous ces effets sont le résultat d'une interaction de ces ligands avec la phosphorylase a : le glucose et l'AMP, entre autre, se liant à la phosphorylase a, rendent celle - ci respectivement meilleur ou moins bon substrat pour la phosphorylase - phosphatase (Stalmans, 1975).

Comme nous l'avons vu au paragraphe III.3.2.2., on a pu montrer par des études cristallographiques comment le glucose, l'AMP et la caféine, en agissant sur la conformation de la phosphorylase a, rendent le groupement phosphate plus ou moins accessible à la phosphorylase - phosphatase.

#### b) La synthase - phosphatase -

Les résultats obtenus sur les vertébrés par de Wulf et Hers (1968) ont permis de postuler l'existence d'une synthase - phosphatase catalysant l'activation de la synthase b. Une caractéristique importante de la synthase - phosphatase est son inhibition par la phosphorylase a (Stalmans, 1971). Dès 1970, de Wulf et ses collègues observaient qu'un filtrat de foie de souris présentait une latence dans l'activation de la synthase. Stalmans (1970, 1971) montre que cette latence correspond au temps nécessaire à la phosphorylase - phosphatase pour inactiver la phosphorylase a qui se comporte comme un puissant inhibiteur de la synthase - phosphatase et son inactivation doit être quasi complète pour que la synthase puisse commencer à s'activer (Stalmans, 1971).

Tout effecteur influencant l'activité de la phosphorylase - phosphatase (glucose, caféine, AMP, Na F, etc...) modulera par conséquent la longueur de la latence par l'intermédiaire de la phosphorylase a (de Wulf, 1970; Stalmans, 1970 et 1971). La phosphorylase b n'est que faiblement inhibitrice.

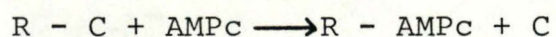
c) La phosphorylase - kinase -

Chez les vertébrés, la phosphorylase - kinase est l'enzyme qui active la phosphorylase b par un mécanisme de phosphorylation en présence d'ATP - Mg. Il s'agit d'un enzyme de poids moléculaire de l'ordre de 1.300.000 (Busby, 1976) qui est interconvertible et dont l'activation est le résultat d'une phosphorylation par une protéine - kinase dépendant de l'AMP cyclique, tandis que l'inactivation résulte d'une déphosphorylation par des phosphatases.

L'ion Ca<sup>++</sup> est responsable de l'activation de la phosphorylase - kinase (Busby, 1976) et on peut ainsi provoquer une inactivation de la phosphorylase - kinase par l'EDTA qui complexe les ions Ca<sup>++</sup> (Zammit, 1976).

d) Les protéines - kinases -

La protéine-kinase de vertébré, ou phosphorylase - kinase - kinase, qui phosphoryle la phosphorylase - kinase, a une action non spécifique puisqu'elle agit également sur la synthèse. Le fait que l'activation de la phosphorylase - kinase et l'inactivation de la synthèse soient dues à la même protéine - kinase, permet d'éviter une situation où phosphorylase et synthèse seraient activées en même temps. Une caractéristique essentielle de cette protéine - kinase est sa dépendance de l'AMP cyclique pour être active. Elle est en effet composée de 2 unités : l'une, appelée C, est la composante catalytique et l'autre, appelée R, est l'unité régulatrice. Quand ses 2 sous - unités sont associées, la protéine - kinase est inactive. L'AMP cyclique a pour effet de se lier à l'unité R et de libérer l'unité C qui peut alors manifester son activité.



### III.3.3. Conclusions sur la régulation du métabolisme du glycogène

D'une manière générale, que ce soit chez les vertébrés ou les invertébrés, les activités de la phosphorylase et de la synthase résultent d'un équilibre entre phosphatases et kinases. La cellule possède toutefois 2 systèmes permettant à la glycogénolyse et à la glycogénosynthèse de ne pas opérer ensemble : d'une part, l'existence d'une protéine - kinase unique permet à la synthase d'être inactivée quand la phosphorylase s'active et d'autre part, l'inhibition de la synthase - phosphatase par la phosphorylase a empêche la synthase de s'activer tant qu'il reste suffisamment de phosphorylase sous forme active. Tout élément faisant varier l'activité des enzymes interconvertants bouleverse l'équilibre existant et provoque un changement d'activité de la synthase et de la phosphorylase. Nous étudierons dans le chapitre suivant différents facteurs qui peuvent modifier le métabolisme du glycogène et par conséquent l'activité des 2 enzymes limitants pour la glycogénolyse et la glycogénosynthèse chez les crustacés.

### III.4. Etude de la régulation du métabolisme du glycogène chez les crustacés

La phylogénèse de la glycémie dans le règne animal nous révèle que le glucose est utilisé comme source d'énergie aussi bien chez les unicellulaires que chez les invertébrés et vertébrés. Ceci suggère que le métabolisme du glucose est apparu très tôt au niveau évolutif et qu'il s'est développé de façon assez parallèle chez les vertébrés et invertébrés. Par conséquent, il est assez logique que l'on retrouve de très grandes similitudes pour ce qui regarde la régulation de la glycémie dans ces 2 grands groupes évolutifs.

L'activité physiologique et métabolique des invertébrés, comme celle des vertébrés, est soumise à un contrôle endocrinien où interviennent de multiples hormones qui sont produites et stockées dans différents centres neuroendocriniens et véhiculées par la circulation sanguine. Chez les crustacés en particulier, la glycémie varie dans des limites beaucoup plus larges que chez les vertébrés.

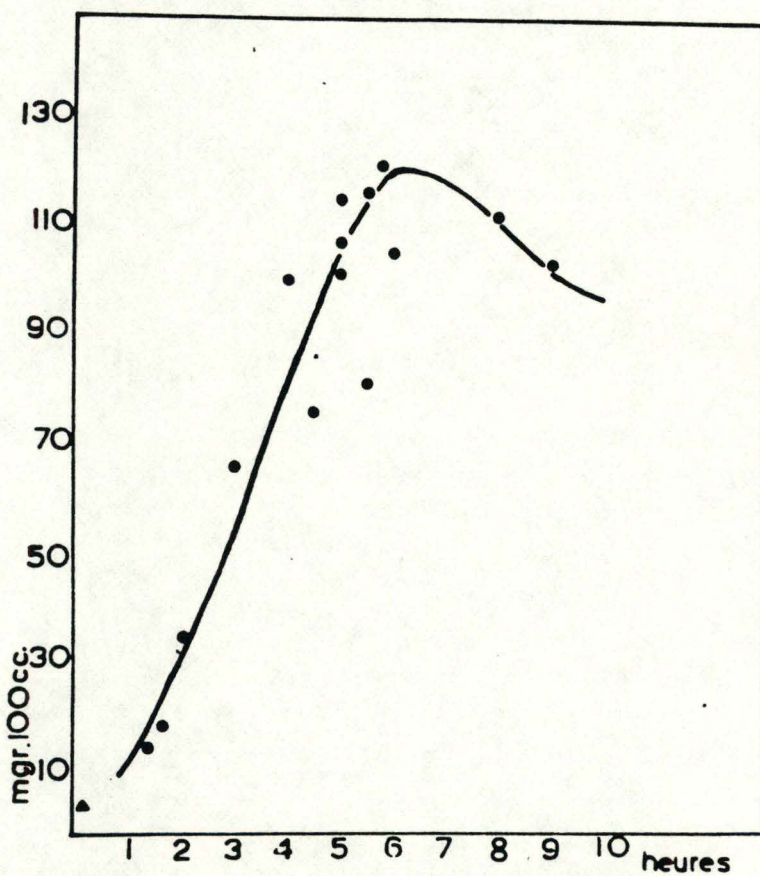


Fig. 8 — Effet hyperglycémiant de l'injection d'un extrait des pédoncules oculaires chez *Eriocheir sinensis*. Chacun des 15 crabes injectés a reçu l'équivalent d'un pédoncule oculaire. En ordonnées, glycémie en mg pour 100 cc. de sang; en abscisses, temps écoulé depuis le moment de l'injection (BAUCHAU, 1948)



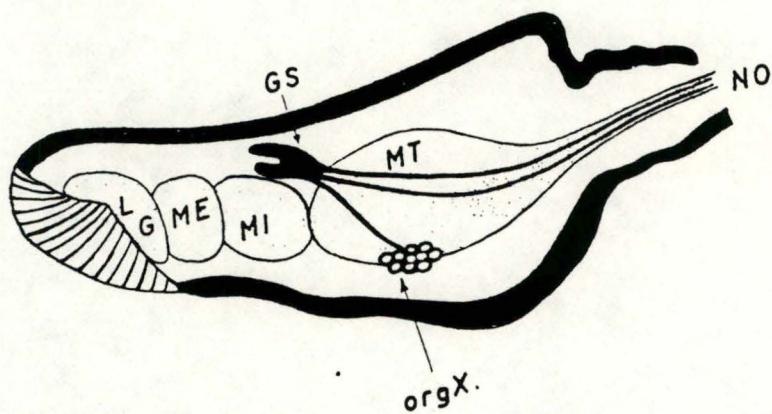
Ces variations qui peuvent se manifester d'un individu à l'autre au sein d'une même espèce sont assez mal connues. Elles dépendent de facteurs externes et internes.

#### III.4.1. Contrôle hormonal de la glycémie chez les crustacés

La première indication d'une structure anatomique jouant un rôle endocrinien dans la régulation de la glycémie des crustacés fut fournie par Abramowitz (1944) dont les travaux sur le crabe Uca pugnator ont révélé que l'injection des pédoncules oculaires (P.O.) élevait la glycémie de façon significative. Ces résultats ont été confirmés par Scheer (1959) et par Bauchau (1948) sur Eriocheir sinensis (fig. 8). L'effet des P.O. a été mis en relation avec des activités de la phosphorylase et de la synthase par Rammamurthi (1968), ce qui confirme l'importance de leur rôle pour la régulation hormonale des crustacés. Ces résultats ont incités de nombreux chercheurs à préciser d'une part la structure des P.O. et d'autre part, à établir leur rôle dans la sécrétion et la libération de substances neurosecrétrices.

Les P.O. sont composés de 4 lobes optiques : Lamina ganglionaris, medulla externa, medulla interna et medulla terminalis (fig. 9). Au voisinage de ces lobes optiques se trouvent des formations glandulaires : ainsi, à la base de la medulla terminalis, un groupe de cellules neurosecrétrices, dénomé organe de Hanström ou organe X, est responsable de la synthèse de plusieurs hormones. Dorsalement entre la medulla interna et la medulla terminalis, se localise la glande du sinus, un organe neurohémal où aboutissent les neurosecrétions de divers groupes de neurones, c'est le cas en particulier des neurones de l'organe X, de certaines cellules nerveuses du protocérébron, ainsi que certains neurones du ganglion thoracique. Cette glande sinusaire fonctionne comme un centre de stockage et de libération de différentes hormones qui régulent une large variété de processus métaboliques (Kleinholz, 1976). Les principales neurosecrétions des P.O. sont les suivantes :

- La M.I.H. (Molt Inhibiting Hormone) qui inhibe les processus impliqués dans les phénomènes de mue.



**Fig. 9** — Schéma d'une coupe sagittale d'un pedoncle 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.

- L'hormone diurétique qui contrôle l'absorption d'eau lors des processus de la mue.
- Les chromatophorotropines qui induisent la dispersion ou la concentration des pigments des chromatophores.
- Les facteurs qui assurent le contrôle de l'osmorégulation.
- Les facteurs régulateurs des processus respiratoires
- Le facteur hyperglycémiant ou HGH (Hyperglycémie Hormone) qui assure le contrôle de la glycémie.

#### III.4.2. Autres facteurs contrôlant la glycémie des crustacés

La glycémie des crustacés n'est pas uniquement contrôlée par les P.O. car il existe bien d'autres facteurs à la fois internes et externes qui exercent une influence sur la régulation des hydrates de carbone.

##### III.4.2.1. Régulation interne.

La reproduction chez les crustacés Décapodes qui a été étudiée par Dean (1965) est à l'origine d'une hyperglycémie : ses travaux démontrent que la glycémie est doublée chez les crabes en pleine période de reproduction. Les travaux de Gomorossova (1976) ont mis en évidence une relation entre les variations d'activité de la glycogène - synthase et les périodes de reproduction chez les crabes; il observe chez Carcinus maenas un minimum d'activité de la synthase durant cette période.

La mue est aussi un facteur prépondérant dans le contrôle du métabolisme glucidique. Le cycle de mue des Décapodes Brachyours comporte 5 périodes (A, B, C, D, E), elles-mêmes subdivisées en sous périodes ou stades (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>, E) (Drach, 1939). D'une manière générale, tous les processus préparatoire à l'exuviation proprement dite (E) sont à l'origine d'une hyperglycémie : en effet, la période préésuviale (D) correspond à une utilisation des réserves stockées dans l'hépatopancréas lors de l'intermue (C<sub>4</sub>), période de stabilité physiologique où l'animal reconstitue ses réserves énergétiques.

Ces réserves sont constituées de sels minéraux, de lipides, de protéines, de glucides, et plus particulièrement de glycogène, précurseur de la chitine (Scheer, 1959).

Ces processus de mue qui font varier de manière significative les réserves énergétiques et notamment les réserves glucidiques ont été observés chez plusieurs crustacés : le homard, Homarus americanus (Telford, 1968 a); la langouste, Panulirus argus (Travis, 1955 et 1957), le crabe Carcinus maenas (Heath, 1970). Ces variations métaboliques, accompagnant le cycle de mue et d'intermue, ont été étudiées par Dendinger (1973) qui a mis en évidence sur le crabe, Pachygrapsus nudus, des taux en hydrates de carbone supérieurs en période de mue. La mue est donc un facteur qui influence la glycémie des crustacés de façon très importante : la synthèse et la dégradation du glycogène varie de façon bien définie pendant le cycle de mue (Mc Whinnie, 1962). Ces phénomènes paraissent être fonction de certains facteurs de l'environnement, ainsi que sous contrôle hormonal (Mc Whinnie, 1972).

#### III.4.2.2. Régulation externe.

Dean (1965) a observé chez le crabe Uca pugilator que la glycémie était soumise à un rythme circadien et il a pu démontrer que cela était dû à un effet conjugué de la photopériode et du rythme des marées.

Le même auteur (1966, 1968) a aussi montré une adaptation de l'organisme à la température ambiante via des changements métaboliques : il a notamment observé une augmentation de la glycémie proportionnelle à la température. Ses travaux ont été confirmés par Mc Whinnie (1967) sur l'écrevisse, Orconectes virilis. Cela est peut-être à mettre en relation avec la consommation de nourriture qui augmente aussi proportionnellement avec la température (Leffler, 1972).

Barnes (1963) a observé sur des crustacés cirripèdes boréo - arctiques des variations saisonnières de la glycémie qui résulteraient à la fois de la température et de la photopériode.

Telford (1968 a, b) a mis en évidence un effet de stress sur la glycémie du homard, Homarus americanus, qui se manifeste par une hyperglycémie si le homard est manipulé ou excité.

Il est à noter que ce phénomène est plus marqué chez la femelle que chez le male. Ce phénomène de stress, déjà observé par Florkin et Duchateau (1939), pouvait masquer d'autres effets et donc fausser les résultats expérimentaux. Des réactions de stress ont aussi été mises en évidence chez des animaux qui évoluent dans un milieu qui ne leur est pas naturel (Telford, 1968 a).

Kleinholz et ses collègues (1948) ont mis en évidence une hyperglycémie due à un stress provoqué par une privation d'oxygène.

Le surpeuplement est aussi un facteur de stress : en effet, plus de 25 crabes du genre Carcinus sur moins d'un demi mètre carré correspond à une concentration trop élevée ce qui a pour effet d'exciter les individus et ainsi de provoquer une hyperglycémie (Abramowitz, 1944; Johnston, 1972).

L'alimentation qui a bien été étudiée chez Carcinus maenas par Heath (1970) influence considérablement la glycémie. Après 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 en 2 jours.

#### III.4.3. Conclusion sur les variations de la glycémie des crustacés

Chez les crustacés, les variations importantes de la glycémie pouvant se manifester d'un individu à l'autre au sein d'une même espèce ne facilitent pas les études sur la régulation des hydrates de carbone et engendrent des difficultés d'interprétation considérables. Beaucoup d'exemples montrent que Carcinus maenas est un animal très avantageux de par ses capacités d'adaptation et sa facilité d'élevage, mais que son étude est rendue difficile par ces problèmes de variabilité.

Ainsi, Heath (1970) observe chez Carcinus maenas des variations individuelles très importantes entre crabes pris à la même époque. Déjà Verne en 1924 avait été confronté à ce même problème.

### III.5. Importance relative des autres métabolites chez les crustacés

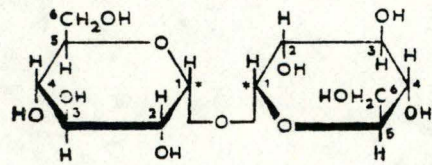
Bechey (1961 a, b, c) a mis en évidence un système de transport d'électrons dans les mitochondries des cellules de l'estomac de Carcinus maenas qui est très semblable au système de phosphorylation oxydative décrit chez les mammifères (Burring, 1966). Il apparaît donc que la production d'ATP cellulaire chez les crustacés se réalise de la même façon que chez les vertébrés supérieurs.

Malgré ces similitudes biochimiques, il existe plusieurs différences significatives entre les voies métaboliques de vertébrés et celles de crustacés. Par exemple, la formation périodique de l'exosquelette chitineux des crustacés, nécessite un mécanisme de transformation du glucose en N - acétylglucosamine et sa polymérisation en chitine. Ces réactions ne se retrouvent bien sûr pas chez les vertébrés, ce qui illustre le fait que le chevauchement apparent d'une série universelle de réactions biochimiques compte aussi un certain nombre de modifications propres aux arthropodes et cela aux niveaux glucidique, lipidique et protéique.

#### III.5.1 Les glucides

Bien que la physiologie et la biochimie des crustacés aient toujours suscité un intérêt considérable, le métabolisme des hydrates de carbone est resté inconnu jusqu'à ce que Hu (1958) qui étudiait l'hémolymphe du crabe Hemigrapsus nudus ne trouve des analogies considérables avec les autres groupes d'animaux : il décèle, en effet, la présence de glucose, maltose, maltotriose, et maltotérose qui par après ont été répertoriés chez bon nombre d'espèces : Cancer magister (Meenakshi, 1961); Carcinus maenas (Johnston, 1972), Homarus americanus (Telfoul, 1968), Orconectes virilis (Mc Whinnie, 1960).

Les études de Dean et Vernberg (1965 b) ont permis l'identification d'un disaccharide non réducteur, le tréhalose (fig.10) chez plusieurs espèces de crabes. Ce sucre est recensé dans le règne animal principalement chez les invertébrés arthropodes. Il se retrouve surtout dans l'hémolymphe d'insec-

Fig. 10 - TREHALOSE ( $\alpha$  FORM)O- $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl

tes aériens où il est utilisé comme source d'énergie pour soutenir le vol.

Dans le cas précis des décapodes, Schowch (1972) a montré sur l'écrevisse Orconectes limosus que le tréhalose est utilisé pour la biosynthèse de la chitine après sa conversion en glucose. Son site de synthèse le plus important semble être le muscle abdominal et sa concentration dans l'hémolymphe serait sous contrôle hormonal.

Chez les crustacés, le glucose est le monosaccharide majeur de l'hémolymphe, cependant d'autres tels que le galactose, le mannose, le fucose et le fructose sont présents en quantité moindre.

### III.5.2. Les lipides

Le principal lieu de stockage des lipides chez les crustacés est l'hépatopancréas. Contrairement aux vertébrés, la plupart des crustacés sont incapables d'allonger des acides gras non saturés ou d'introduire un deuxième ou une troisième double liaison à l'intérieur de ceux - ci. Par conséquent, la variation des acides gras polyinsaturés chez les crustacés n'est le résultat que de régimes alimentaires variés.

Une série d'expérience a montré que la synthèse des acides gras (Bollenbacker, 1972), des glycérides (O'Connor, 1969) et des phospholipides (Lui, 1974) suit les mêmes voies que celles des mammifères. Par contre, il existe beaucoup de caractéristiques distinctives chez les crustacés qui sont assez intrigantes : la découverte que les phospholipides sont les principaux lipides circulants chez beaucoup d'espèces de crustacés (Gilbert, 1970) est déjà en soi assez étonnante. En effet, ce rôle est joué principalement par les diglycérides chez les insectes (Tietz, 1962) et par les acides gras chez les mammifères.

Les études de Ceccaldi et Martin (1969) ont confirmé ces observations en démontrant l'existence de ces phospholipides dans l'hémolymphe de Carcinus maenas.



### III.5.3. Les protides

Les composés azotés constituent une fraction importante de la masse tissulaire de l'organisme des crustacés et la variété de ces constituants (acides nucléiques, enzymes, protéines, acides aminés...) représentent les principaux déterminants des capacités génétiques, du contrôle du métabolisme et du transport d'énergie chez les individus. Le métabolisme azoté et plus particulièrement celui des protéines, dépend de la nutrition des crustacés, de leur croissance, de leur développement et de leur ajustement physiologique aux variations endogènes et exogènes.

#### III.5.3.1. Les acides aminés libres.

Les acides aminés (AA) apparaissent à la fois sous forme libre et comme composants de protéines et de peptides. On remarque que la concentration en AA libres est beaucoup plus élevée dans les tissus de crustacés que dans ceux de vertébrés. Frédéricq, dès 1901, avait remarqué une déficience importante en anions inorganiques dans les tissus de bon nombre de crustacés eurylins marins. Il postula l'existence d'un pool intracellulaire d'"anions organiques" composés d'AA libres afin de maintenir la balance osmotique. Les principaux AA libres que l'on retrouve chez les crustacés sont la glycine, l'alanine, la proline et l'arginine (Siebers, 1972).

Evans (1972) et Miller (1973) ont démontré que la moitié des AA libres de l'hémolymphe de Carcinus maenas sont localisés dans les hémocytes. Cependant, l'extrapolation aux autres crustacés reste incertaine. Il faut aussi noter que la composition en AA libres de l'hépatopancréas diffère remarquablement de celle des autres organes : en effet, l'hépatopancréas est un site actif de synthèse d'enzyme digestifs (Van Weel, 1970 et 1974).

#### III.5.3.2. Les protéines.

Les protéines sont des constituants relativement abondants chez les crustacés (40 à 80 % du poids total suivant les espèces). Il est important de savoir que la concentration

en protéines de l'hémolymphe subit des variations très importantes, notamment en fonction de la nutrition (Uglow, 1969) et de la salinité de l'environnement (Pequeux, 1979).

---

#### IV.1. Matériel biologique

##### IV.1.1. L'espèce *Carcinus maenas* (L.). -----

Nous avons effectué cette étude expérimentale sur un crabe brachyrrhynque commun dans les mers d'Europe, le *Carcinus maenas*, appelé populairement "crabe enragé" ou "Shore crab" (crabe de rivage).

Il appartient à la famille des Portunidae qui se caractérise par la présence de trois pointes mousses sur le bord du front et de cinq dents dirigées vers l'avant sur les bords antérolatéraux de la carapace (fig. 11 ). Sa coloration est variable, surtout chez les jeunes individus, mais les adultes sont généralement verdâtres et souvent rougeâtres ventralement.

On le récolte, durant la bonne saison, dans la zone intertidale. A marée basse, il se dissimule sous les pierres éparpillées sur l'estran. Le long du littoral belge, il migre dans les eaux plus profondes (jusqu'à 62 mètres) dès le début de l'automne et ne réintègre la zone de balancement des marées qu'avec le retour des températures printanières (avril - mai).

Cette espèce de crabe est carnivore et se nourrit de poissons, de crevettes, de frai, de mollusques, mais aussi volontiers de chair morte.

##### IV.1.2. Récolte. -----

Durant la bonne saison, les crabes sont récoltés sous les pierres et dans les crevasses de la jetée de Nieuport (Belgique). Dès le mois d'octobre, la population de crabes diminue brusquement le long des plages belges ce qui nous oblige à nous approvisionner, durant toute la mauvaise saison, dans une poissonnerie.

##### IV.1.3. Elevage. -----

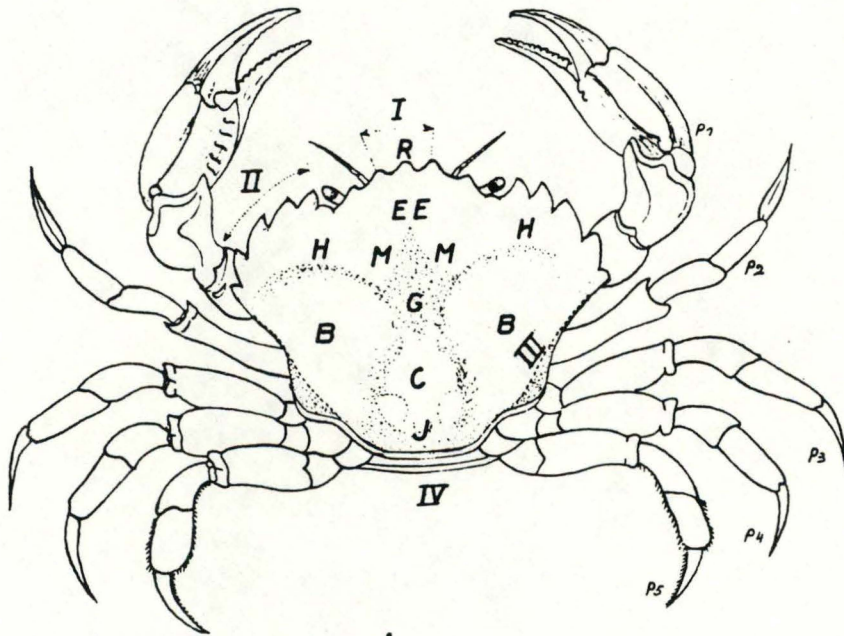


Fig. 11 : Bords de la carapace. *R* : rostre; *I* : front; *II* : bord antéro-latéral; *III* : bord postéro-latéral; *IV* : bord postérieur.  
 Aires de la carapace : *B* : aires branchiales; *C* : aire cardiaque; *E* : aire épigastrique; *G* : aire gastrique; *H* : aire hépatique; *J* : aire intestinale; *M* : aire métagastrique.

En laboratoire, les crabes sont maintenus dans une eau de mer artificielle (Vitakraft : 37,5 gr/l) continuellement filtrée et maintenue à une température comprise entre 15 et 20° C. Ils sont nourris deux fois par semaine avec des moules, Mytilus edulis, et sont exposés à la lumière naturelle. Les individus sur lesquels nous travaillons sont tous en intermue pour éviter toutes les modifications métaboliques accompagnant la mue. Il est à noter que les animaux étudiés sont de taille moyenne, c'est à dire que la largeur de leur céphalothorax se situe entre 30 et 60 mm.

#### IV.2. Prélèvement des tissus

##### IV.2.1. Préparation de l'hépatopancréas.

-----

L'hépatopancréas se situe dans la région antérieure du céphalotorax et s'étale au dessus d'une partie des chambres branchiales jusqu'aux bords antérieurs et antérolatéraux de la carapace; il envoie même des prolongements vers la région ventrale du céphalothorax. Sa coloration varie du jaune pâle au brun orange (fig. 3 ). Son prélèvement est facilité par le fait qu'il occupe un volume assez important par rapport aux autres viscères (20 - 30 %).

L'hépatopancréas prélevé est homogénéisé dans 9 volumes d'une solution à 0° - 4° C contenant du Na F 100 mM, de l'EDTA 1 mM et du PMSF 1 mM, le tout tamponné à PH 7,4 avec du TRIS - H Cl 25 mM. La présence de Na F, inhibiteur des phosphatases, et d'EDTA, qui inhibe les kinases, permet d'éviter tout changement du taux de phosphorylase a, tandis que le PMSF qui agit comme inhibiteur des protéases et plus particulièrement de la trypsine (ZWILLING et al, 1981) prévient l'hydrolyse des enzymes à doser (mise au point du milieu homogénéisation; voir chapitre V). L'homogénéisation est réalisée (par cinq passages de piston) dans un homogénéiseur de type Potter - Elvehjem. Après cette opération, l'homogénat est centrifugé à basse vitesse (1200 g pendant 10 minutes) pour obtenir un extrait débarrassé des débris membranaires qui sera utilisé pour les dosages enzymatiques.

#### IV.2.2. Préparation des branchies.

Les branchies sont d'un accès beaucoup plus aisé que l'hépatopancréas puisqu'elles sont abritées par les chambres branchiales qui les séparent totalement des autres viscères du céphalothorax (fig. 3 ).

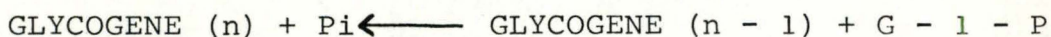
Leur homogénéisation s'effectue comme pour l'hépatopancréas si ce n'est qu'elle nécessite plus de passages au piston de par le fait qu'elles sont recouvertes d'une fine couche tégumentaire composée principalement de chitine.

### IV.3. Dosages enzymatiques

#### IV.3.1. La glycogène - phosphorylase.

##### IV.3.1.1. Principe de la réaction.

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



Le phosphate inorganique libéré suite à l'incorporation au glycogène du glycosyl provenant du G - 1 - P, est mesuré par la technique de FISKE - SUBBAROW (1925) basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdique (formé à partir du Pi et de molybdate de  $\text{N H}_4^+$  en milieu acide) en un complexe bleu par l'acide 1,2,4, aminonaphtolsulfonique.

##### IV.3.1.2. Mode opératoire.

. Mise en évidence de l'activité phosphorilytique.

La phosphorylase totale (a + b) est mesurée par l'incubation à 30° C de 25  $\mu\text{l}$  d'extrait de tissu provenant d'un homogenat 1/10, avec 75  $\mu\text{l}$  d'une solution

contenant du G - 1 - P 50 mM, du glycogène 1 %, du Na F 0,15 M, du 5' - AMP 1 mM et du  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  0,5 mM dans le volume final.

Le milieu d'incubation a été préalablement amené à pH 6,5 avec de l'H Cl (0,1 N). Il faut noter que le 5' - AMP agit comme activateur des 2 formes de la phosphorylase et le  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , comme protecteur de l'enzyme.

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

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

#### . Dosage du phosphate inorganique libéré.

On ajoute au surnageant 0,5 ml de molybdate acide d'ammonium (MAA) puis 0,2 ml d'acide aminonaphtolsulfonique (AANS). Les lectures d'extinction se font au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 660 nm, exactement 10 minutes après l'addition du dernier réactif.

L'étalon correspond à 0,5 ml d'une solution millimolaire de  $\text{K H}_2 \text{PO}_4$ .

Dans ces conditions expérimentales, il apparaît que l'extinction est proportionnelle à la quantité de phosphate pour autant que celle - ci reste inférieure à 1  $\mu\text{Mole}$ .

Une unité de phosphorylase est la quantité d'enzyme qui libère une  $\mu\text{mole}$  de Pi par unité de temps, dans les conditions décrites.

#### IV.3.1.3. Préparation des réactifs.

##### . Préparation du MAA.

On dissout 1,25 gr de molybdate d'ammonium dans 500 ml de  $H_2 SO_4$  (5 N).

##### . Préparation de l'AANS.

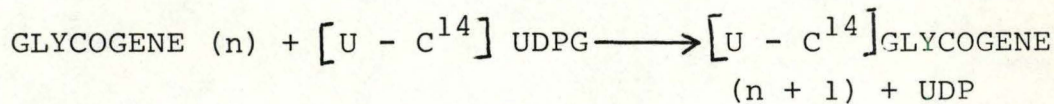
Pour un volume de 500 ml, on prépare une solution de  $Na_2 S_2 O_5$  dont la concentration finale sera de 15 %, à laquelle on ajoute 1,25 gr de  $C_{10} H_9 NO_4 S$  et 12,5 ml de  $Na_2 SO_3$  20 %. Le tout est mélangé et légèrement chauffé jusqu'à obtention d'une solution claire qui est ensuite filtrée.

#### IV.3.2. La glycogène - synthase.

-----

##### IV.3.2.1. Principe de la réaction.

La glycogène - synthase ou uridine diphosphoglucose glycogène transglucosylase se mesure par la quantité de glucosyl incorporé au glycogène à partir d'uridine diphosphoglucose dont le glucosyl est au  $C^{14}$  ( $[U - C^{14}]$  UDPG). La mesure de la radioactivité du glycogène permet de calculer le nombre d'unités glucosyl incorporées par unité de temps, ce qui correspond à l'activité de la synthase (THOMAS et al, 1968).



##### IV.3.2.2. Mode opératoire.

L'activité de la synthase totale (a + b) est mesurée par l'incubation à 30° C de 10  $\mu$ l d'extrait de tissu provenant d'un homogénat 1/10 avec 90  $\mu$ l d'un milieu contenant de l'UDPG 5 mM, de 1'  $[U - C^{14}]$  UDPG (20000 cpm par 90  $\mu$ l de milieu), du glycogène 0,75 %, de l'EDTA 3,6 mM neutralisé à pH 7, du TRIS - H Cl 55 mM pH 7,8 et du G - 6 - P 5mM dans le volume final.



La mesure de la synthase a est réalisée de la même manière que pour la synthase a + b si ce n'est que la solution substrat est dépourvue de G - 6 - P qui est un activateur de la synthase b et contient du  $\text{Na}_2 \text{SO}_4$  11 mM qui inhibe la forme b de l'enzyme (DE WULF et al, 1968). La réaction est arrêtée après un certain temps d'incubation par le prélèvement de 75  $\mu\text{l}$  du milieu réactionnel qui seront déposés sur un papier WHATMAN ET 31 (2 x 2 cm).

Les papiers sont ensuite plongés dans une solution glacée contenant 66 % d'alcool dénaturé, puis ils subissent un lavage à froid et deux lavages à température ambiante, de 15 minutes chacun dans la même solution agitée par un barreau magnétique. Après cela, ils sont déshydratés par passage dans de l'acétone et séchés. Au terme de ces opérations, les papiers sont placés dans des fioles avec 4 ml de liquide scintillant pour solide (Aqualuma) et le comptage des coups émis par les rayons  $\beta$  du  $\text{C}^{14}$  se fait au compteur à scintillation (BECKMAN L S 8000) pendant 10 minutes.

Une milliunité de synthase est la quantité d'enzyme qui incorpore au glycogène 1 nmole du glucosyl de l'UDPG par unité de temps et dans les conditions décrites.

#### IV.4. Dosage des métabolites

##### IV.4.1. Dosage des protéines.

-----

###### IV.4.1.1. Principe de la réaction.

Les protéines solubilisées en milieu alcalin sont mises en présence d'ions cuivriques ( $\text{Cu}^{++}$ ) maintenus en solution par du tartrate sodicopotassique. De telles conditions permettent la formation d'un complexe  $\text{Cu}^{++}$  - liaisons peptidiques. Lorsqu'on ajoute le réactif de FOLIN - CIOCALTEU, le complexe phosphomolybdique qui en résulte est réduit par les groupements tyrosine et tryptophane qui sont des acides aminés aromatiques des protéines et une coloration bleue apparaît (FOLIN et al, 1927).

#### IV.4.1.2. Préparation des réactifs.

. Préparation de la solution alcaline de cuivre.

Le réactif est composé de 10 volumes de  $\text{Na}_2 \text{CO}_3$  (2 %) dans du  $\text{NaOH}$  (0,1 N), pour 0,1 volume de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2 \text{O}$  (1 %) et 0,1 volume de tartrate sodico - potassique (2 %). Cette solution doit être préparée de façon extemporanée car le mélange se dégrade assez rapidement ( $\pm$  5 heures) à température ambiante.

#### IV.4.1.3. Mode opératoire.

Le dosage des protéines d'un échantillon se fait sur 0,5 ml d'une dilution adéquate de celui - ci; dans le cas de l'homogénat, elle est de 100 fois. On y ajoute 2,5 ml de la solution alcaline de cuivre et on attend 10 minutes à température ambiante. Passé ce délai, on ajoute 0,1 ml de réactif de FOLIN - CIOCALTEU et on attend encore 30 minutes toujours à température ambiante. L'extinction résultant de la coloration des échantillons est mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 660 nm. Dans de telles conditions expérimentales, il apparaît que l'extinction est proportionnelle à la quantité de protéines pour autant que celle - ci reste inférieure à 100  $\mu\text{gr}$  par échantillon. C'est pour cette raison que l'étalon utilisé correspond à 50  $\mu\text{gr}$  de serum albumin bovine (SAB).

#### IV.4.2. Dosage des sucres totaux.

-----

##### IV.4.2.1. Principe de la réaction.

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

#### IV.4.2.2. Préparation du réactif à l'anthrone.

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

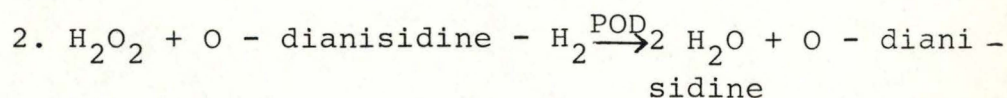
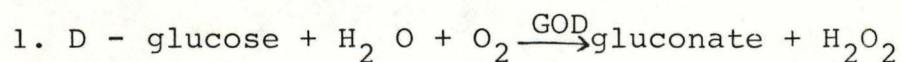
#### IV.4.2.3. Mode opératoire.

Le dosage des sucres totaux se fait sur 1 ml d'une dilution appropriée de l'échantillon à tester; dans le cas présent, elle est de 50 fois. On lui ajoute 2 ml d'H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> concentré (36 N), puis 2 ml de réactif à l'anthrone et on laisse incuber le tout 10 minutes à 100° C. On lit finalement les extinctions au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm. Dans de telles conditions expérimentales, il apparaît que l'extinction est proportionnelle à la quantité de sucres réducteurs pour autant que celle - ci ne dépasse pas 200 μgr par échantillon. C'est pour cela que l'étalon utilisé correspond à 100 μgr de saccharose.

#### IV.4.3. Dosage du glucose.

##### IV.4.3.1. Principe de la réaction.

Le glucose est mesuré spécifiquement en milieu aqueux par une méthode enzymatique basée sur l'oxydation du glucose par la glucose - oxydase (GOD) en gluconate et en eau oxygénée. La réduction de celle - ci par une peroxydase (POD) permet la transformation d'un accepteur d'oxygène chromogène incolore, l'ortho-dianisidine, en un dérivé coloré.



IV.4.3.2. Préparation de la solution GOD - POD - orthrodianisidine.

100 ml de réactif contiennent 25 mgr de GOD, 5 mgr de POD, 1 ml d'O - dianisidine (solution de 10 mgr par ml d'éthanol absolu) et 2,5 ml de tampon TRIS M pH 8 qui inhibe les traces de maltases éventuellement présentes dans la GOD. La solution est finalement filtrée et maintenue à 0 - 4° C, à l'abri de la lumière.

IV.4.3.3. Mode opératoire.

Pour mesurer le glucose d'un tissu, on procède de la façon suivante : à 0,4 ml d'un homogenat dilué 10 fois, on ajoute 1,6 ml de K OH 1N et on chauffe à 100° C pendant 15 minutes afin de provoquer une hydrolyse protéique. Le milieu est neutralisé à froid avec 1 ml d'acide acétique 1,5 N, puis centrifugé à basse vitesse pendant 5 minutes. Un aliquot du surnageant, porté à 0,5 ml, sert au dosage du glucose. Il est incubé à 37 ° C pendant une heure en présence de réactif GOD - POD - orthrodianisidine. Ensuite, on mesure l'extinction qui en résulte au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 420 nm. Dans de telles conditions expérimentales, il apparaît que l'extinction est proportionnelle à la quantité de D - glucose pour autant que celle - ci ne dépasse pas 50  $\mu$ gr. L'étalon utilisé dans le test correspond à 20  $\mu$ gr de D - glucose provenant d'une solution de 100  $\mu$ gr/ml.

IV.4.4. Dosage du glycogène.

IV.4.4.1. Principe de la réaction.

Le dosage du glycogène est basé sur l'hydrolyse de celui - ci en D - glucose par l'amyloglucosidase, enzyme dont l'activité optimale se situe à pH 5. Le glucose est alors dosé par la méthode décrite au paragraphe précédent.

IV.4.4.2. Mode opératoire.

Le glycogène du tissu se trouve dans le même surnageant que celui qui a servi au dosage du glucose. 0,5 ml en est prélevé et incubé avec 0,1 ml de la solution d'amyloglucosidase (1 mgr/ml de tampon acétate 50 mM pH 5) à 37° C pendant 1 heure. Ensuite, le dosage de l'équivalent glucose du glycogène se fait sur un aliquot du milieu, qui sera estimé de façon à ce que son extinction se situe dans la zone de **linéarité** du dosage.

## V . RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION

### V.1. Mesure de l'activité de la phosphorylase et de la synthase.

Nous avons essayé d'adapter à un crustacé Décapode Brachyoure des méthodes de dosage mises au point sur les tissus de vertébrés supérieurs.

En effet, même si plusieurs études impliquant la mesure de la synthase (Wang, 1963) et de la phosphorylase (Bauchau, 1966 et 1968) ont été réalisées chez les crustacés, nous n'avons aucune preuve que ces dosages étaient linéaires dans le temps et donc qu'ils reflétaient de façon suffisamment précise l'activité physiologique des enzymes. Il s'agit, seulement de mesures ponctuelles d'activités enzymatiques et aucune étude cinétique n'est présentée démontrant leur stabilité dans le temps. De plus, notre projet était de pouvoir mesurer le rapport des deux formes de chacun des enzymes tel qu'il existe "in vivo". Nous avons choisi comme point de départ les mêmes conditions de dosage que celles utilisées chez les vertébrés aussi bien en ce qui concerne le substrat que le milieu d'homogénéisation. Cependant, étant donné que celles - ci n'étaient pas satisfaisantes, nous y avons apporté des modifications concernant à la fois le milieu d'homogénéisation et les conditions d'incubations, à l'exception des substrats (voir § IV.3.1.2. et IV.3.2.2.).

#### V.1.1. Dosage de la phosphorylase

##### V.1.1.1. Dosage sur hépatopancreas et branchies.

Plusieurs problèmes que nous développerons plus en détail se sont posés. Ils concernent essentiellement la température d'incubation ainsi que le milieu d'homogénéisation.

##### a) Température d'incubation.

Tous les dosages d'activité phosphorolytique ont été réalisés à 30° C et non à 37° C comme souvent chez les vertébrés supérieurs. Chez ces derniers, qui sont homéo-

thermes, 37° C correspond à la température optimale où se déroulent toutes les réactions physiologiques. Par contre, chez les crustacés qui sont poikilothermes, il est plus malaisé de définir une température optimale étant donné qu'ils adaptent leur propre température à celle, variable, du milieu ambiant. Par conséquent leur température optimale pour les réactions enzymatiques ne sera pas identique à celle des vertébrés.

Beaucoup d'observations réalisées sur les crabes ont montré effectivement qu'ils supportaient des variations considérables de température mais que celles-ci n'atteignent jamais des 37° C des vertébrés : Uca pugnax ne supporte pas les températures supérieures à 32° C (Passano, 1960), Callinectes sapidus peut, lui, atteindre 34° C (Leffler, 1972), tandis que Carcinus maenas témoigne d'une tolérance thermique assez large; en effet, Naylor (1963) l'a acclimaté à des températures allant de 10° C à 25° C. De plus, on le trouve aussi bien dans les zones boréales que dans la mer du Nord ou la Méditerranée (Bauchau, 1966). Du fait de ces différences physiologiques entre vertébrés et crustacés, il fallait donc déterminer une température optimale pour la mesure de l'activité phosphorolytique chez Carcinus maenas. Après avoir testé 3 températures (20° C, 30° C, 37° C), il apparut qu'à 37° C l'enzyme n'était pratiquement plus actif, tandis qu'il l'est bien à 20° C et 30° C, avec des variations d'activité en fonction du temps nettement supérieures à 30° C.

	Température d'incubation (° C)		
	20	30	37
activité de la phosphorylase totale (U/gnT)	35,8	51,5	0

chez ?  
20 ou 30° C

?  
( activité de la phosphorylase totale d'un homogénat 1/4 d'HP préparé dans du Tris - HCl 25 mM pH 7,4, NaF 100 mM mesuré après 60 min. d'incubation.

## b) Milieu d'incubation.

Avant de décrire toutes les étapes qui nous ont permis de définir le milieu d'homogénéisation adéquat, il est important de signaler que tous les dosages enzymatiques ont été réalisés sur un extrait à basse vitesse (1500 g pendant 10 min.) et cela pour 2 raisons primordiales : d'une part, la manipulation d'un extrait est plus aisée que celle de l'homogénat brut étant donné l'élimination des débris membranaires et nucléaires. D'autre part, il existe dans l'HP des granules de phosphates de calcium (Becker, 1974; Guary, 1980) dont la présence est source d'interférence avec le dosage du phosphate inorganique (Pi) libéré lors de l'action de la phosphorylase. Lors de cette extraction, nous avons vérifié qu'une bonne partie du phosphate intracellulaire interférant dans le dosage, se trouvait dans le culot et que la somme du phosphate du culot et du surnageant rendait compte exactement de la quantité de phosphate de l'homogénat brut.

	Homogénat brut	Surnageant	culot
quantité de phosphate ( $\mu\text{moles/gr T}$ )	511	197	315

*Table?*  
Dosage de la quantité de phosphate à partir d'un homogénat 1/20, d'un extrait et de son culot réalisé après centrifugation 10 min. à 1500 g dans du Tris - H Cl 25 mM pH 7,4, Na F 100 mM, EDTA mM.

Cependant, bien qu'une bonne partie des granules ont été éliminés de la sorte, la contamination était encore trop importante. Ce problème a été résolu grâce à une centrifugation à basse vitesse (1500 g pendant 2 min.) précédant le développement au MAA et à l'AANS (voir § IV.3.1.2.).



Travaillant sur un extrait, il nous fallait connaître quelle fraction de l'activité de l'homogénat était retrouvée dans celui - ci; une partie pouvait, en effet, être éliminée dans le culot. La figure 12 montre que toute l'activité se retrouve dans l'extrait.

En ce qui concerne la détermination du milieu d'homogénéisation, comme aucune étude cinétique de cet enzyme n'avait été réalisé au niveau des crustacés, nous avons pris comme point de départ le milieu utilisé chez les vertébrés supérieurs, soit une solution de Na F 100 mM, inhibiteur des phosphatases (voir § III.3.2.3.a.) dans un tampon glycyglycine 25 mM pH 7,4 (Stalmans, 1970). Les résultats n'étant pas concluants, nous avons essayé à la place de ce tampon glycyglycine, du Tris - H Cl 25 mM, ce qui nous donnait de meilleurs résultats quoi que non encore satisfaisants. L'addition d'EDTA 1 mM qui a la propriété d'inhiber des phosphorylases - kinases (voir § III.3.2.3.c.), par ailleurs, peu actives étant donné l'hydrolyse rapide de l'ATP dans l'extrait, n'a pas modifié sensiblement les résultats. On constatait toujours une diminution de l'activité phosphorolytique avec le temps d'incubation. Nous avons alors songé à une destruction progressive de l'enzyme par les protéases de l'HP. Et de ce fait, les études de Bauchau (1965) ont mis en évidence dans l'HP de Carcinus maenas des protéases qui ont une activité hydrolytique dont le pH optimal se situe aux environs de pH 6,5 à 7,5 ce qui correspond aux conditions dans lesquelles se réalise le dosage de la phosphorylase. Nous avons donc fait le choix d'un inhibiteur de protéases, le PMSF qui inhibe plus particulièrement la trypsine (Zwilling, 1981). L'ajout de PMSF 1mM au tampon Tris - H Cl 25 mM, Na F 100 mM, EDTA 1 mM nous a permis de mesurer des activités enzymatiques stables dans le temps (fig.13). Toutes ces mises au point ont été réalisées en mesurant l'activité de la phosphorylase totale (a + b) de l'homogénat, mais les résultats qui en résultent sont tout aussi valables pour le dosage de la phosphorylase a (fig.14).

Au terme de cette mise au point, il semble possible de mesurer sélectivement les 2 formes de la phosphorylase, ce qui sera confirmé ultérieurement par la possibilité de suivre "in vitro" l'interconversion de celles - ci.

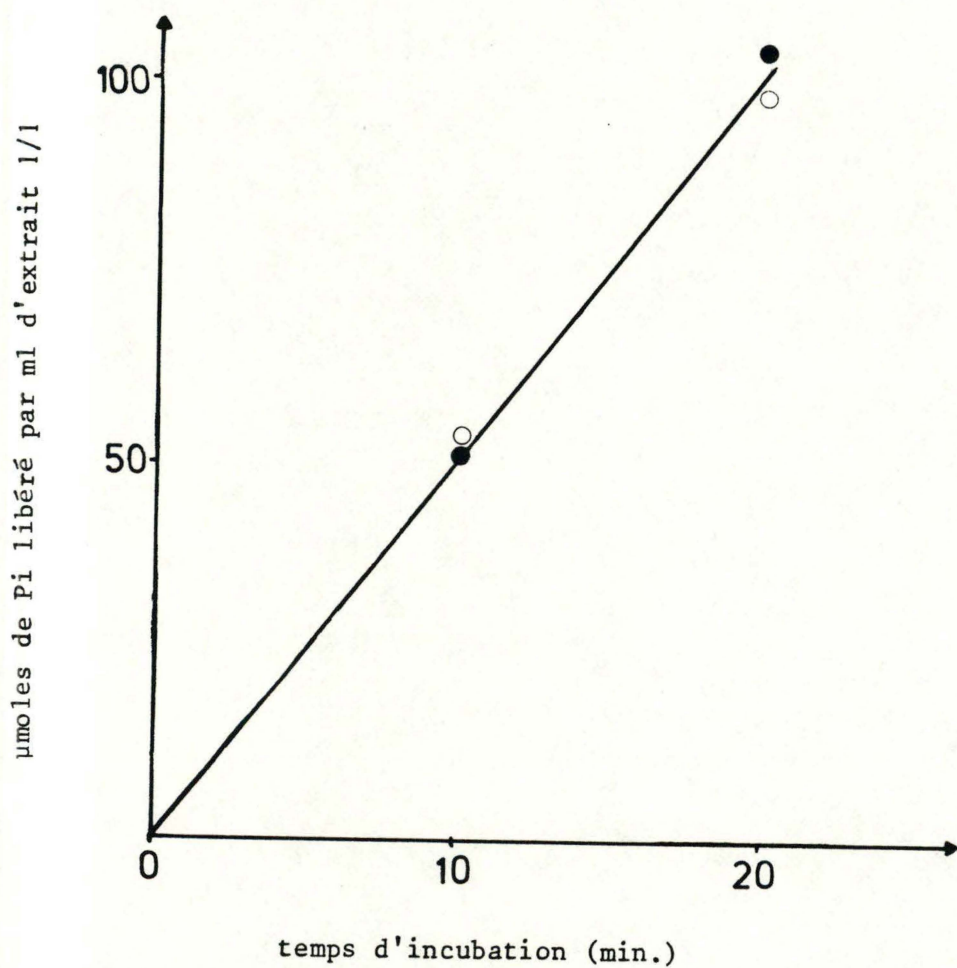


Fig. 12 - Activité de la phosphorylase totale d'un homogénat 1/20 préparé dans du Tris - H Cl 25 mM pH 7,4, Na F 100 mM, EDTA mM, PMSF mM (●) et de l'extrait obtenu par 10 min. de centrifugation à 1500 g (○). Chaque point correspond à la moyenne de 2 valeurs.

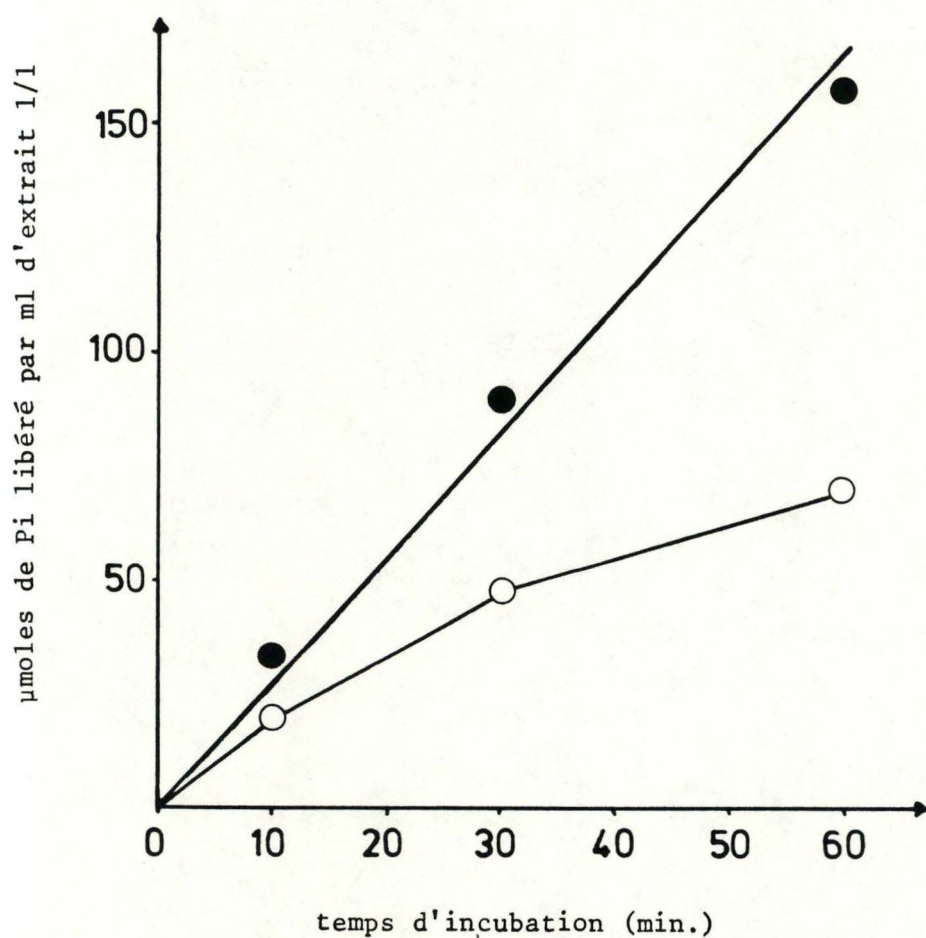


Fig. 13 - Effet de la présence (●) ou de l'absence (○) de PMSF mM sur l'activité de la phosphorylase totale mesurée à partir d'un homogénat 1/20 préparé dans du Tris - H Cl 25 mM pH 7,4, Na F 100 mM, EDTA mM. Chaque point correspond à la moyenne de 2 valeurs.

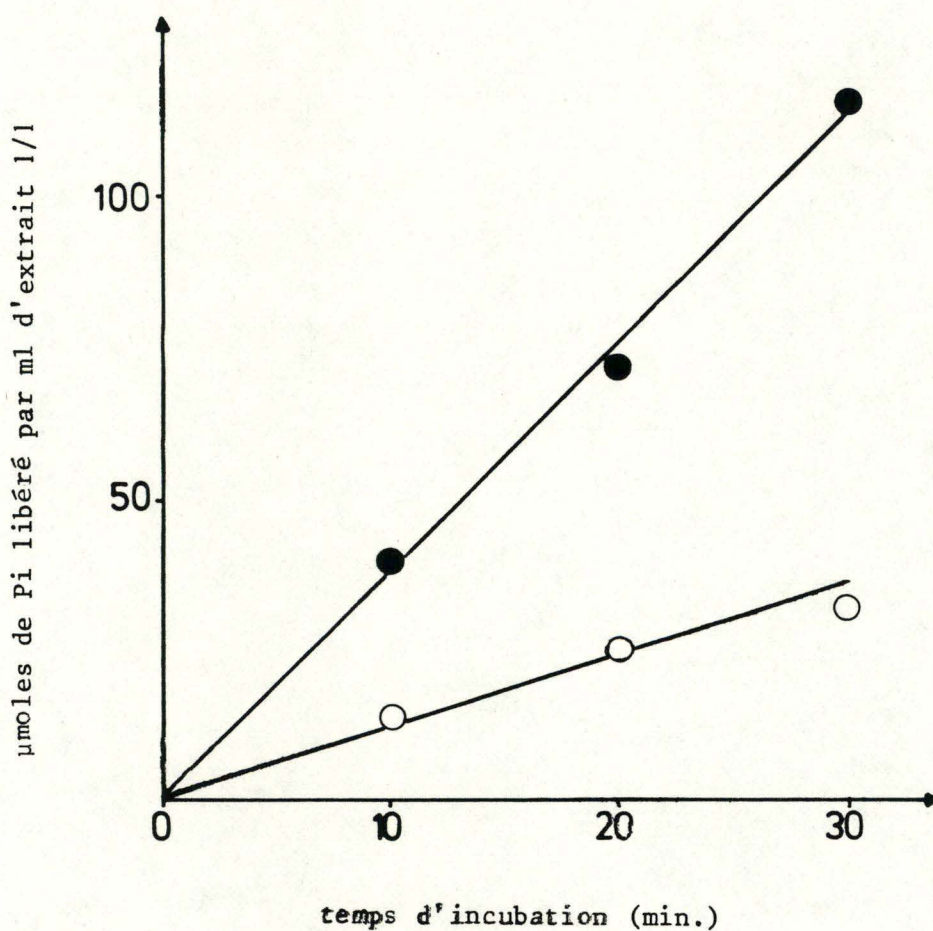


Fig. 14 - Activité des phosphorylase a (○) et a + b (●) mesurée à partir d'un extrait 1/20 préparé dans du Tris - H Cl 25 mM pH 7,4, Na F 100 mM, EDTA mM, PMSF mM. Chaque point correspond à la moyenne de 2 valeurs.

V.1.1.2. Facteurs agissant sur l'activité de la phosphorylase.

a) Température de préincubation.

Complémentairement à la recherche d'une température d'incubation optimale pour la mesure de l'activité de la phosphorylase, nous avons observé un autre effet de la température sur cette enzyme. En effet, lorsque l'extrait contenant l'enzyme est préincubé à des températures supérieures à 30° C pendant des temps très courts (5 min.) et qu'il est ensuite incubé en présence du substrat, nous remarquons que l'enzyme a perdu une partie de son activité, celle - ci étant fonction de la température de préincubation (fig. 15). On observe en effet que lorsque la préincubation s'effectue à 45° C, la perte d'activité est de l'ordre de 25 %, tandis qu'à 60° C elle est de l'ordre de 50 %.

On peut expliquer cela par le fait qu'aux températures supérieures à 37° C, l'enzyme subit des changements de conformation qui l'inactivent complètement. Cette inactivation est partiellement réversible puisque lorsqu'on revient à une température plus physiologique qui, dans le cas présent, est celle du dosage on mesure encore une activité.

b) PH.

Nous avons également préincubé la phosphorylase à différents pH pour vérifier si son optimum d'activité se situait entre pH 6,4 et 7, tout comme chez beaucoup d'autres espèces (Busby, 1976). Hergenbahn (1983) qui a travaillé sur différents tissus de l'écrevisse Orconectes limosus, a observé un optimum d'activité situé entre pH 6,7 et 6,9. Tous nous laisse donc supposer que nous nous situons dans les conditions idéales puisque les dosages se réalisent à pH 6,5, mais encore fallait - il le prouver.

Nos propres mesures de l'effet du pH sur l'activité de la phosphorylase de crabe ont été réalisées en préincubant 15 min. à 30° C de l'homogénat tamponné à pH 4 et 5 avec de l'acétate 100 mM ainsi qu'à pH 9 et 11 avec du Tris - HCl 100 mM, le milieu contenant dans chaque cas du Na F 100 mM, de l'EDTA 1 mM et du PMSF 1 mM (fig. 16).

De toutes ces observations, nous remarquons que comme chez

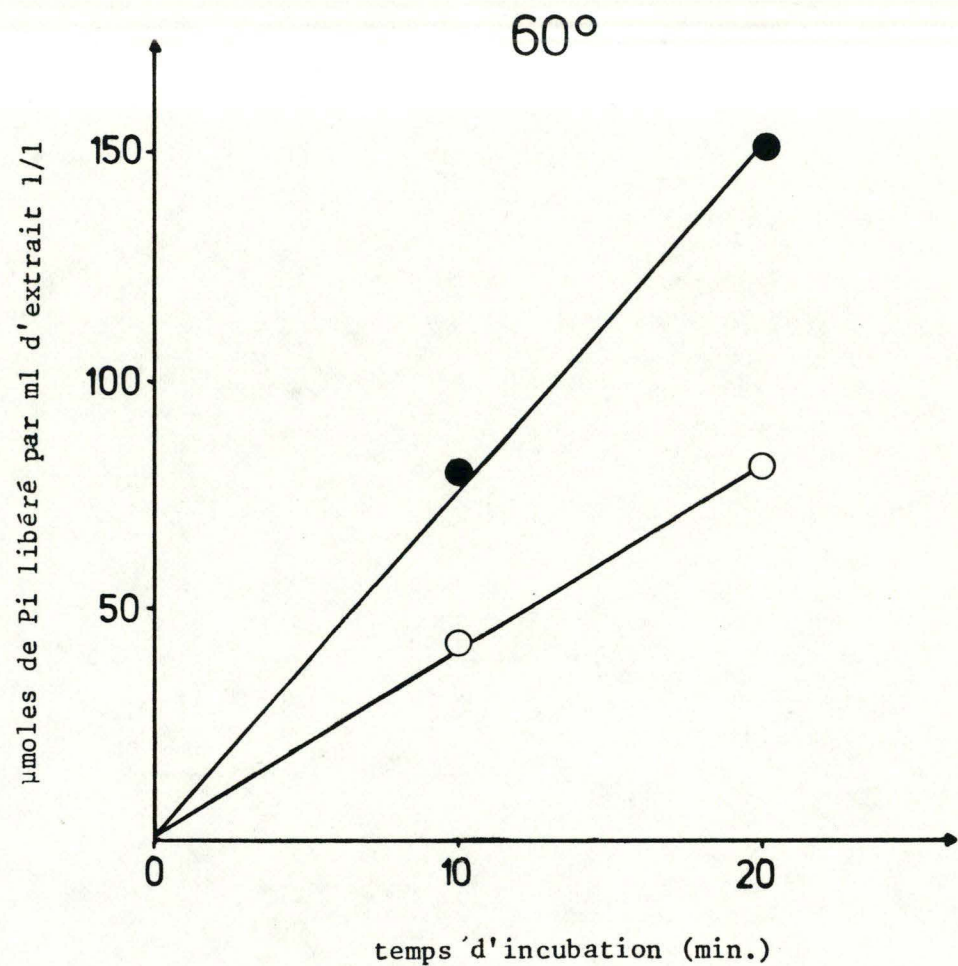
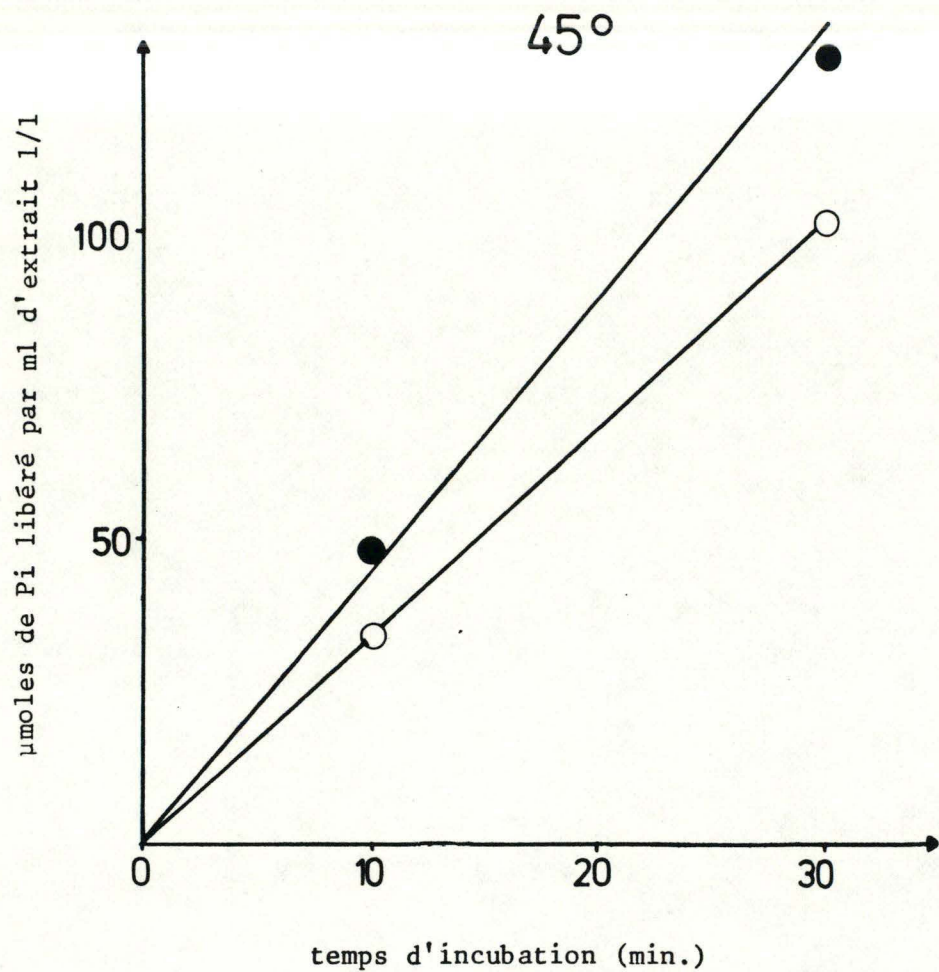


Fig. 15 - Effet de la température de la préincubation sur l'activité de la phosphorylase totale d'extraits préincubés (○) ou non (●). Les extraits ont été préparés à partir d'un homogénat 1/20 dans du Tris - H Cl 25 mM pH 7,4, Na f 100 mM, EDTA mM, PMSF mM.

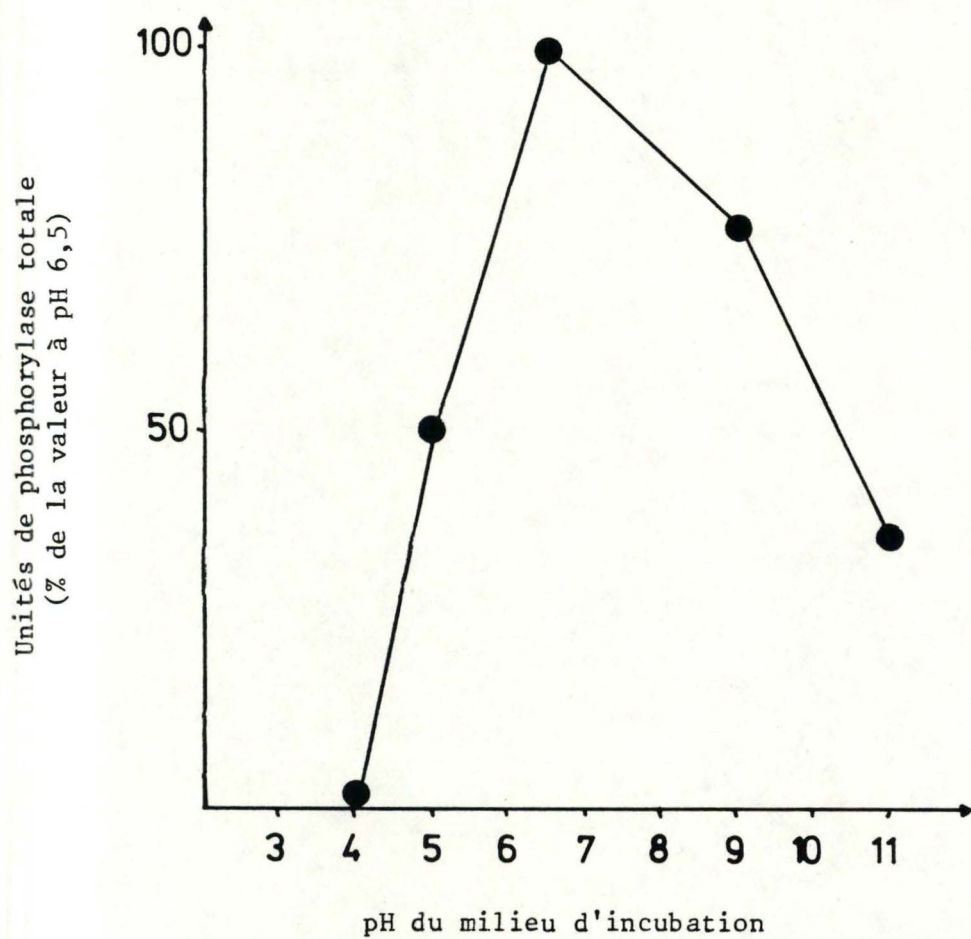


Fig. 16 - Effet du pH sur l'activité de la phosphorylase totale à partir d'un extrait 1/20 préparé dans du Tris - H Cl 25 mM pH 7,4, Na F 100 mM, EDTA mM, PMSF mM.

beaucoup d'autres espèces, le pH auquel l'activité de la phosphorylase de crabe est optimale se situe aux environs de 6,5. Le faible nombre de point expérimentaux ne nous permet pas de préciser d'avantage la zone où l'activité est optimale.

c) Dilution du milieu d'homogénéisation.

Après avoir testé l'enzyme sur différentes dilutions de l'homogénat, nous avons remarqué que son activité n'était pratiquement pas altérée jusqu'à des dilutions de 80 fois. Au delà, l'activité phosphorolytique de l'enzyme diminue, probablement par dénaturation.

dilution du milieu	activité de la phosphorylase totale (U/grT)
20 X	0,93
40 X	0,86
80 X	0,82
100 X	0,51

Activité de la phosphorylase totale d'un homogénat d'HP réalisé dans du Tris - H Cl 25 mM, Na F 100 mM après une incubation de 60 min. à 30° C.

d) Temps d'incubation.

Il est quand même bon de signaler qu'une fois la mise au point du dosage réalisée, c'est à dire lorsque l'enzyme est mise en présence de Na F qui inhibe les phosphatases, l'EDTA qui inhibe les kinases et surtout de PMSF qui inhibe les protéases, son activité est stable à 30° C pendant au moins 1 heure (fig.13).



Il faut savoir que la technique de dosage de la phosphorylase de l'HP de crabe telle qu'elle vient d'être décrite, s'est révélée adéquate dans le cas des branchies.

V.1.1.3. Régulation "in vitro" de l'activité de la phosphorylase branchiale.

Après cette étape de mise au point, il restait à prouver que nous étions capable de mesurer sélectivement les 2 formes de l'enzyme et ce, en la modulant "in vitro" par l'ajout d'effecteurs qui ont le pouvoir d'activer ou d'inactiver cet enzyme (voir § III.3.2.2.).

Un tel système nécessiait lui - aussi une certaine mise au point. En effet, le principal problème rencontré a consisté en une inactivation de la phosphorylase a dans l'extrait quelque soit les effecteurs activateurs ou inactivateurs apportés. Le tissu homogénéisé contenant des molécules de petits poids moléculaire pouvant altérer l'activité enzymatique, nous avons donc travaillé sur un filtrat obtenu par passage à travers un gel de Sephadex G - 25 afin d'éliminer les molécules de poids moléculaires inférieur à 25000.

L'activation o l'inactivation de la phosphorylase est réalisé "in vitro" par la préincubation à 20° C du filtrat en présence d'effecteurs qui empêchent ou non l'action des phosphatases et des kinases. De ce milieu de préincubation, on prélève à différents temps un aliquot dont on mesure la phosphorylase par une incubat de 30 min. à 30° C.

Nous avons travaillé sur un filtrat obtenu à partir d'un homogénat dilué 5 fois dans du Tris - H Cl mM pH 7,4, du PMSF 2 mM et du  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  10 mM.

Une activité enzymatique stable en fonction du temps de préincubation est obtenue en ajoutant au filtrat de Na F 50 mM, comme inhibiteur de phosphatases et de l'EDTA 2 mM, comme inhibiteur de kinases. L'activation totale de la phosphorylase s'obtient en ajoutant au même filtrat de l'ATP 5 mM qui agit comme source d'énergie, de l'acétate de magnésium 5 mM et de l'AMPc 0,5 mM.

L'inactivation de la phosphorylase est réalisée en ajoutant du glucose 0,5 %. Dans ce dernier cas, après inactivation, la phosphorylase a été réactivée également par l'addition d'ATP

Conditions expérimentales	Volume des différents effecteurs (ml)						glucose (5%)	H <sub>2</sub> O	Vol. final
	filtrat (1/5)	ATP (30mM)	MgAcéta (30 mM)	Na F (400mM)	EDTA (100mM)	AMPc (5 mM)			
Stabilisation enzymatique	0,3	-	-	0,075	0,012	-	-	0,213	0,6
Activation enzymatique	0,3	0,1	0,1	-	-	0,06	-	0,04	0,6
Inactivation enzymatique	0,3	-	-	-	-	-	0,06	0,24	0,6

5 mM, d'acétate de magnésium 5 mM et d'AMPc 0,5 mM. Dans toutes ces variantes, le filtrat a été dilué deux fois et les concentrations en effecteurs sont exprimées pour ce volume final (voir tableau ci - dessous).

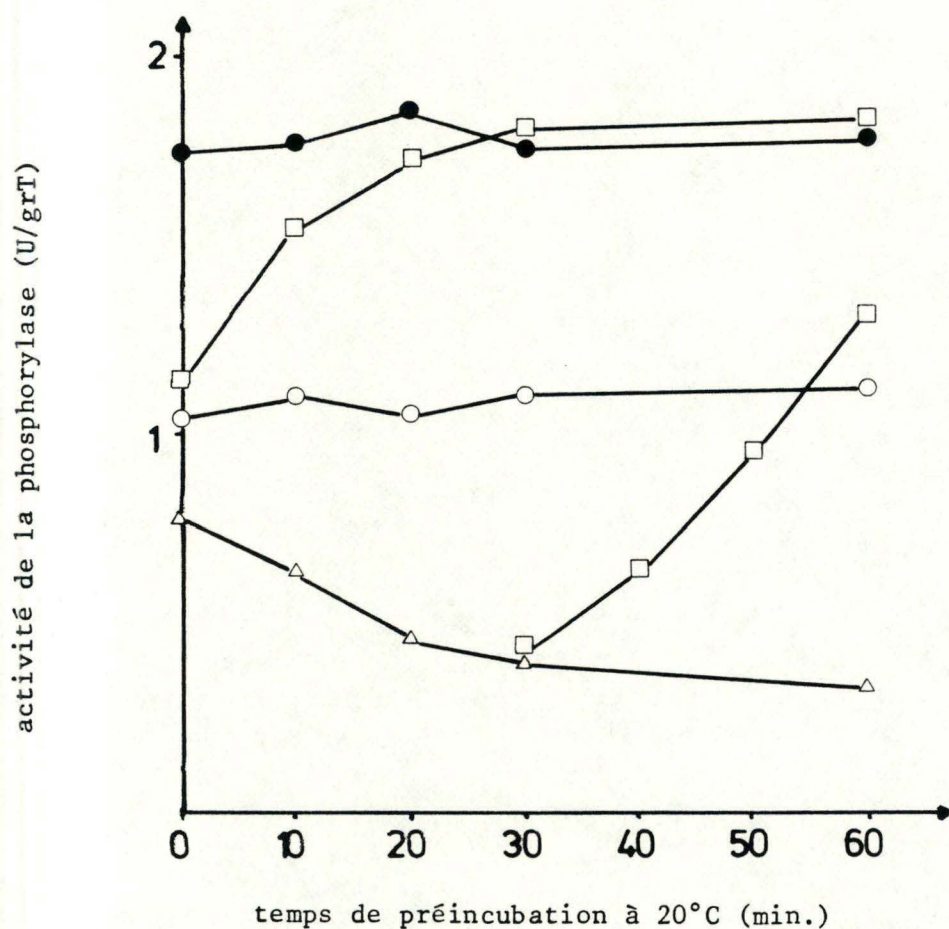


Fig. 17 - Interconversion "in vitro" des 2 formes de la phosphorylase. Un filtrat 1/10 G - 25 contenant du Tris - HCl 25 mM pH 7,4,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 mM, PMSF mM est préincubé à 20° C, soit en présence de NaF 50 mM, EDTA 2 mM (●,○), soit en présence d'ATP 5 mM, Mg Acetate 5 mM, AMPc 0,5 mM (□), soit en présence de glucose 0,5 % (△). Les symboles ouverts représentent l'activité de la phosphorylase a et les symboles fermés, celle de la phosphorylase totale (a + b).

Les résultats de l'expérience sont présentés à la figure 17. Ces conditions expérimentales à celles utilisés par Stalmans (1970, 1975) chez un vertébré supérieur. Nous confirmons d'abord ce qui a déjà été dit au paragraphe V.1.1.1.b., soit la stabilité de l'activité phosphorolytique en présence de Na F et d'EDTA. On observe ensuite que la phosphorylase peut être totalement activée en présence d'ATP, de magnésium et d'AMPc. Elle peut enfin être inactivée du moins partiellement en présence de glucose.

Ce type d'expérience "in vitro" montre donc la technique de dosage que nous avons mis au point, nous permet de suivre les interconversions de la phosphorylase et donc de mesurer sélectivement ses variations de formes.

#### V.1.2. Dosage de la synthase

##### V.1.2.1. Dosage sur hépatopancréas.

Pour le dosage de la synthase de l'HP, nous nous sommes également basés sur les méthodes mises au point pour les vertébrés supérieurs (voir § IV.3.2.2.) en utilisant le même milieu d'homogénéisation que celui qui s'est révélé efficace pour le dosage de la phosphorylase. Cependant, les activités de la synthase se sont révélées nulles et il convenait donc d'en chercher la raison.

Il nous a semblé soit que les protéases, qui se trouvent dans le milieu d'homogénéisation, auraient encore une action sur la synthase malgré la présence de PMSF, soit que l'enzyme serait elle-même plus labile que la phosphorylase, ce qui se vérifie d'ailleurs chez les vertébrés. Afin de voir ~~les~~ si les protéases interviennent dans cette inactivation, nous avons réalisé des mélanges entre un extrait 1/5 de foie de souris et un extrait 1/5 d'HP de crabe. Nous avons soit préincubé au préalable l'extrait d'HP à 100° C, soit gardé tel quel afin d'observer un effet éventuel de ses protéases sur la synthase de foie. Ses tests ont consisté en un mélange de 8 volumes d'extrait de foie avec, d'une part, 2 volumes d'extrait d'HP bouilli et d'autre part, 2 volumes d'extrait d'HP non bouilli. En guise de contrôle, nous avons dosé séparément l'activité de la syntha-

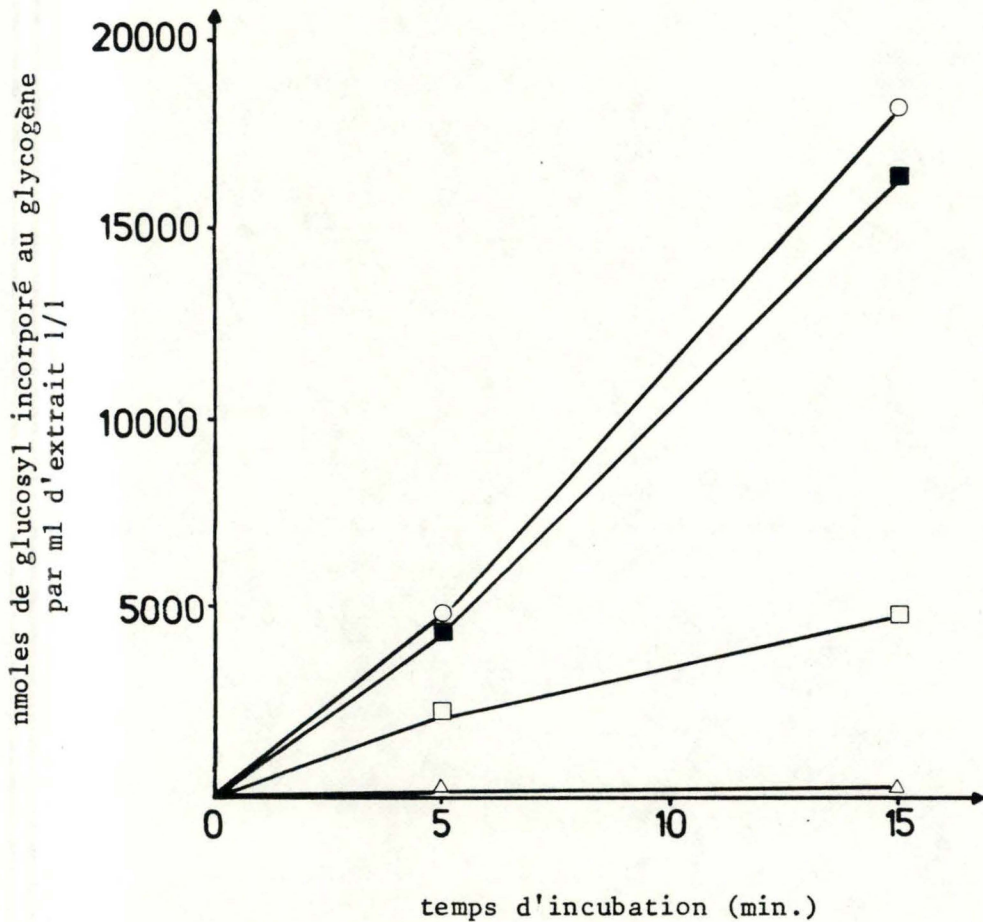


Fig. 18 - Effet des protéases hépatopancréatiques sur l'activité de la glycogène - synthase : (O) synthase totale d'un extrait 1/5 de foie de souris; (Δ) synthase totale d'un extrait 1/5 d'HP de crabe; (□) synthase totale d'un extrait 1/5 de foie auquel est ajouté de l'extrait 1/5 d'HP tel quel dans un rapport de volume de 8 pour 2; (■) idem avec cette fois l'extrait 1/5 d'HP bouilli au préalable. Ces extraits proviennent d'un homogénat préparé dans du Tris - H Cl 25 mM pH 7,4, Na F 100 mM, EDTA mM, PMSF mM.

se totale sur chacun des extraits (fig.18).

On remarque une activité de la synthase élevée dans le foie et nulle dans l'HP. Le mélange de foie et d'HP non préincubé engendre une inhibition partielle de l'activité de la synthase hépatique de l'ordre de 75 %, par contre, l'HP bouilli a perdu son effet inhibiteur.

Ceci nous laisse supposer que l'inhibition est due à des enzymes hydrolytiques telles que les protéases qui sont très abondants dans l'HP et qu'il ne s'agit pas d'inhibiteurs thermostables tels que les ions par exemple.

Nous avons essayé en vain de mettre au point le dosage de la synthase hépatopancréatique en ajoutant au milieu d'homogénéisation des protecteurs tels que le glycogène (5%) ou encore le  $\beta$ - mercaptoéthanol (1 mM). Nous avons aussi essayé de tamponner le milieu d'homogénéisation, non plus à pH 7,4 comme pour la phosphorylase, mais à pH 8 et 8,5 puisque conformément aux études de Wang (1963), son pH optimum se situe aux environ de 8,3.

Tous ces tests se sont soldés par des échecs et nous n'avons jamais pu mettre en évidence une activité de la synthase dans l'HP.

#### V.1.2.2. Dosage sur branchies.

La mesure de l'activité des synthases a et totale (a + b) a été effectuée sur les branchies dans les mêmes conditions que pour l'HP. La figure 19 nous montre que le dosage des 2 formes de la synthase branchiale est linéaire au moins jusqu'à 30 min. d'incubation.

#### V.1.2.3. Régulation "in vitro" de la synthase branchiale.

Comme nous l'avons fait pour le dosage de la phosphorylase, il fallait prouver que le système était bien maîtrisé et ce, par des modulations "in vitro" de l'activité de la synthase. Cependant, dans ce type d'expérience nous n'avons jamais réussi à obtenir une activité stable de cet enzyme, contrairement à la phosphorylase, ce qui excluait l'observa-

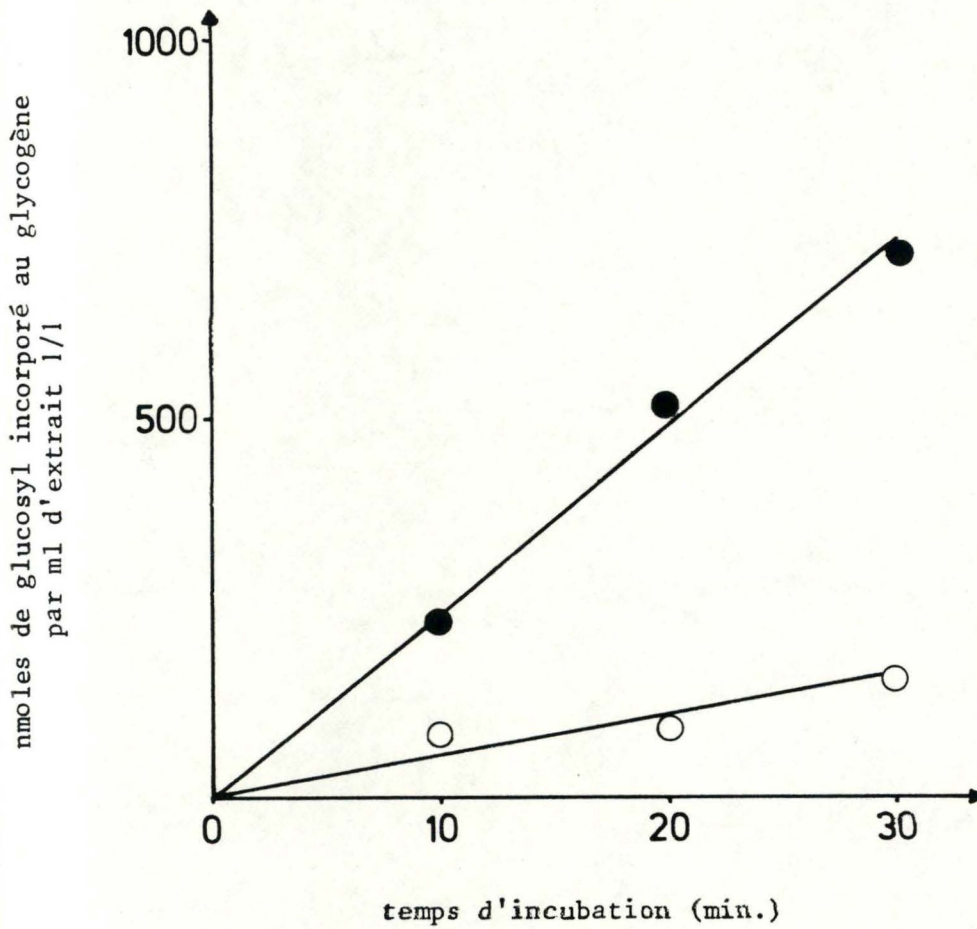


Fig. 19 - Activité des glycogène - synthases a (O) et a + b (●) mesurée à partir d'un extrait 1/20 de branchies provenant d'un homogénat préparé dans du Tris - H Cl 25 mM pH 7,4, Na F 100 mM, EDTA mM, PMSF mM.

tion d'interconversions (fig.20).

Cette inactivation semble, à priori, en contradiction avec le fait que l'activité de l'enzyme mesurée sur des extraits non préincubés est stable dans le temps (30 min. au moins), bien que le milieu de dosage de la synthase soit différent que celui de la préincubation. Les conditions de préincubation "in vitro" de l'enzyme devraient être réexaminées.

## V.2. Relation entre activité enzymatique et situation physiologique.

Notre objectif était d'étudier le comportement de ces 2 enzymes limitants pour la glycogénosynthèse et la glycogénolyse en fonction de situations physiologiques susceptibles de les activer ou les inactiver. Nous en avons étudié principalement 2 qui sont respectivement l'adaptation à des salinités variables et l'exposition à l'air pendant des périodes plus ou moins prolongées.

### V.2.1. Exposition à des salinités variables

Etant donné que Carcinus maenas est un hyperosmorégulateur (voir § III.2.2.2.) et qu'aux basses salinités, il doit faire face à un problème de gain d'eau et de perte d'ions par des réactions au niveau des branchies où interviennent des mécanismes consommateurs d'énergie (Krogh, 1965), nous avons émis l'hypothèse qu'une adaptation à l'eau de mer diluée par rapport à leur hémolymphe pouvait augmenter l'activité de la phosphorylase. Celle - ci permettrait la libération à partir du glycogène d'unités glucosyl qui seraient une source d'énergie pour le transport actif compensatoire d'ions. Nous aurions pu ainsi confirmer ou infirmer les hypothèses de Chapelle (1977) donnant aux lipides le rôle primordiale de source énergétique nécessaire à l'osmorégulation chez Eriocheir Sinensis. Par ailleurs, si Carcinus maenas était soumis à de l'eau dont l'osmoticité était égale ou légèrement supérieure à celle de son organisme, il aurait été en osmoconformité ce qui aurait pu se remarquer par une baisse de l'activité phos-



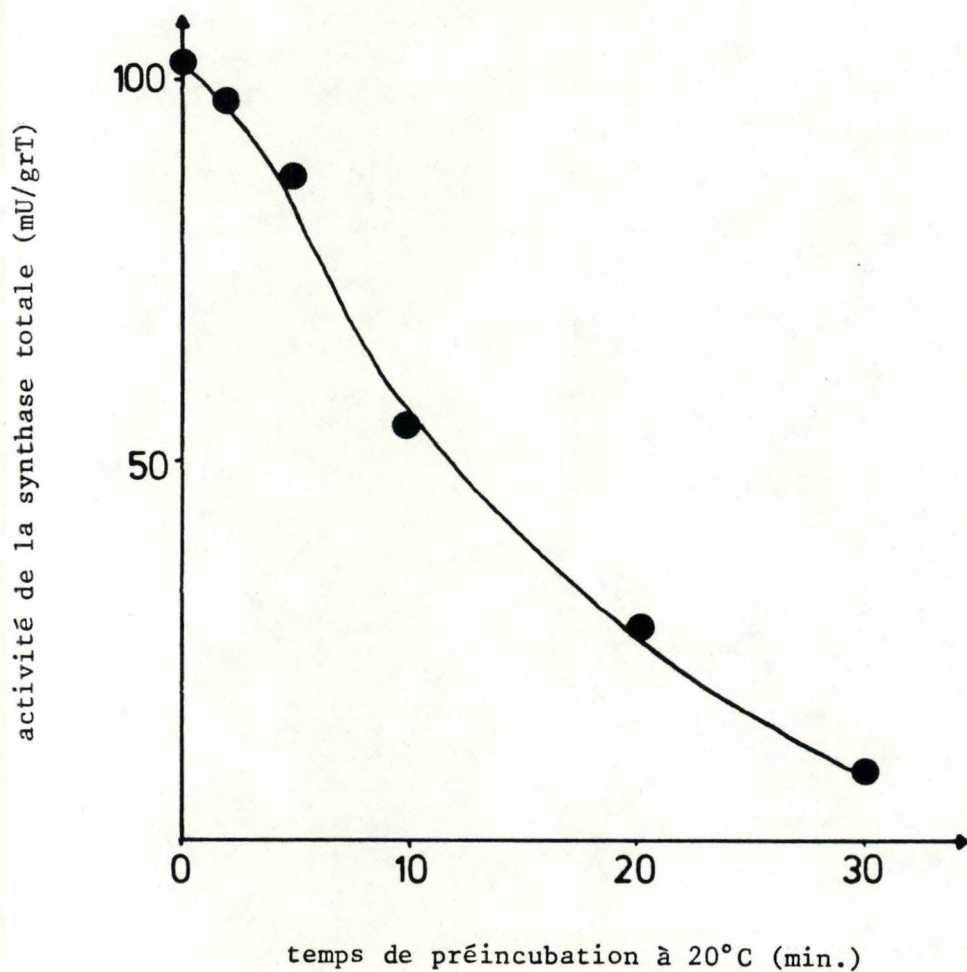


Fig. 20 - Effet de la préincubation à 20° C sur l'activité de la synthèse totale d'un filtrat 1/10 G - 25 contenant du Tris - H Cl 25 mM pH 7,4,  $(\text{N H}_4)_2 \text{SO}_4$  5 mM, PMSF mM, Na F 50 mM, EDTA 2 mM.

phorolytique.

Pour réaliser cela, nous avons observé ce qui se passait chez les crabes en osmoconformité, c'est à dire qui se trouvent dans une eau de mer à concentration en sel égale à 37,5 gr/litre. Ensuite, nous avons soumis les individus pendant 20 h à des eaux dont la concentration en sel était de plus ou moins 0 (eau douce), 10, 20, 30, 50 et 60 ‰. Il est à noter que 2 individus ont été utilisés pour chaque condition (voir tableau ci - dessous).

Salinité du milieu	phosphorylase <u>a</u> phosphorylase <u>b</u> (en % de la totale)	protéines (mgr/gr T)	sucres totaux (mgr/gr T)	glycogène (mgr/gr T)	glucose (mgr/gr T)
Contrôles (37,5 ‰)	0,79	38	26,8	17,1	-
10 ‰	0,95	39,5	18,3	16,7	-
20 ‰	0,96	39,3	25	23,3	-
30 ‰	0,97	37,1	22,2	19,8	-
50 ‰	0,96	36,7	14,9	8,6	-

Cette série d'expérience nous apprend en première observation que Carcinus maenas est effectivement un crabe de type euryhalin puisqu'il supporte des variations de salinité allant de 10 ‰ à 50 ‰. Tous les individus exposés à des salinités de 60 et de 0 ‰ sont morts. La toute dernière observation pourrait surprendre car Carcinus maenas est un crabe d'estuaire donc susceptible de supporter des eaux douces. Ce phénomène a également été observé par Bauchau (1966) qui remarque que cette espèce bien que euryhaline ne supporte que très difficilement des salinités inférieures à 4 ‰.

Du point de vue enzymatique, ce que nous pouvons dire à propos de ce type d'adaptation est que nous n'en voyons pas le reflet sur l'activité de ces enzymes étudiés.

En effet, dans tous les cas nous observons des taux de phosphorylase a très élevés, pratiquement égaux à la phosphorylase totale (a + b) tandis que l'activité de la synthase a est nulle.

Nous pouvons aussi constater que le taux de protéines dans les branchies, très comparable d'un individu à l'autre, ne subit pas de variation en fonction de la salinité, dans les limites de sensibilité du dosage. Par contre, les sucres totaux et le glycogène subissent de telles variations individuelles qu'il est impossible d'en tirer des conclusions en rapport avec les variations de salinité. Il est aussi important de remarquer que le glucose de cet organe est pratiquement inexistant (en tous cas, on ne sait pas le mettre en évidence par la technique utilisée).

#### V.2.2. L'exposition à l'air pendant différents temps

La respiration aquatique du crabe s'effectue uniquement par des mécanisme de diffusion passive, et lors des expositions à l'air, leur métabolisme se réduit afin que la captation d'oxygène ne soit pas trop élevée (Newell, 1972). Il convenait donc d'étudier sur les branchies les conséquences métaboliques de l'exposition à l'air. Pour réaliser cela, nous avons exposé à l'air des lots de 2 crabes pendant 1, 3, 7 et 20 heures. Des temps plus longs ont été exclus, étant donné qu'une telle période d'émersion revêt un caractère exceptionnel. En effet, les crabes de la zone intertidale

subissent au maximum des émerisions de 6 à 7 heures. Nous avons donc étudié des temps d'exposition à l'air de l'ordre des marées, ainsi qu'une exposition plus longue pour voir éventuellement des variations métaboliques plus importantes mises en route par l'animal poussé dans ses derniers retranchements (voir tableau ci - dessous).

Temps d'exposition à l'air	phosphorylase <u>a</u> phosphorylase <u>a+b</u> (en % de la totale)	protéines (mgr/gr T)	sucres totaux (mgr/gr T)	glycogène (mgr/gr T)	glucose (mgr/gr T)
Contrôles (0 h)	0,79	38	26,8	17,1	-
1 h	0,74	34,7	17,4	9,4	-
3 h	0,64	32,5	36,4	30,1	-
7 h	0,74	29,5	14,3	9,4	-
20h	0,83	31,3	14,7	6,9	-

De même que pour les expositions à des salinités variables, aucune variation enzymatique nette n'est observé, la phosphorylase a est toujours très élevée et la synthase a nulle. De même, les protéines restent plus ou moins constantes. Pour les sucres totaux et le glycogène, les variations individuelles sont trop importantes pour permettre une comparaison.

### V.2.3. Recherche d'un facteur activateur de la phosphorylase

Les résultats concernant l'exposition à l'air et à des salinités variables n'étant pas satisfaisants du fait d'une phosphorylase a trop élevée, nous en avons conclu que l'hyperactivité de la phosphorylase a avait une origine artéfactuelle.

Nos recherches se sont donc orientées vers des facteurs d'origine exogène tel que le stress lié aux conditions d'élevage et de manipulation ainsi que vers des facteurs d'origine endogène tel que la physiologie interne de l'animal.

#### V.2.3.1. Facteurs externes.

##### a) le stress de manipulation.

Le premier stress qui nous est venu à l'esprit, est le stress de manipulation qui se répercute sur la glycémie comme l'a observé Telford (1968, b) sur le homard, Homarus americanus.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé des crabes auxquels nous avons fait subir 2 traitements différents : l'un consiste en une manipulation intense de l'animal avant son sacrifice, tandis que l'autre consiste à plonger le crabe dans l'azote liquide, ceci visant l'arrêt immédiat de ses réactions métaboliques et donc l'absence de toute augmentation artéfactuelle de la phosphorylase a.

Les résultats obtenus à la figure 21 nous suggèrent que le stress de manipulation ne serait pas le facteur recherché. Il



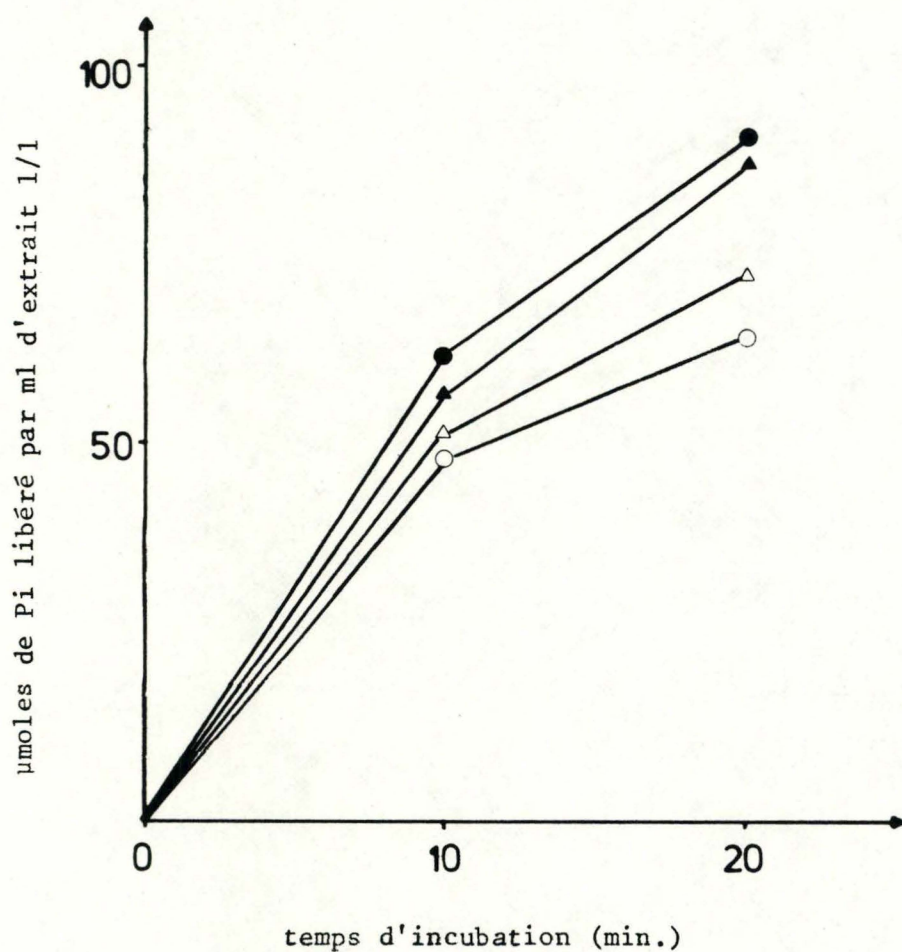


Fig. 21 - Activité des phosphorylase a (symboles ouverts) et a + b (symboles fermés) sur des individus stressés (▲,△) ainsi que sur des individus non stressés (●,○) mesurée à partir d'un extrait 1/20 préparé dans du Tris - H Cl 25 mM pH 7,4, Na F 100 mM, EDTA mM, PMSF mM. Chaque point correspond à la moyenne de 2 valeurs.

apparaît en effet que, quelque soit le traitement reçu, le taux de phosphorylase a des individus demeure très élevé.

b) le stress de surpeuplement.

Comme le stress de manipulation s'est révéllé apparemment sans effet sur l'activité de la phosphorylase a, nous avons considéré le stress causé par le surpeuplement, déjà identifié par (Johnston, 1972) comme étant un facteur hyperglycémiant assez important. Etant donné que toutes nos expériences ont été réalisées sur des individus séjournant en grand nombre dans des bacs relativement étroits, nous avons isolés des individus pendant 2 à 3 jours de manière à réduire ou à éliminer les conséquences de ce type de stress. Les activités de phosphorylase a mesurées sur ces crabes isolés ne différaient en rien de celles des crabes non isolés. Cette observation nous a permis d'éliminer également le stress de surpeuplement comme facteur activateur de la phosphorylase a.

V.2.3.2. Facteur interne : la reproduction.

Etant donné que ces tests se réalisent en plein été et que cette saison coïncide précisément avec le facteur de reproduction crabes, nous nous sommes demandé si ce n'était pas là le facteur activateur de la phosphorylase (voir § III.4.2.1.) En observant de plus près l'anatomie des organes reproducteurs des crabes que nous utilisions, il est apparu que les testicules chez les mâles ainsi que les ovaires chez la femelle étaient particulièrement développés en cette période de l'année.

Nous avons alors comparé l'activité phosphorolytique de ces individus avec celle d'animaux qui avaient les organes génitaux non développés, chez lesquels nous avons dosé l'enzyme au début du printemps.

L'observation des résultats obtenus (fig. 22) met bien en évidence une relation entre l'activité phosphorolytique et la période de reproduction. En effet, en période d'activité sexuelle, la phosphorylase a correspond à plus ou moins 80 % de la phosphorylase totale (a + b), par contre en période de repos sexuel, elle représente à peu près 30 % de la totale.

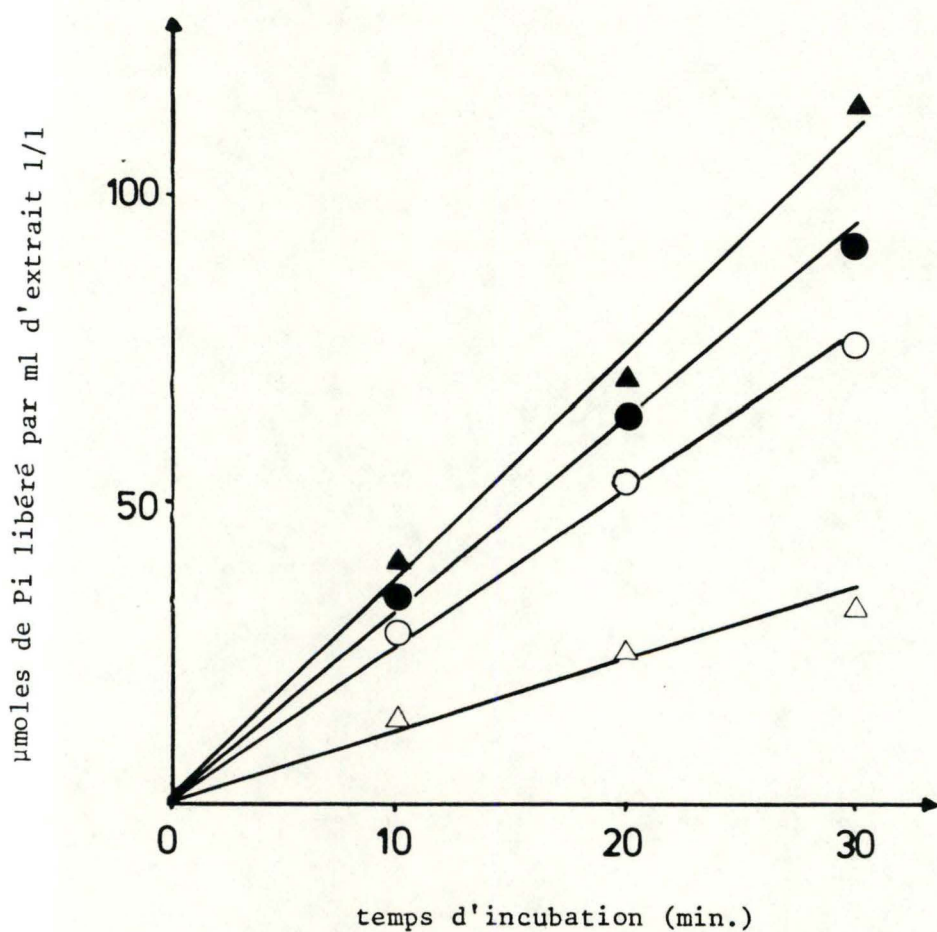


Fig. 22 - Activité des phosphorylases a (symboles ouverts) et a + b (symboles fermés) mesurée dans les branchies d'individus en période d'activité (●,○) et de repos (▲,△) sexuel. Les mesures ont été réalisées sur des extraits 1/20 préparés à partir d'homogénat contenant du Tris - H Cl 25 mM pH 7,4, Na F 100 mM, EDTA mM, PMSF mM. Chaque point correspond à la moyenne de 2 valeurs.



#### V.2.4. Effet de l'ablation des P.O. sur l'activation de la phosphorylase

Ayant observé l'effet d'un facteur endogène, l'activité sexuelle, sur le taux de phosphorylase a, il était intéressant d'essayer d'éliminer ses effets. Dans ce but, nous avons épédonculés des individus 1 jour avant leur sacrifice, en effet d'après les études d'Abramowitz (1944), les P.O. jouent un rôle principal dans la régulation endocrinienne de la glycémie en libérant le facteur hyperglycémique (voir § III.4.1.). Les résultats obtenus à la figure 23, nous montre que l'épédonculation n'a pas d'effet sur le taux de phosphorylase a. Ceci suggère que l'activation observée de la phosphorylase n'est pas contrôlée par les P.O. Par conséquent, si nous avons pu observer une relation entre une situation physiologique et l'activité de la phosphorylase, il n'en demeure pas moins vrai que son mécanisme d'action n'en est pas élucidé.

#### V.2.5. Activation de la synthase

Dans tous les tests réalisés précédemment, nous avons observé des taux de phosphorylase a très élevés et des taux de synthase a pratiquement nuls. Un moyen permettant d'activer la synthase consistait à mettre les individus dans des conditions où les réserves glucidiques seraient épuisées. Nous nous sommes basés sur les observations de Heath (1970) qui constate qu'après un jeûne de 25 jours, toutes les réserves glycogéniques de Carcinus maenas ont disparu et qui, si l'animal est alors renourri, se reconstituent endéans 2 jours. Des individus ont donc été mis à jeûn pendant près de 3 semaines, puis nourris "ad libitum" et, après 24 heures, nous avons testé l'activité de leur synthase. Cependant, nous ne sommes pas en mesure d'affirmer avec certitude le résultat obtenu. En effet, dans cette expérience, l'activité de la synthase a représentait 77 % de l'activité totale. Il semblait donc qu'après un jeûne prolongé et une renutrition à volonté, la synthase ait été activée.

---

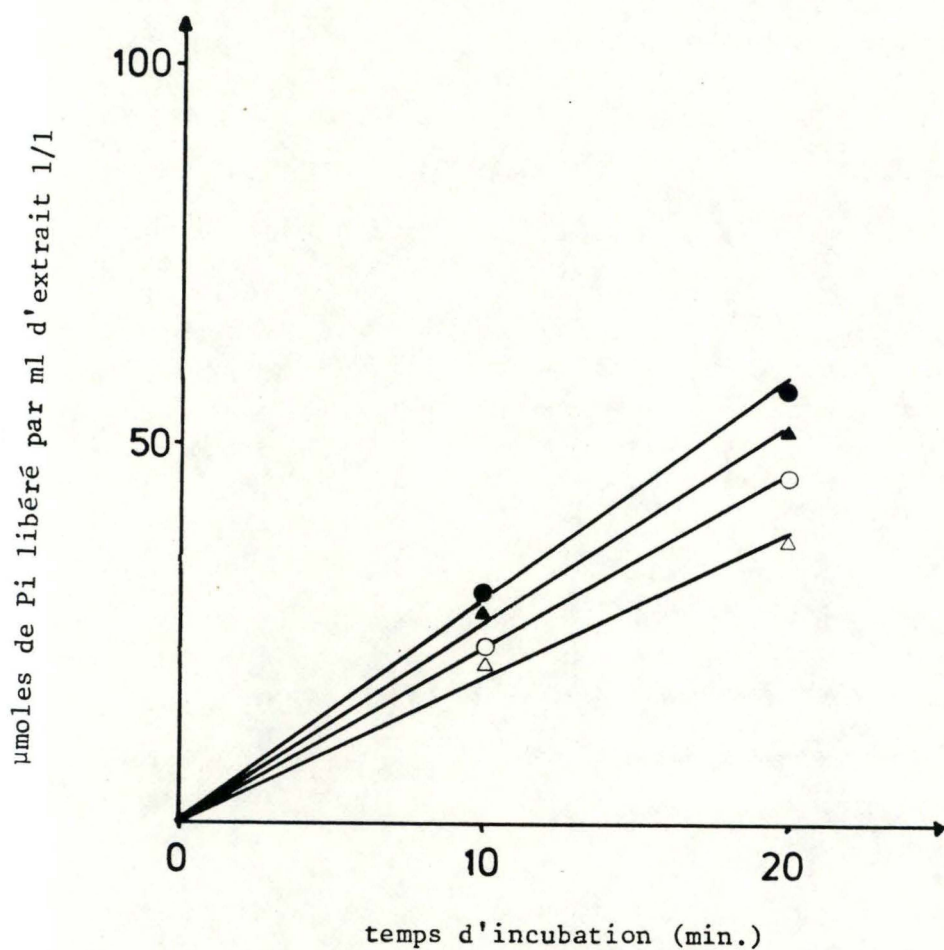


Fig. 23 - Activité des phosphorylases  $a$  (symboles ouverts) et  $a + b$  (symboles fermés) mesurée dans les branchies d'individus pédonculés ( $\blacktriangle, \triangle$ ) et épédonculés ( $\bullet, \circ$ ). Les mesures ont été réalisées sur des extraits 1/20 préparés à partir d'homogénat contenant du Tris - H Cl 25 mM pH 7,4, Na F 100 mM, EDTA mM, PMSF mM. Chaque point correspond à la moyenne de 2 valeurs.

VII . CONCLUSIONS GENERALES

La principale difficulté de ce travail expérimental a été l'application à un invertébré des méthodes de dosages de la phosphorylase et de la synthase bien maîtrisées chez les vertébrés supérieurs. Les études cinétiques de ces enzymes limitants pour la glyco-génolyse et la glyco-génosynthèse n'ont pu se réaliser qu'après avoir déterminé, entre autre, les effecteurs requis pour inhiber les enzymes d'interconversion (phosphatases et kinases), ainsi que les protéases particulièrement abondantes dans l'HP de crabe.

La possibilité de moduler "in vitro" l'activité de ces enzymes par certains effecteurs activateurs ou inhibiteurs utilisés chez les vertébrés à des concentrations assez semblables confirme totalement le fait que les enzymes de vertébrés et d'invertébrés se comportent de façon pratiquement identique, du moins pour ce qui est de la phosphorylase. En ce qui concerne la synthase, ces observations sont beaucoup moins nettes, étant donné la dénaturation rapide de l'enzyme, reconnue comme fragile également chez les vertébrés. Les résultats que nous avons à son propos sont donc à interpréter avec prudence.

De manière plus générale, tout ce qui précède confirme l'observation faite également par d'autres que la régulation du métabolisme des hydrates de carbone s'est développée de façon tout à fait analogue dans les 2 grands phylums évolutifs que sont les vertébrés et les invertébrés.

A côté de ces similitudes évolutives assez remarquables, il existe toutefois des particularités propres à chaque groupe, ce qui n'est pas étonnant. Nous avons pu en démontrer une qui est l'influence de la température sur l'activité enzymatique. Cette observation est à mettre en relation avec le fait que les homéothermes cherchent à assurer une température interne stable suivant les conditions du milieu, tandis que les crustacés qui sont poikilothermes harmonisent la température de leur milieu interne avec celle du milieu ambiant.

Pour ce qui est des conditions physiologiques étudiées, soit l'adaptation à des salinités variables et à différents temps d'exposition à l'air, nos résultats n'ont pas permis de

tirer des conclusions concernant le comportement des enzymes limitants pour la glycogénosynthèse et la glycogénolyse. La cause en était la présence d'un facteur apparemment artefactuel activant la phosphorylase et masquant de ce fait d'éventuelles variations de celle - ci.

Après avoir testé puis éliminé des facteurs exogènes tels que le stress de manipulation ou de surpeuplement, nous avons pu montrer un facteur provoquant une augmentation nette de l'activité phosphorolytique, la période de reproduction.

Ceci confirme les études de Dean (1965) qui ont mis en évidence une augmentation de la glycémie pendant la période de reproduction ainsi que les travaux de Gomorosova (1976) qui ont déterminé une relation entre la baisse de l'activité de la synthase et la période de reproduction.

Par la suite, nous avons essayé d'éliminer cette cause d'activation phosphorolytique masquant nos résultats expérimentaux par l'ablation des P.O.

La non vérification expérimentale de cette hypothèse nous laisse suggérer que l'activation de la phosphorylase lors de la période de reproduction ne serait pas sous le contrôle des P.O.

Les autres métabolites cellulaires tels que sucres totaux et glycogène subissent, quant à eux, de telles variations individuelles qu'il est pratiquement impossible d'en tirer des conclusions. Déjà en 1924, Verne signalait cette difficulté à propos de Carcinus maenas.

Pour en conclure, les éléments suivants peuvent se dégager de notre travail : d'une part, l'application à un invertébrés des méthodes de dosage enzymatiques maîtrisées chez les vertébrés supérieurs est un succès, du moins pour ce qui concerne la phosphorylase. En effet, le dosage de la synthase soulève encore quelques doutes qu'il conviendrait de dissiper par une étude plus poussée des caractéristiques de l'enzyme de crustacés.

D'autre part, dans les conditions physiologiques étudiées, il a été démontré l'existence d'un facteur endogène activateur de la phosphorylase, la reproduction, qui interfère avec nos résultats expérimentaux. Pour essayer de mettre en évidence une relation entre ces situations physiologiques et les activités enzymatiques, il conviendrait donc de faire ces études non pas en été, période d'activité sexuelle, mais bien à la

fin de l'automne et au début du printemps, périodes de repos sexuel.

---

VII . BIBLIOGRAPHIE

- . ABRAMOWITZ, A.A et al (1944)

The occurrence of diabetogenic factor in the eyestalks of crustaceans.

Biol. Bull., 86, n°1, 1 - 5.

- . AHEARN, G.A. et al (1977)

Intestinal water and ion transport in freshwater malacostracean prawns (Crustacea).

Water relation in membrane transport in plants and animals, 129 - 142.

(Academic press, New York).

- . BARNES, M. et al (1963)

The seasonal changes in body weight, biochemical composition, and oxygen uptake of two common boreo-arctic cirripedes, Balanus balanoides (L.) and Balanus balanus (L.) da Costa.

J. mar. biol. Ass. (U.K), 43, 185 - 211.

- . BAUCHAU, A.G. et al (1965)

Proteases and amylases de l'hepato - pancreas des crabes au cours du cycle de mue et d'intermue.

Ann. Soc. Roy. Zool. Belgique, 95, 29 - 37.

- . BAUCHAU, A.G. (1966)

La vie des crabes.

Encyclopédie biologique L XVI, Ed. Paul Lechevalier, Paris V, 138 p.

- . BAUCHAU, A.G. et al (1966)

Action hyperglycémiant de la sérotonine chez les Crustacés.

Annales d'endocrinologie, 27, 529 - 530.

- . BAUCHAU, A.G. et al (1968)

Action de la sérotonine et de l'hormone diabétogène des crustacés sur la phosphorylase musculaire. Gen. Comp. Endocri., 11, 132 - 138.

- . BECKER, G.L. et al (1974)

Calcium phosphate granules in the hepatopancreas of the blue crab, Callinectes sapidus. J. Cell. Biol., 61, 316 - 326.

- . BEECHEY, R.B. (1961,a)

The difference spectrum of respiratory particles isolated from the hepatopancreas of Carcinus maenas. Biochem. J., 78, 3.

- . BEECHEY, R.B. (1961, b)

Some spectrophotometric studies on respiring particles isolated from the hepatopancreas of Carcinus maenas. Comp. Biochem. Physiol, 3, 161 - 174.

- . BEECHEY, R.B. (1961, c)

Respiratory chain phosphorylation in subcellular particles isolated from the hepatopancreas of Carcinus maenas. Nature (London), 192, 975 - 976.

- . BHAGYALAKSHMI, A. et al (1984)

Subacute stress induced by sumithion on certain biochemical parameters in Oziotelphusa - senex - senex, the fresh water rice field crab. Toxicol. Lett., 21, 2, 127 - 134.

- . BLATT, L.M. et al (1971)

Regulation of rat liver glycogen synthetase. Relation - ship of the hormonal activation and the time - dependent in vitro activation. The journal of biological chemistry, 246, n°23, 7256 -

7264.

- . BOLLENBACHER et al (1972)

Endocrine regulation of lipid synthesis in decapod crustaceans.

Am. Zool., 12, 381 - 384.

- . BOULTON, A.P. et al (1970)

Glycolytic activity in hepatopancreas.

- . BOUVIER, E.L. (1940)

Faune de France. 37 - Decapodes marcheurs.

Lechevalier, Paris, 234 - 236.

- . BURRIN, O. N. et al (1966)

The nature and metabolic role of the Ubiquinone present in mitochondria isolated from the common shore crab, Carcinus maenas.

Comp. Biochem. Physiol., 19, 745 - 757.

- . BUSBY, S.J.W. et al (1976)

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

Current Topics in Cellular Regulation, 10, 89 - 160.

- . CAMESELLE, J.C. (1980)

The regulation of glycolysis in the hepatopancreas of the sea mussel Mytilus edulis L.

Comp. Biochem. Physiol., 65 B, 95 - 102.

- . CHAPELLE, S. (1977)

Lipid composition of tissues of marine crustaceans.

Biochim. Systematics Ecol., 5, 241 - 248.



- . CECCALDI, H.J. et al (1969)

Evolution des protéines de l'hémolymphe chez Carcinus maenas L. durant l'ovogénèse.

C.R. Seances Soc. Biol. Ses Fil., 163, 2638 - 2641.

- . DEAN, J.M. et al (1965 a)

Variations in blood glucose level of crustacea.

Comp. Biochem. Physiol., 14, 29 - 39.

- . DEAN, J.M. et al (1965 b)

Effects of temperature acclimatation on some aspects of carbohydrate metabolism in decapoda crustacea.

Biol. Bull., 129, 87 - 94.

- . DEAN, J.M. et al (1966)

Hypothermia and blood of crabs.

Comp. Biochem. Physiol., 17, 19 - 22.

- . DE LEERSNYDER (1967)

Influence de la salinité et de l'ablation des pédoncules oculaires sur la mue et sur le développement ovarien d'Eriocheir sinensis M.

Milne - EDWARDS

Cahiers de biologie Marine, 8, 421 - 435.

- . DENDINGER, J.E. et al ( 1973)

Carbohydrate metabolism in the striped shore crab, Pachygrapsus crassipes

II. Glycolytic rates of muscle, gill and hepatopancreas

Comp. Biochem. Physiol., 46 B, 699 - 708.

- . DE WULF, M. et al (1968 a)

The influence of inorganic phosphate, adenosine triphosphate and glucose-6 - phosphate on the activity of liver glycogen synthetase.

Eur. J. Biochem, 6, 545 - 551.

- . DE WULF, M et al (1968 b)

The interconversion of liver glycogen synthetase a and b in vitro.

Eur. J. Biochem., 6, 552 - 557.

- . DE WULF, M. et al (1970)

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

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

- . DOMBARDI, V. (1980)

Structural aspects of catalytic and regulatory of glycogen phosphorylase.

Int. J. Biochem., 13, 125 - 139.

- . DRACH, P. (1939)

Mue et cycle d'intermue chez les crustacés décapodes.

Annles. Inst. Oceangr., 19, 103 - 391.

- . EVANS, P.D. (1972)

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

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

- . FISKE, C.M. et al (1925)

The colorimetric determination of phosphorus.

J. Biol. chem., 66, 375 - 400.

- . FLORKIN, M. et al (1939)

La glycémie de l'écrevisse après l'injection d'adrenaline ou d'insuline.

Compt. Rend. Soc. Biol., 132, 484 - 486.

- . FOLIN, O. et al (1927)

On tyrosine and tryptophane determinations in proteins.  
J. Biol. chem., 73, 627 - 650.

- . FREDERICQ, L. (1901)

Sur la concentration moléculaire du sang et des tissus  
chez les animaux aquatiques.

Bull. Cl. Sei., Acad. Roy. Belgique, 1, 428 - 454.

- . FOX, H.N. (1952)

Anal and oral intake water by crustacea.

J. Exp. Biol., 29, 583 - 599.

- . GAEDE, G. (1981)

Activation of fat body glycogen phosphorylase in  
locusta migratoria by corpus cardiacum extract and  
synthetic adipo kinetic hormone.

J. Insect. Physiol., 27, 3, 155 - 162.

- . GIBSON, R. et al (1979)

The decapod hepatopancreas.

Oceanogr. Mar. biol. Ann. Rev., 17, 285 - 346.

- . GILBERT, L.I. et al (1970)

Lipid metabolism and transport in arthropods.

Chemical Zoology, 5, 229 - 254.

- . GOROMOVA, S.A. (1976)

Glycogen synthetase and fructose disphosphatase  
activity in the tissue of mullusks (Mytilus gallopro-  
vincialis) and crustaceans (Balanus improvisus,  
Carcinus maenas).

Zh. Evol. Biokhim. Fiziol., 12, n°4, 364 - 367.

- . GUARY, J.C. et al (1981)

Calcium phosphate granules : a trap for transuranics and iron in crab hepatopancreas.

Comp. Biochem. Physiol., 68 A, 423 - 427.

- . HEATH, J.R. et al (1970)

Some changes in biochemical composition with season and during the moulting cycle of the common shore crab, Carcinus maenas (L.)

J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 5, 199 - 233.

- . HERGENHAHN, H.G. (1983)

Purification and characterization of glycogen phosphorylase from abdominal muscle, heart and integument of the crayfish, Orconectes limosus .

Comp. Biochem. Physiol., 74 B, 3, 473 - 479.

- . HERS, M.G. (1964)

Glycogen storage disease. XI. Biochemical technology of glycogen storage disease.

Advances in metabolic disorders, 34 - 38 (Academic Press, New York).

- . HOHNKE, L. et al (1970)

Carbohydrate metabolism in crustaceans.

Chemical Zoology, 5, 147 - 166.

- . HU, A.S. (1958)

Glucose metabolism in crab Hemigrapsus nudus.

Arch. Biochem. Biophys., 75, 387 - 395.

- . HUGGINS, A.K. (1966)

Intermediary metabolism in Carcinus maenas.

Comp. Biochem. Physiol., 18, 283 - 290.

- . HUNER, J.V. et al (1979)

Whole - body calcium, magnesium and phosphorus levels of the california brown shrimps, Penacus californiensis (Decapoda : Penaeidae) as functions of molt stage. Comp. Biochem. Physiol., 64 A, 33 - 36.

- . JOHNSTON, N.A. et al (1972)

Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of Carcinus. Comp. Biochem. Physiol., 41 B, 433 - 443.

- . JUNGREIS, A.M. (1968)

The role of stored glycogen during long - term temperature acclimatation in the freshwater crayfish, Orconectes virilis. Comp. Biochem. Physiol., 24, 1 - 6.

- . KELLER, R. et al (1973)

The site of action of crustacean hyperglycemic hormone Gen. Comp. Endocrinol., 20, 572 - 578.

- . KING, E.N. et al (1969)

In vitro preparation of crab gill for use in ion transport studies. Arch. Inst. Physiol. Biochem., 77, 105 - 111.

- . KLEINHOLZ, L.H. (1948)

Experimental hyperglycemia in the marine crustacean, Libinia emarginota. Anat. Records, 101, 734.

- . KLEIN HOLZ, L. N. (1976)

Crustacean neurosecretory hormones and physiological specificity. Amer. Zool., 16, 151 - 166.

- . KROGH, A. (1965)

Osmotic regulation in aquatic animals.  
Dover Publications, inc, New york, 65 - 67.

- . LAWRENCE, J.M. (1976)

Organic composition and energy content of hepatopancreas  
of hermit crabs (Coenobita) from Eniwetok Atoll,  
Marshall Island.  
Crustaceana, 31, 2, 113 - 118.

- . LEFFLER, C.W. (1972)

Some effects of temperature on the growth and metabolic  
rate of juvenile blue crabs, Callinectes sapidus, in  
the laboratory.  
Marine Biology, 14, 104 - 110.

- . LUI, C.W. et al ( 1974)

Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary.  
J. Exp. Zool., 188, 289 - 296.

- . LYNCH, M.P. et al (1973)

Variations in serum constituents of the blue crab,  
Callinectes sapidus : Glucose.  
Comp. Biochem. Physiol., 45 A, 127 - 139.

- . MANTEL, L.M. et al (1977)

Osmotic regulation and  $\text{Na}^+ \text{K}^-$  activated ATPase in the  
green crab, Carcinus maenas, and the spider crab Libinia  
emarginata.  
Biol. Bull. (Woods hole), 153, 437 - 438.

- . Mc WHINNIE, M.A. et al (1960)

Analysis of blood sugars in the crayfish, Orconectes  
virilis.  
Comp. Biochem. Physiol., 1, 110 - 122.

- . Mc WHINNIE, M.A. et al (1962)

Crayfish hepatopancreas metabolism and the intermolt cycle.

Comp. Biochem. Physiol., 6, 159 - 170.

- . Mc WHINNIE, M.A. et al (1967)

Metabolism and low temperature acclimatation in the temperate crayfish, Orconectes virilis.

Comp. Biochem. Physiol., 20, 131 - 145.

- . Mc WHINNIE, M.A. et al (1972)

Crustecdysone mediated changes in crayfish.

Am. Zool., 12, 357 - 372.

- . MEENAKSHI, V.R. et al (1961)

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

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

- . MILLER, R. et al (1977)

Blood glutamate in arthropods.

Comp. Biochem. Physiol., 44 A, 991-996.

- . MUMBACK, M.W. et al (1977)

UDP as the inhibitor of glycogen synthesis from crustacean eyestalks.

Comp. Biochem. Physiol., 56 B, 47 - 48.

- . NAYLOR, E. (1958)

Tydal and diurna rythms of locomotory activity in Carcinus maenas (L.)

J. Exp. Biol., 35, 602 - 610.

- . NAYLOR, E. (1963)

Temperature relationships of the locomotor rhythm of  
Carcinus.

J. Exp. Biol., 40, 669 - 679.

- . NEWELL, R.C. et al (1972)

Aerial and aquatic respiration in the shore crab  
Carcinus maenas (L.)

Comp. Biochem. Physiol., 43 A, 239 - 252.

- . NORFOLK, J.R.W. et al (1980)

Investigation of the control of usine production in  
the shore crab, Carcinus maenas (L.)

Comp. Biochem. Physiol., 67 A, 141 - 148.

- . O'CONNOR, J.D. et al (1969)

Alteration of lipid metabolism associated with premolt  
events in the land crab and fresh - water crayfish.

Comp. Biochem. Physiol., 29, 889 - 904.

- . PASSANO, L.M. (1960)

Low temperature blockage of molting in Uca pugnax.

Biol. Bull., 118, 129 - 136.

- . PEQUEUX, A. (1979)

Blood proteins as related to osmoregulation in crustacea.

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

- . PERRIER, R. (1929)

La faune de la France en tableaux synoptiques illustrés.

Delagrave, Paris, p. 220.

- . RAMAMURTHI, R. et al (1968)

Endocrine control of glycogen synthesis in crabs.

Comp. Biochem. Physiol., 26, 311 - 320.

- . RENAUD, L. (1949)



Le cycle des réserves organiques chez les crustacés\_  
décapodes.

Annls. Inst. Oceangr. Monaco, 24, 259 - 357.

- . ROMESTAND, B. et al (1976)

Les protéines, les glucides et les lipides dans  
l'hémolymphe et l'hépatopancréas de quelques isopodes  
Cymothoïdae et leurs variations au cours du jeûne ex-  
périmental.

Bull. Soc. Zool., 101, 445 - 455.

- . SAGARDIA, F. (1969)

The enzyme glycogen phosphorylase system from the  
muscle of the blue crab, Callinectes danae.

Cysteine ATP enzyme Kinase P mercuri benzoate.

Comp. Biochem. Physiol., 28, 1377 - 1385.

- . SANTIAGO, D et al (1974)

Purification and properties of glycogen phosphorylase  
a from the muscle of the blue crab, Callinectes danae.

Arch. Biochem. Biophys., 163, 679 - 687.

- . SANTIAGO, P.A. et al (1974)

Kinetics of glycogen phosphorylase a from the muscle  
of the blue crab, Callinectes danae.

Arch. Biochem. Biophys., 163, 688 - 698.

- . SARAVANAN, T.S. (1979)

Studies of haemolymph carbohydrates in Scylla serrata  
Forsk. (Crustacea : Décapoda).

Ph. D. Thesis, University of Madras, Madras.

- . SARAVANAN, T.S. (1981)

Significance of periodic fluctuations in the haemolymph  
carbohydrates of Scylla serrata (forsk.) during star-  
vation and repeated injury.

J. Exp. Zool., 218, 2, 139 - 147.

- . SCHATZLEIN, F.C. et al (1973)

Carbohydrate metabolism in the striped shore crab,  
Pachygrapsus crassipes.

I - The glycolytic enzymes of gill, hepatopancreas,  
heart and leg muscle.

Comp. Biochem. Physiol., 45 B, 393 - 405.

- . SCHEER, B.T. (1951)

Blood sugar in spiny lobsters.

Physiol. Comp. Oecol., 2, 198 - 209.

- . SCHEER, B.T. (1959)

The hormonal control of metabolism in crustaceans.

IX - Carbohydrates metabolism in the transition from  
intermolt to premolt in Carcinides maenas.

Biol. Bull., 116, 175 - 183.

- . SCHWOCH, G. (1972)

Some studies on biosynthesis and function of trehalose  
in the crayfish Orconectes limosus Rafinesque.

Comp. Biochem. Physiol., 43 B, 905 - 917.

- . SEDLMEIER, D. (1982)

The mode of action of the crustacean neurosecretory  
hyperglycemic hormone (CHH). II - Involvement of  
glycogen synthase.

Gen. Comp. Endocri., 47, 426 - 432.

- . SEIFTER, S. et al (1950)

The estimation of glycogen with the anthrone reagent.

Arch. Biochem. Biophys., 25, 191 - 200.

- . SIEBERS (1972)

Mechanisms of intracellular isosmotic regulation of

the amino acid concentration in the crayfish,  
Orconectes limosus.

Z. Vergl. Physiol., 76, 97 - 114.

- . SPAARGAREN, D.M. (1974)

A study on the adaptation of marine organisms to  
changing salinities with special reference to the  
shore crab, Carcinus maenas.

Comp. Biochem. Physiol., 47 A, 499 - 512.

- . STAMANS, W. et al (1970)

The effect of glucose and treatment by glucocorticoids  
on the inactivation in vitro of liver glycogen phos-  
phorylase.

Eur. J. Biochem., 15, 9 - 12.

- . STALMANS, W. (1971)

The control of liver glycogen synthetase phosphatase  
by phosphorylase.

Eur. J. Biochem., 18, 582 - 587.

- . STALMANS, W. et al (1975)

The stimulation of liver phosphorylase b by AMP,  
fluoride and sulfate. A technical note on the specific  
determination of the a and b forms of liver glycogen  
phosphorylase.

Eur. J. Biochem., 54, 341 - 350.

- . TAYLOR, E.W. et al (1973)

The respiratory and cardiovascular changes associated  
with the emersion response of Carcinus maenas (L.)  
during environmental hypoxia at three different  
temperatures.

J. Comp. Physiol., 86, 95 - 115.

- . TAYLOR, E.W. et al (1978)

Aquatic and aerial respiration in the shore crab,  
Carcinus maenas (L.), acclimated to 15° C.  
J. Exp. Biol., 127, 315 - 323.

- . TELFORD, M. (1968 a)

Changes in blood sugar composition during the molt  
cycle of the lobster Homarus americanus.  
Comp. Biochem. Physiol., 26, 917 - 926.

- . TELFORD, M. (1968 b)

The effect of stress on blood sugar composition of  
the lobster, Homarus americanus.  
Canadian J. Zool., 46, 819 - 825.

- . TELFORD, M. (1968 c)

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

- . THABREW, M.I. et al (1971)

Carbohydrate metabolism in Carcinus maenas gill tissue.  
Comp. Biochem. Physiol., 40 B, 531 - 541.

- . THOMAS et al (1968)

A rapid filter paper assay for UDP - glucose - glucosyl -  
transferase, including an improved biosynthesis of  
UDP - [<sup>14</sup>C] - glucose.  
Anal. Biochem., 25, 486 - 499.

- . TIETZ, A. (1962)

Fat transport in locust.  
J. lipid. Res., 3, 421 - 426.

- . TOWLE, D.W. (1981)

Transport - related ATPases as probes of tissue

function in three ~~terres~~terrestrial crabs of Palan.  
J. Exp. Zool., 218, 89 - 95.

. TRAVIS, D.F. (1955)

The molting cycle of the spiny lobster, Panulirus argus Latreille.

II - Postecdysial, histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues.  
Biol. Bull., 108, 88 - 112.

. TRAVIS, D.F. (1957)

The molting cycle of the spiny lobster, Panulirus argus Latreille.

IV - Postecdysial, histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues.  
Biol. Bull., 113, 451 - 479.

. TRUCHOT, J.P. (1975)

Blood acid - base changes during experimental emersion and reimmersion of the intertidal crab, Carcinus maenas.

Respir. Physiol., 23, 351 - 360.

. UGLOW, R.F. (1969)

Hemolymph protein concentrations in protunid crabs.

II - the effects of imposed fasting on Carcinus maenas.  
Comp. Biochem. Physiol., 31, 959 - 967.

. VAN WEEL, P.B. (1970)

Digestion in crustacea.

Chemical Zoology, 5, 97 - 115.

. VAN WEEL, P.B. (1974)

Hepatopancreas.

Comp. Biochem. Physiol., 47 A, 1 - 9.

. VERNE, J. (1924)

Note histochimique sur le métabolisme du glycogène pendant la mue chez les crustacés.

C.r. Séanc. Soc. Biol., 90, 186 - 188.

- . WALLACE, J.C. (1972)

Activity and metabolic rate in the shore crab, Carcinus maenas.

Comp. Biochem. Physiol., 41 A, 523 - 533.

- . WANG, D.M. et al (1963)

UDPG - glycogen trans glucosidase and a natural inhibitor in crustacean tissue.

Comp. Biochem. Physiol., 9, 263 - 274.

- . WHEATLY, M.G. (1985)

The role of antennal gland in ion acid - base regulation during hyposaline exposure of the Dungeness crab Cancer magister (DANA).

J. COMP. Physiol., 155, 445 - 454.

- . WIENS, A.W. et al (1967)

The phosphorylase system of the silkworm, Hyalophora cecropia.

Comp. Biochem. Physiol., 21, 145 - 159.

- . ZAMMIT, V.A. et al (1976)

The maximum activities of hexokinase, phosphorylase, phosphofructokinase, glycerol phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, phosphoenol - pyruvate carboxykinase, nucleotide diphosphate kinase, glutamate - oxaloacetate transaminase and arginine kinase in relation to carbohydrate utilisation in muscles from marine invertebrates.

Biochem. J., 160, 447 - 462.

- . ZWILLING, R. et al (1981)

Invertebrate proteases.

Methods in Enzymology, 80 c, 633 - 664.

---