

ASPECTS ULTRASTRUCTURAUX DE LA BIODEGRADATION DE L'ANCIENNE CUTICULE DE  
Carcinus maenas DURANT LA PÉRIODE PRÉECDYSSIALE.

THOREZ, A., COMPERÉ, Ph.<sup>(1)</sup> et GOFFINET, G.

RÉSUMÉ - L'observation ultrastructurale de diverses régions tégumentaires du crabe Carcinus maenas pendant la période préecdysiale montre l'existence d'une biodégradation cuticulaire importante au niveau des sclérites. Au moment de l'exuviation, ce phénomène est tel qu'il affecte la totalité de la couche membraneuse ainsi que les deux tiers inférieurs de la couche principale. Il se traduit par une désorganisation suivie de la disparition des éléments microfibrillaires chitino-protéiques. De nombreuses gouttelettes ecdysiales, de même aspect que celles décrites chez les Insectes, et des formations sphériques à double paroi semblent participer activement au processus de dégradation. Des phénomènes comparables s'observent au niveau des régions cuticulaires non minéralisées soumises aux déformations mécaniques (membrane articulaire). Par contre, au niveau des zones tégumentaires impliquées dans les échanges respiratoires et/ou ioniques (branchies, feuillet interne des lames branchiostèges), ils sont nettement plus discrets et n'apparaissent que très tardivement.

mots-clés : cuticule, Carcinus maenas, mue (pré), biodégradation.

ABSTRACT - Ultrastructural observations of various integumental regions of the crab Carcinus maenas show an important biodegradation of the old sclerites during premolt. At the ecdysis, this biodegradation extends from the basis of the membranous layer up the upper third of the principal layer. The first biodegradation features are a disorganization followed by a complete disappearance of the microfibrils. Numerous ecdysial droplets, like those described in Insects and double membrane bounded microstructures probably take part in biodegradation processes. Similar phenomena are seen in unmineralized cuticles, except for permeable tegumental regions (gill and inner branchiostegite cuticles), where they are delayed and by far less developed.

key-words : cuticle, integument, Carcinus maenas, moult (pre), biodegradation.

INTRODUCTION

Chez les Crustacés décapodes, la cuticule est divisée en deux régions d'importance très inégale : l'épicuticule, mince couche superficielle d'apparence pluristratifiée, et la procuticule, plus épaisse et d'aspect lamellaire. Au niveau des sclérites, la procuticule comprend trois couches distinctes : la couche pigmentaire, la couche principale et la couche membraneuse. Celle-ci se différencie des autres par sa faible épaisseur, l'absence de minéralisation et une distribution homogène et compacte des microfibrilles chitino-protéiques. En contact direct avec l'ectoderme, c'est la dernière strate procuticulaire à

---

Laboratoire de Morphologie animale, Quai Van Beneden, 22, B-4020 LIÈGE (Belgique)

(1) Aspirant au Fonds National de la Recherche Scientifique.

- Ce travail a été réalisé grâce au Fonds de la Recherche Fondamentale Collective (convention n° 2.4506.83 et 2.4516.86).

être mise en place, en fin de période post-ecdysiale (stade C<sub>3</sub> selon la nomenclature de Drach et Ichernigovtzeff, 1967).

Des études biochimiques réalisées chez Carcinus maenas montrent que la couche membraneuse se transforme rapidement en un gel hygroscopique de nature glycoprotéique (Jeuniaux, 1959, 1963). Cette gélification s'accompagne d'une libération d'acides aminés et de N-acétyl-glucosamine et se poursuit jusqu'à l'exuviation, entre la nouvelle cuticule en voie de formation et l'ancienne en cours de dégradation. On admet généralement que ce gel joue un rôle de "lubrifiant" au moment de l'exuviation et qu'il constitue un réservoir d'enzymes hydrolytiques susceptibles de diffuser vers les strates de l'ancienne cuticule, les produits résultant de cette activité chitino et protéolytique étant récupérés par l'ectoderme et incorporés dans les matériaux de la nouvelle cuticule (Freeman, 1980). Chez Carcinus maenas en particulier, quelque 50 % environ de la chitine et des protéines acido-solubles de l'ancienne cuticule seraient mobilisées (Jeuniaux et al., 1986).

A partir d'observations en microscopie électronique à transmission, le présent travail considère d'abord les modifications et altérations progressives de la couche membraneuse et des strates proximales de la couche principale du tégument minéralisé de C. maenas (lame branchiostège externe, feuillet externe de l'abdomen, bouclier céphalothoracique), au cours des stades préecdysiaux. Les modifications de l'organisation de la procuticule proximale seront ensuite envisagées et comparées au niveau des régions tégumentaires non minéralisées, à savoir au niveau de la membrane articulaire, ainsi que du feuillet interne de la lame branchiostège et de la branchie, structures impliquées dans des phénomènes d'échanges hydro-minéraux et respiratoires.

Les observations ont été réalisées sur des crabes de petite taille (4 à 5 cm), respectivement aux stades D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>', D<sub>1</sub>'' et D<sub>2</sub>, ainsi que sur des exuvies fraîchement prélevées. La détermination des stades est basée sur la méthode de Drach et Ichernigovtzeff (1967), complétée par Buchholz (1982) et Anger (1983).

#### BIODEGRADATION DES ZONES CUTICULAIRES MINERALISEES (SCLERITES)

D'un point de vue morphologique, la cuticule des sclérites de C. maenas se caractérise, au cours de la phase préecdysiale, par une série de phénomènes complexes. On retiendra en particulier le décollement entre l'épiderme et l'ancienne cuticule ainsi que les remaniements de la zone apicale de l'épiderme, l'apparition des gouttelettes ecdysiales et des microstructures arrondies à double paroi, la désorganisation suivie de la disparition des éléments microfibrillaires. Ces phénomènes se déroulent selon une séquence bien déterminée.

##### a) Le phénomène de l'apolyse et le stade D<sub>0</sub>

On admet classiquement d'après les travaux de Drach et Ichernigovtzeff (1967), que la phase préecdysiale d'un cycle de mue de Crustacé décapode se manifeste dès le stade D<sub>0</sub> par un décollement de l'ectoderme et de la cuticule (apolyse), ménageant de ce fait un espace exuvial où s'édifiera la nouvelle cuticule.

Un tel décollement n'a jamais été observé à ce stade chez C. maenas, quelle que soit la région tégumentaire examinée (fig. 1). Contrairement à l'opinion généralement répandue, l'apolyse ne peut donc être considérée comme le critère morphologique type définissant le stade Do. Un véritable espace exuvial, tel qu'il est décrit dans la littérature (Jungreis, 1978a et b; Gnatzy et Romer, 1980) n'apparaît que tardivement, à la fin du stade D'' (fig. 4) et de façon synchrone dans toutes les régions cuticulaires étudiées. Cet espace semble par ailleurs résulter plus d'un creusement de la couche membraneuse suite à la dégradation des fibrilles chitino-protéiques que d'un véritable décollement de la cuticule et de l'ectoderme.

Cependant, si l'apolyse ne constitue pas un critère morphologique caractéristique du stade Do, certains remaniements de la membrane plasmique apicale de l'épiderme des sclérites témoignent des premières manifestations de l'entrée en cycle de mue. En effet, dès le stade Do, outre une intense vacuolisation de l'apex des cellules (fig. 1), les plaques denses, organisateurs membranaires impliqués dans le dépôt des éléments fibrillaires de l'ancienne cuticule, sont les premières structures à subir une dégradation. A certains endroits, on assiste à leur internalisation dans le cytoplasme apical où elles sont ensuite incluses dans des corps multivésiculaires, probablement d'origine lysosomiale. De nouvelles plaques denses apparaîtront plus tard, juste avant l'apolyse, dès la mise en place des premières strates (cuticuline) de la nouvelle cuticule (stade D<sub>1</sub>'').

#### b) Les gouttelettes ecdysiales

Une autre manifestation morphologique précoce de l'entrée en cycle de mue consiste en l'apparition, à la base de la couche membraneuse, de petites formations granulaires denses aux électrons (fig. 1). Très rapidement, ces formations, non limitées par une membrane, paraissent fusionner pour constituer de grands massifs polymorphes dont l'aspect et la structure sont comparables aux gouttelettes ecdysiales décrites chez les Insectes (Filshie, 1970; Locke et Krishnan, 1973; Gnatzy et Romer, 1980). Le mode de formation et l'évolution de ces gouttelettes chez C. maenas, corroborent les hypothèses de Filshie (1970) et Locke (1976) selon lesquelles ces structures, chez les Insectes, contiendraient des précurseurs d'enzymes actifs du fluide de mue et joueraient un rôle primordial dans les processus de dégradation cuticulaire.

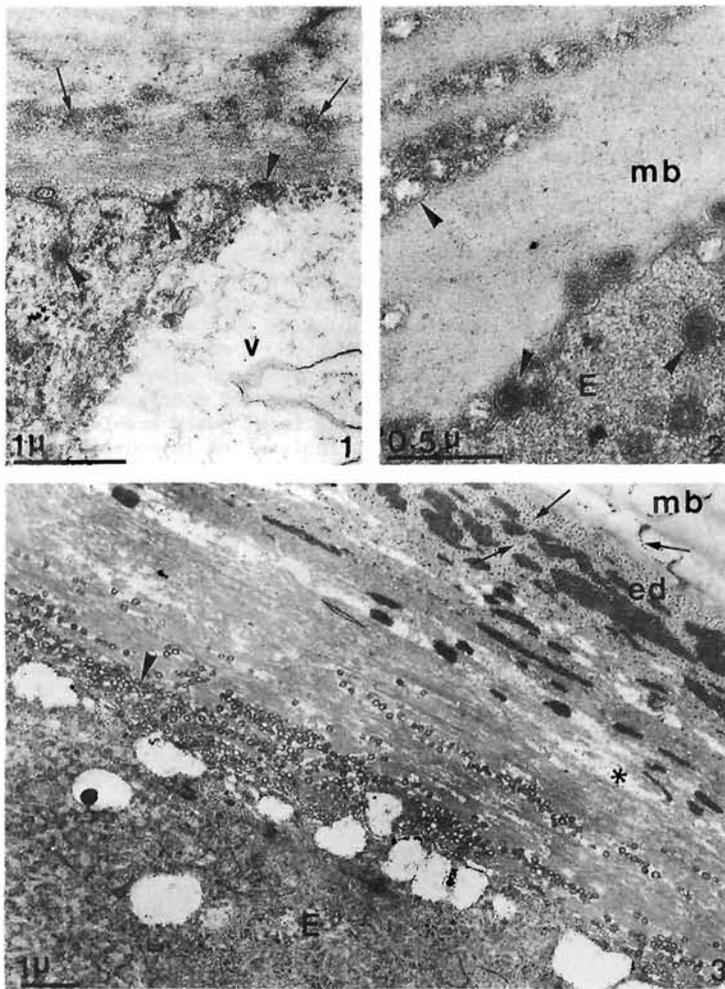


Fig. 1. Feuillet externe de la lame branchiostège au stade Do. Plaques denses associées à des invaginations de la membrane plasmique apicale (têtes de flèche) ou incluses dans de petites vésicules. v; vacuoles. Fig. 2. Feuillet externe de la lame branchiostège au stade D<sub>1</sub>'". Microstructures à double paroi (têtes de flèche) à l'apex des cellules ectodermiques et au niveau de la zone dégradée de la couche membraneuse (mb). E; ectoderme. Fig. 3. Feuillet externe de la lame branchiostège au stade D<sub>1</sub>'". La zone dégradée de la couche membraneuse couvre sept à huit lamelles. En bordure du front de dégradation, les gouttelettes ecdysiales (ed) sont entourées d'un grand nombre de petits grains d'aspect identique (flèches). mb; couche membraneuse intacte. E: ectoderme. astérisque; lacune. Tête de flèche; microstructures à double paroi.

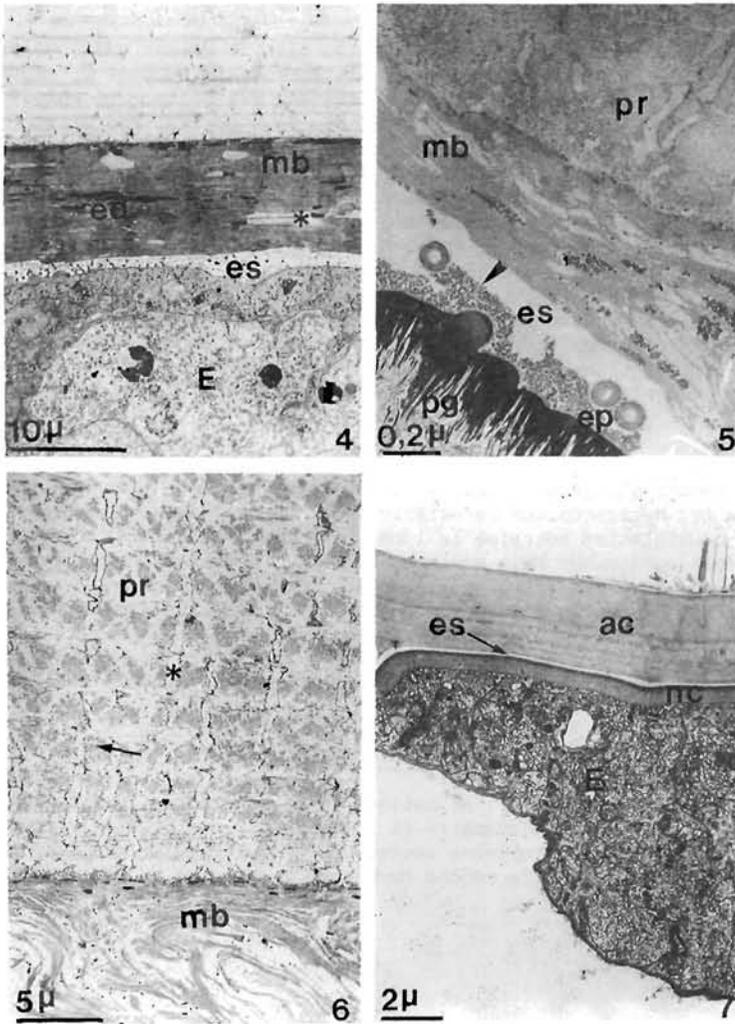


Fig. 4. Feuillet externe de la lame branchiostège au stade D<sub>1</sub>' tardif. Apparition de l'espace ecdysial (es). La couche membraneuse (mb) est dégradée sur une épaisseur de treize lamelles environ. E; ectoderme. ed; gouttelettes ecdysiales. astérisque; lacune. Fig. 5. Feuillet externe de la lame branchiostège au stade D<sub>2</sub> avancé. La totalité de la couche membraneuse ainsi que les lamelles proximales de la couche principale (pr) sont dégradées. ep; épicuticule. es; espace ecdysial. pg; couche pigmentaire. tête de flèche; microstructures à double paroi. Fig. 6. Exuvie du feuillet externe de la lame branchiostège. La couche membraneuse (mb) subsiste sous une forme filamenteuse désorganisée. La couche principale (pr) apparaît profondément dégradée. Flèche; macrofibres altérées. astérisque; fantômes de canalicules intracuticulaires. Fig. 7. Lamelles branchiales (D<sub>2</sub>). ac; ancienne cuticule. E; ectoderme. es; espace ecdysial. nc; nouvelle cuticule.

Le fait que certaines régions tégumentaires qui, comme nous le verrons par la suite, ne subissent pas ou peu d'altération sont dépourvues de ces gouttelettes, plaide en faveur de cette hypothèse.

Toutefois, contrairement aux Insectes où elle ne serait que très progressive (Locke, 1976), la sécrétion des gouttelettes ecdysiales chez C. maenas semble beaucoup plus limitée dans le temps, s'effectuant par un largage massif en début de période préecdysiale (stades  $D_0$  et  $D_1^1$ ). Dès le stade  $D_1^1$ , ces structures font en effet défaut ou n'existent plus que sous la forme de quelques amas de petite taille au niveau de la zone proximale de l'épiderme, où de nombreuses lacunes évidées de tout contenu microfibrillaire font progressivement leur apparition (fig. 3). Par contre, dans la région dégradée supérieure, en particulier au niveau de la zone correspondant au front de dégradation, ces gouttelettes ecdysiales présentent les figures classiques de gros massifs denses aux électrons. L'observation à haute résolution de ces massifs montre qu'ils semblent subir une désintégration progressive de leur contenu par émission d'amas minuscules. La présence de ces derniers dans les canaux cuticulaires suggère d'autre part que les canalicules verticaux constituent des voies d'accès privilégiées aux zones cuticulaires supérieures non encore affectées par les phénomènes de dégradation (fig. 3).

La disparition des gouttelettes ecdysiales (fig. 5) dès le stade  $D_2$  coïncide avec le moment où, selon Jeuniaux (1959, 1963), la couche membraneuse se transforme en un gel hygroscopique caractéristique. De là à supposer que la désorganisation des gouttelettes entraîne la libération d'enzymes confirme ainsi les observations de cet auteur sur Maia squinado et Cancer pagurus et pour qui la couche membraneuse gélifiée constitue, dès le stade  $D_2$ , le réservoir d'enzymes hydrolytiques assurant la dégradation des couches procuticulaires proximales jusqu'au moment de l'exuviation. Notons que chez les Insectes, Noble-Nesbitt (1963), Locke (1964), Locke et Krishnan (1973) ont également établi un parallélisme entre la disparition des gouttelettes ecdysiales et la digestion de l'ancienne cuticule par le fluide de mue.

#### c) Les microstructures arrondies à double paroi

Très tôt, dès le stade  $D_1^1$ , de petites formations sphériques à contenu dense aux électrons, de 100 nm de diamètre et limitées par une double membrane, font leur apparition dans le cytoplasme apical des cellules épidermiques et au niveau des lamelles proximales de la couche membraneuse en cours de dégradation (fig.2).

Leur nombre s'accroît considérablement au cours des stades ultérieurs, leur présence étant étroitement associée à la progression centrifuge du processus de dégradation. Parallèlement, elles semblent se vider de leur contenu mais, au contraire des gouttelettes ecdysiales, leur présence est notée dans le liquide exuvial jusqu'aux stades ultimes précédant directement l'exuviation.

L'application de tests histochimiques (comme la réaction de Feulgen), couplée à des observations à haute résolution, révèlent qu'il ne s'agit pas d'éléments bactériens, ni de particules virales.

Si la nature exacte de ces microstructures demeure énigmatique, leur origine, leur évolution et leur localisation au cours de la phase préecdysiale, ainsi que leur absence dans les cuticules non affectées par les phénomènes de dégradation, suggèrent néanmoins leur participation active dans le processus de biodégradation.

#### d) La dégradation du système fibrillaire

Les premiers signes de dégradation des fibres chitino-protéiques se manifestent dès le stade Do au niveau des strates proximales de la couche membraneuse par une profonde altération de l'organisation spatiale du système fibrillaire. L'orientation originelle des microfibrilles selon une architecture tridimensionnelle hélicoïdale caractéristique (= système universel en "contreplaqué" décrit par Bouligand, 1965, 1971, 1972), devient en effet complètement anarchique.

Cette désorganisation est bientôt suivie par la disparition locale des éléments microfibrillaires, faisant ainsi place à des espaces lacunaires. Le développement accru du nombre et de l'importance de ces lacunes, parallèlement à la progression centrifuge du processus de biodégradation, traduit une résorption massive des matériaux chitino-protéiques hydrolysés (figs. 4 et 5). Témoignant de l'intense résorption de matériaux cuticulaires, on observe, comme chez les Insectes (Locke et Collins, 1967; Delachambre, 1971), de nombreuses "coated vesicles" dès le stade D<sub>1</sub>' dans la région apicale des cellules de l'ectoderme.

Au moment de l'exuviation, la dégradation des matériaux organiques de l'ancienne cuticule est telle qu'elle affecte la totalité de la couche membraneuse ainsi que les deux tiers inférieurs de la couche principale (figs. 5,6). Les canalicules intracuticulaires verticaux, initialement limités par un manchon de fibres verticales ne subsistent que sous l'aspect de "fantômes", l'organisation caractéristique des microfibrilles horizontales en macrofibres ayant d'autre part complètement disparu (fig. 6).

#### BIODEGRADATION DES ZONES TEGUMENTAIRES NON MINÉRALISÉES

A l'inverse des régions minéralisées où les phénomènes de dégradation cuticulaire se déroulent selon un même schéma, la comparaison des zones tégumentaires non minéralisées montre des figures de dégradation très variables. Rappelons toutefois que, quel que soit le niveau considéré, l'apolyse a toujours lieu à la fin du stade D<sub>1</sub>'.

#### a) Membrane articulaire

Si l'on excepte quelques particularités d'importance secondaire, les figures de dégradation de la membrane articulaire montrent de grandes ressemblances avec celles observées dans les zones minéralisées (ampleur des phénomènes de dégradation, microstructures à double paroi, gouttelettes ecdysiales).

Il est vrai que, anatomiquement, la membrane articulaire ne constitue qu'un simple prolongement des sclérites et qu'elle présente, à l'exclusion de la présence des sels de calcium, des caractéristiques fort proches de celles des régions minéralisées quand on considère son épaisseur, le nombre de lamelles procuticulaires et son organisation générale.

#### b) Feuillet interne de la lame branchiostège et branchie

Par rapport aux régions minéralisées et à la membrane articulaire, les phénomènes de dégradation cuticulaire dans ces deux régions se manifestent d'une manière beaucoup plus discrète.

Les premiers signes morphologiques de l'entrée en mue n'apparaissent que très tardivement, lors de la mise en place de la nouvelle cuticule (stade D<sup>1</sup>). L'internalisation des plaques denses qui constituait le premier signe morphologique de biodégradation dans le cas des sclérites, n'a pas été observée ici. De plus, ces phénomènes de dégradation se réduisent le plus souvent à une disparition de l'organisation lamellaire et de l'association compacte et homogène des éléments microfibrillaires des trois ou quatre lamelles proximales de la cuticule. Ces phénomènes ne s'accompagnent d'ailleurs jamais d'une formation de gouttelettes ecdysiales, ni de microstructures à double paroi (fig. 7).

Des observations récentes sur la morphologie (Goffinet et Compère, 1986) et sur la physiologie (Péqueux, communication personnelle) des cuticules impliquées dans des phénomènes respiratoires et d'échanges ioniques, montrent une organisation et des propriétés particulières de ces cuticules. Faut-il voir là une relation entre l'apparition tardive et discrète des phénomènes de biodégradation, ne prenant place que lorsque la sécrétion de la nouvelle cuticule a débuté, et la nécessité pour l'organisme de maintenir constantes ses conditions internes d'homéostasie au cours du cycle de mue ? Seule une étude plus poussée sur la nature chimique de ces cuticules serait susceptible d'apporter une réponse.

#### CONCLUSION

Les phénomènes de biodégradation cuticulaire revêtent des aspects très différents selon les régions envisagées. D'une manière générale, les régions à vocation essentiellement mécanique, telles que les sclérites et les membranes articulaires, subissent une dégradation précoce et très marquée. Au contraire, les zones cuticulaires impliquées dans des phénomènes respiratoires (feuillet interne de la lame branchiostège et branchie) et/ou d'échanges hydro-minéraux (branchie) ne sont pas ou peu affectées. Le fait que la dégradation de ces zones cuticulaires perméables est peu poussée et tardive par rapport aux zones à rôle mécanique, suggère que l'ectoderme présente deux pics d'activité cellulaire distincts durant la période préecdysiale. Ils correspondraient respectivement à la biosynthèse des enzymes hydrolytiques suivie de la résorption des matériaux de

l'ancienne cuticule et à la biosynthèse de matériaux du nouveau tégument. Seul le second type d'activité se manifesterait dans les zones cuticulaires perméables.

- 
- ANGER, K., 1983. Molt cycle and morphogenesis in Hyas araneus larvae (Decapoda Majidae), reared in the laboratory, Helgoländer Meeresunters., 36, 285-302.
- BOULIGAND, Y., 1965a. Sur une architecture torsadée répandue dans de nombreuses cuticules d'Arthropodes, C.R. hebd. Séanc. Acad. Sc. Paris, 261, 3665.
- BOULIGAND, Y., 1971. Les orientations fibrillaires dans le squelette des Arthropodes. I. L'exemple des crabes, l'arrangement torsadé des strates, J. Micros. Paris, 11, 441-472.
- BOULIGAND, Y., 1972. Twisted fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases, Issue and Cell, 4, 2, 189-217.
- BUCHHOLZ, F., 1982. Drach's molt staging system adapted for Euphausiids, Marine Biol., 66, 301-305.
- DELACHAMBRE, F., 1971a. Modifications de l'épiderme au cours de la sécrétion de l'épicuticule imaginaire chez Ienebrio molitor, Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 112, 97-119.
- DRACH, P. et ICHERNOGOVITZEFF, C., 1967. Sur la méthode de détermination des strates d'intermue et son application générale aux Crustacés, Vie et Milieu, sér.A, Biol. Marine, 18, 595-609.
- FILSHIE, B.K., 1970. The fine structure and deposition of the larval cuticle of the sheep blowfly (Lucilia cuprina), Issue and Cell, 2, 479-489.
- FREEMAN, J.A., 1980. Hormonal control of chitinolytic activity in the integument of Balanus amphitrite in vitro, Comp. Biochem. Physiol., 65A, 1, 13-17.
- GNATZY, W., ROMER, F., 1980. Morphogenesis of mechanoreceptor and epidermal cells of crickets during the last instar, and its relation to molting-hormone level, Cell Issue Res., 213, 369-391.
- GOFFINET, G., COMPERE, Ph., 1986. Aspects ultrastructuraux et fonctionnels de diverses régions cuticulaires non minéralisées d'un Crustacé décapode Carcinus maenas, Anns. Soc.r. Zool. Belg., 117 (2), 177-191.
- JEUNIAUX, Ch., 1959. Sur la gélification de la couche membraneuse chez les Crabes en mue, Arch. Intern. Physiol. Bioch., 67, 516-517.
- JEUNIAUX, Ch., 1963. Chitine et chitinolyse. Synthèse d'enzymes chitinolytiques et dégradation de la chitine cuticulaire chez les Crustacés décapodes, édité par Masson et Cie, Paris, 136-144.
- JEUNIAUX, Ch., COMPERE, Ph., GOFFINET, G., 1986. Structure, synthèse et dégradation des chitinoprotéines de la cuticule des Crustacés décapodes, Boll. Zool., 53, 183-196.
- JUNGREIS, A.M., 1978a. The composition of larval-pupal molting fluid in the tobacco horn worm Manduca sexta, J. Insect Physiol., 24, 65-73.
- JUNGREIS, A.M., 1978b. Physiology of molting in insects, in : IREHERNE, J.E., BERRIDGE, M.J., WIGGLESWORTH, V.B. (Eds.), Advancer of Insect Physiology, 14, 109-183.
- LOCKE, M., 1964. The structure and formation of the integument in Insects, in : ROCKSTEIN, the Physiology of Insecta, vol. III, Academic Press, New-York, 379-470.
- LOCKE, M., 1976. The role of plasma membrane plaques and Golgi complex vesicles in cuticle deposition during the moult/intermoult cycle, in : HEPBURN, M.R. (ed.), the insect integument, Elsevier, Amsterdam, 237-258.

- LOCKE, M., COLLINS, J.V., 1967. Protein uptake in multivesicular bodies in the molt/intermolt cycle of an insect, Science, N.Y., 155, 467-469.
- LOCKE, M., KRISHNAN, N., 1973. The formation of the ecdysial droplets and the ecdysial membrane in an insect, Tissue and Cell, 5, 3, 441-450.
- NOBLE-NESBITT, J., 1963b. The cuticle and associated structures of Podura aquatica at the moult, Q.J. microsc. Sci., 104, 369-391.