

VARIATIONS DES ACTIVITES DIGESTIVES EN FONCTION DES FACTEURS DU MILIEU
CHEZ LES CRUSTACES

François GALGANI^(1,2,3), Yves BENYAMIN⁽²⁾, Alain Van WORMHOUDT⁽³⁾
et Hubert J. CECCALDI⁽¹⁾

R E S U M E

L'équipement enzymatique protéolytique de l'hépatopancréas de six espèces de crevettes Pénéides (*Penaeus kerathurus*, *P. japonicus*, *P. monodon*, *P. stylirostris*, *P. merguensis* et *P. vannamei*) et quelques unes de leurs variations physiologiques des protéases digestives de *P. japonicus* ont été caractérisées.

Dans l'hépatopancréas de *P. kerathurus*, il existe des activités trypsique, chymotrypsique, leucine-aminopeptidasique et carbocypeptidasique de type A et B. Il existe également une activité collagénolytique et une protéase de faible poids moléculaire. Les propriétés physico-chimiques et catalytiques de ces enzymes sont proches de celles décrites pour les autres groupes zoologiques. Les principales protéases sont représentées chez les six espèces étudiées par des formes moléculaires (profils électrophorétiques) différentes.

Un dosage immunoelectrophorétique et un dosage radioimmunologique ont été mis au point afin de mesurer les variations de la quantité de trypsine de l'hépatopancréas de *Penaeus japonicus* au cours des cycles biologiques.

Au cours du développement larvaire, les activités et les quantités de trypsine présentent un maximum au stade zoé. L'évolution des activités des protéases au cours de la croissance ne montre pas de discontinuité. Au cours du cycle d'intermue, les activités des protéases digestives et les quantités de trypsine présentent une valeur maximale au stade D_2D_3 .

Une augmentation de la température d'acclimatation des animaux provoque une augmentation des activités spécifiques des protéases liées à une modification des paramètres cinétiques dans le cas de la trypsine, et un changement quantitatif d'isoenzymes dans le cas de la leucine aminopeptidase. Les variations de la salinité ne modifient ni les activités spécifiques, ni les quantités de trypsine, ni les spectres électrophorétiques de différentes protéases.

Chez *Palaemon serratus*, la purification de l' α -amylase par chromatographie d'affinité a permis d'obtenir un anticorps, dont les réactions sont nulles avec l' α -amylase de bactérie et de porc, et faibles avec celles d'*Astacus*, *Homarus* et *Cancer*.

Dans l'hépatopancréas, l' α -amylase est localisée dans les cellules sécrétrices, d'absorption et fibrillaires mais aussi dans les hémocytes.

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES,

Laboratoire de Biochimie et Ecologie des Invertébrés marins.

1. Station marine d'Endoume, URA CNRS N° 41, 13007 MARSEILLE

2. Centre de Biochimie macromoléculaire du CNRS, B.P. 5051, 34033, MONTPELLIER

3. Laboratoire de Biologie marine du Collège de France, B.P. 38.

29110 CONCARNEAU

Les activités enzymatiques sont liées à des sécrétions de certains facteurs hormonaux.

En été, durant le cycle d'intermue, le taux de l'isoenzyme de l'amylase augmente deux fois entre l'intermue et la prémue. Son maximum est atteint au stade D', alors que l'activité maximale de l' α -amylase est atteinte au stade D". En hiver, aucune variation significative n'a été mesurée.

A partir d'extraits des pédoncules oculaires totaux ou de glande du sinus, trois fractions hyperglycémiques sont différenciées par électrophorèse, ayant respectivement des poids moléculaires d'environ 20.000, 8.000 et 2.500 daltons.

Chez *Homarus gammarus*, les activités enzymatiques digestives ne sont pas les mêmes lorsque les aliments avec lesquels ils sont nourris ont des compositions différentes. Pour un aliment contenant 35 % de protéines, les activités amylasiques et protéasiques digestives, les teneurs en ADN et en ARN de l'hépatopancreas sont maximales, ainsi que la teneur en protéines totales de l'animal entier.

S U M M A R Y

Proteolytic enzymes of hepatopancreas of six species of Peneids (*Penaeus kerathurus*, *P. japonicus*, *P. monodon*, *P. stylirostris*, *P. merguensis* and *P. vannamei*) have been studied. Some of their physiological variations have been characterized.

In *P. kerathurus* hepatopancreas, trypsin, chymotrypsin, leucine-aminopeptidase and carboxypeptidase A and B exist, as well as collagenase and a low molecular weight protease. Their physico-chemical and catalytic properties of these enzymes are close to those described in other zoological groups. Main proteases are characterized in the six species by different electrophoretic patterns.

Immuno-electrophoretic and radioimmunologic measurements have been used to measure trypsin variations in *P. japonicus* hepatopancreas during their biological cycles.

During larval development, activities and trypsin quantities are maximum during zoea stage. Evolution of proteases activities during the growth does not show any discontinuity. During moult cycle, activities of digestive proteases and quantities of trypsin show maximal values at D_2D_3 stages.

Increase in acclimation temperature of crustacean enhance increase of specific activities of proteases related to kinetic parameters variations in the case of trypsin, and to quantitative changes of isoenzymes in the case of leucine aminopeptidase. Variations of salinity does not modify specific activities, nor quantities of trypsin, nor electrophoretic patterns of these different proteases.

In *Palaemon serratus*, purification of α -amylase by affinity chromatography have been completed; this amylase have no reaction with bacteria and pork α amylases, and weak reaction with *Astacus*, *Homarus* and *Cancer* α -amylases.

In *P. serratus* hepatopancreas, α -amylase is located in secretory, absorptive and fibrillar cells, and also in hemocytes. Enzymatic activities are linked to secretion of some hormonal factors.

In summer, during moult cycle, isoenzyme level of amylase increases.

From total eyestalk or from sinus gland, three hyperglycemic fractions have been differentiated by electrophoresis, having molecular weight near 20,000, 8,000 and 2,500 daltons.

In *Homarus gammarus*, digestive enzymatic activities are not the same when they are fed with different compound diets. For a food containing 35 % proteins, maximal values are measured for digestive amylase and proteases, for hepatopancreas DNA, RNA and for total protein content of animal.

M O T S - C L E S : *Penaeus kerathurus*, *P. japonicus*, *P. monodon*, *P. stylirostris*, *P. merguensis*, *P. vannamei*, *Palaemon serratus*, *Homarus gammarus*, enzymes digestives, trypsine, chymotrypsin, leucine aminopeptidase, carboxypeptidase A et B, cycle d'intermue, croissance, développement larvaire, endocrinologie, glande du sinus, aliments composés.

KEY WORDS : *Penaeus kerathurus*, *P. japonicus*, *P. monodon*, *P. stylirostris*, *P. merguensis*, *P. vannamei*, *Palaemon serratus*, *Homarus gammarus*, digestive enzymes, trypsin, chymotrypsin, leucine aminopeptidase, carboxypeptidase A and B, moult cycle, growth, larval development, endocrinology, sinus gland, compound diets.

I. INTRODUCTION

Chez les Invertébrés marins, les facteurs du milieu jouent un rôle très important sur les fonctions physiologiques, comme la croissance, la reproduction ou la nutrition. Leur action peut être soit globale, jouant un rôle sur le métabolisme général des organismes, soit très spécifiques en passant par le relais des récepteurs, du tissu nerveux, de neurosecrétions, d'hormones et de modifications d'activités au niveau macromoléculaire dans les organes cibles.

En aquiculture, la mise au point des techniques d'élevage, et l'amélioration des performances de production passe par une bonne adaptation des aliments composés aux caractères physiologiques des espèces que l'on élève, et en particulier aux capacités de digestion de leurs enzymes digestives.

Il est donc indispensable de bien connaître d'une part les caractéristiques de ces enzymes purifiées, d'autre part, les variations et les modifications de leurs activités lorsque les conditions du milieu extérieur varient.

Les régulations des synthèses des enzymes digestives et le contrôle de leurs activités ne sont pas identiques selon les crustacés considérés, même à l'intérieur du groupe des Décapodes.

Aussi faut-il que des progrès soient réalisés sur ces divers plans indissociables les uns des autres.

Les enzymes digestives voient ainsi leurs activités affectées à chaque étape de leur croissance par les facteurs du milieu comme la température, la photopériode, la longueur d'onde ou l'intensité de la lumière.

Mais les animaux étudiés subissent également une évolution propre, en fonction de leur âge, et, suivant l'étape considérée de leur développement, les facteurs du milieu vont agir sur eux de façon différente.

2. PROTEASES DES CREVETTES PENEIDES

2.1. Propriétés des protéases

La trypsine représente l'élément majeur des enzymes protéolytiques digestives ; chez toutes les crevettes péneïdes étudiées, son évaluation à l'aide d'inhibiteurs spécifiques indique qu'elle représente plus de 50 % des activités protéolytiques. Elle constitue 5 à 6 % de l'ensemble des protéines solubles de l'hépatopancréas. Les extraits bruts de trypsine peuvent être différenciés en 4 ou 5 isoenzymes. La trypsine a été purifiée par gel filtration, par chromatographie d'affinité et par chromatographie d'échange d'ions. La trypsine purifiée montre 6 formes moléculaires, dont les poids moléculaires sont identiques et voisins de 25.000 daltons.

Un anticorps préparé contre un extrait purifié de trypsine montre que le site antigénique de ces différentes isoenzymes est le même pour chacune d'elles, ou au moins qu'il en est très voisin.

La leucine aminopeptidase montre 2 isoenzymes.

Deux carboxypeptidases A et B, de poids moléculaire 35.000 et une protéase de faible poids moléculaire, 11.000 daltons ont été mises en évidence.

Une collagénase a été mise en évidence.

Il n'existe pas d'activités élastasiques.

Malgré les taux d'activité et des propriétés comparables les principales enzymes sont représentées chez les différentes espèces de Péneïdes par des formes moléculaires différentes. Ce fait est mis en évidence par leurs profils électrophorétiques différents.

La trypsine de *P. japonicus* a été purifiée par gel filtration, chromatographie d'affinité et chromatographie d'échange d'ions. Six isoenzymes ont été mises en évidence. Elles ne forment qu'une seule bande en électrophorèse en milieu dissociant (SDS).

Les propriétés catalytiques de l'enzyme pure sont similaires à celles d'origine bovine à l'exception de la stabilité. L'enzyme de *P. japonicus* est en effet dénaturée dans les conditions optimales de stabilité de la trypsine bovine. Un immunosérum antitrypsine a été préparé par injection de 1,5 mg d'antigène chez le lapin.

La spécificité de l'immunosérum a été recherchée par différentes techniques (OUCHTERLONY, immuno électrophorèse en "rocket", transfert électrophorétique sur DEAE cellulose). Chaque isoenzyme réagit avec l'immunosérum.

2.2. Trypsine chez différentes espèces

Les trypsines extraites de plusieurs espèces de Crustacés ont des structures qui semblent être voisines dans la mesure où leurs sites antigéniques sont voisins. Les immunosérums obtenus à partir de la trypsine de *Penaeus japonicus* réagissent avec les extraits enzymatiques d'autres Crustacés étudiés. Les Péneïdes *Penaeus merguensis*, *P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. kerathurus*, montrent des réactions positives.

L'étude des relations croisées chez différentes espèces a montré que l'antisérum réagissait avec des extraits bruts des autres Péneïdes, à l'exception de *P. monodon*. Dans le cas d'autres crustacés, l'immunosérum réagit avec les extraits brut d'*Athyphaera* (Caridés) et *Eupagurus* (Anomoures). L'utilisation d'antigènes purifiés et concentrés a permis de montrer que la réaction croisée existait avec les trypsines de Copépodes. La concentration en antigène est donc un facteur limitant l'intensité de la réaction.

Une méthode de dosage immuno-chimique par "rocket" immunoélectrophorèse a été mise au point afin d'aborder les études globales (tous isoenzymes confondus), ceux-ci étant complémentaires des dosages d'activité, et aborder plus tard l'étude d'autres espèces.

2.3. Etude des protéases digestives au cours des cycles physiologiques.

L'évolution des activités des protéases au cours de la croissance montre une discontinuité vers 3 - 3,5 g. Cette variation pourrait être expliquée par un changement de régime alimentaire ou par l'apparition des caractères sexuels secondaires.

Au cours du cycle d'intermue, les activités des protéases digestives présentent deux maxima aux stades C₃C₄ et D₂D₃. Les mesures immunoquantitatives de la trypsine montrent que pour cette enzyme, les variations d'activités sont dues à des modifications de la quantité d'enzymes présentes.

L'influence des facteurs du milieu a été étudiée.

L'augmentation d'activité de la trypsine quand la température augmente est expliquée par des modifications des constantes cinétiques, en particulier une augmentation de l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

Pour la leucine amino-peptidase, on observe le renforcement d'une isoenzyme par rapport à l'autre quand la température s'élève.

Les variations de la salinité ne modifient ni les activités, ni les quantités de trypsine, ni les spectres électrophorétiques des différentes protéases.

3. ACTION DE LA TEMPERATURE SUR L'ACTIVITE TRYPSIQUE

L'effet de la température sur l'activité trypsique a été mesuré sur l'enzyme purifiée à partir d'animaux acclimatés à 17°C et 29°C. Les résultats sont présentés à la figure 1. La courbe d'évolution de l'activité trypsique mesurée en relation avec le température présente un profil similaire dans les deux cas avec un optimum proche de 50°C.

L'activité de la trypsine purifiée a été également mesurée à 20°C après incubation pendant 15 mn à différentes températures. Les résultats sont similaires pour les trypsines d'animaux acclimatés aux deux températures (voir Fig. 2). L'enzyme présente en effet dans les deux cas une perte irréversible de l'activité entre 40°C et 50°C.

3.1. Variation de l'activité enzymatique en fonction de la température d'acclimatation

Le tableau I représente les variations du poids de l'hépatopancréas par rapport au poids total de l'animal et les variations de la concentration en protéines solubles de l'hépatopancréas en fonction de la température d'acclimatation.

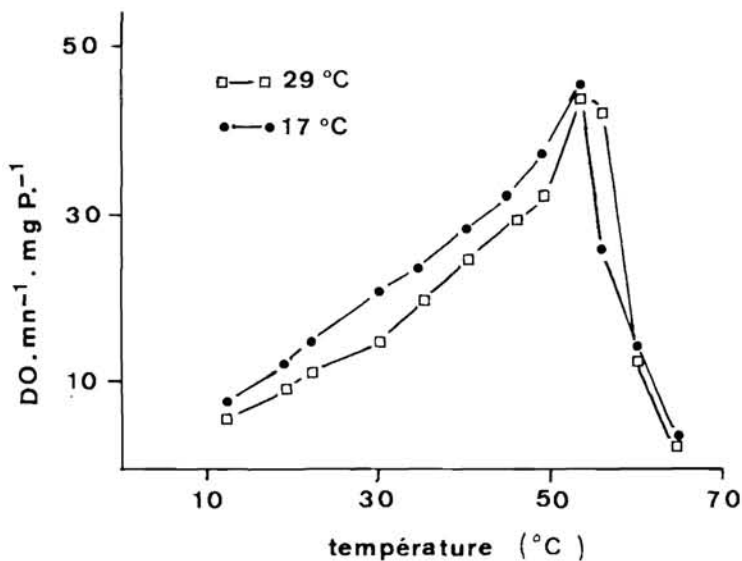


Figure 1 : Action directe de la température sur l'activité de la trypsine de Penaeus japonicus purifiée chez des animaux acclimatés à 17°C (●—●) et 29°C (□—□)

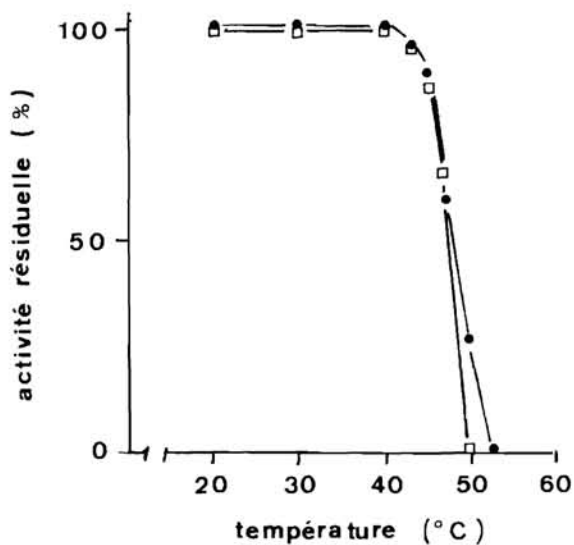


Figure 2 : Stabilité de la trypsine de Penaeus japonicus à la température. L'enzyme, purifiée chez des animaux acclimatés à 17°C (●—●) et 29°C (□—□), est incubée pendant 15 mn à différentes températures avant la mesure d'activité réalisée à 20°C.

Tableau I : Variations du poids de l'hépatopancréas et des protéines solubles en fonction de la température d'acclimatation

Températures	17°C	21°C	25°C	29°C
Poids hépatopancréas	0,034±0,0018	0,034±0,0038	0,032±0,0025	0,034±0,0021
Poids frais total				
Protéines solubles	11,12±1,41	11,11±1,86	10,57±1,02	11,23±1,22

Aucune variation importante n'est observée quand la température d'acclimatation des animaux varie.

Les activités spécifiques de la protéolyse globale, de la trypsine, de la leucine aminopeptidase et des carboxypeptidases A et B ont été mesurées sur les extraits d'hépatopancréas des crevettes acclimatées aux quatre différentes températures. Pour toutes les enzymes étudiées, on observe une augmentation de l'activité spécifique liée à une augmentation de la température. Les valeurs de Q_{10} calculées à partir des résultats présentés à la figure 3 sont 1,28 pour l'activité protéolytique globale, 1,71 pour l'activité trypsique, 2,18 pour l'activité de la leucine aminopeptidase et respectivement 2,49 et 2,41 pour les activités des carboxypeptidases A et B. Inversement, les quantités de trypsine de l'hépatopancréas, exprimées en pourcentage des protéines solubles ne varient pas au cours de l'acclimatation thermique.

3.2. Modifications des paramètres cinétiques de la trypsine

Les variations d'activité trypsique n'étant pas liées à des changements de la concentration d'enzyme, nous avons recherché des modifications des paramètres cinétiques de l'enzyme. Les résultats, présentés à la figure 4, montrent que l'affinité de l'enzyme pour son substrat est maximale (K_m minimal) pour une température proche de la température d'acclimatation. Par ailleurs, la valeur minimale de K_m de la trypsine des animaux acclimatés à 29°C est inférieure à la valeur minimale du K_m de la trypsine d'animaux élevés à 17°C. Les énergies d'activation ont des valeurs de 7,61 Kcal moles⁻¹ et 9,46 Kcal moles⁻¹ pour les trypsines de crevettes respectivement élevés à 17°C et 29°C. Ces valeurs ne sont pas significativement différentes ($\alpha = 0,05$).

3.3. Etude électrophorétique des protéases au cours de l'acclimatation thermique

Les résultats obtenus par électrophorèse montrent qu'il n'y a pas de différence entre les profils électrophorétiques des protéines solubles, de la trypsine et de la carboxypeptidase A des animaux respectivement acclimatés à 17° et 29°C. Pour la leucine aminopeptidase, la première isoenzyme est quantitativement plus importante que la deuxième (fig. 5) pour des animaux élevés à 17°C.

3.4. Discussion

Le choix de la durée d'acclimatation est basé sur les résultats obtenus par plusieurs auteurs (Haschenmeyer, 1969 ; Dall, 1975 ; Van Wormhoudt, 1980) pour lesquels une période d'acclimatation de trois semaines paraît suffisante pour un retour des fonctions physiologiques à un état stable.

L'évolution des activités enzymatiques au cours de l'acclimatation thermique et les valeurs de Q_{10} observées permettent de penser que la compensation métabolique est partielle (Prosser, 1974). Dans le cas de la trypsine, la température n'affectant pas le renouvellement de l'enzyme, la compensation métabolique n'est pas due à une

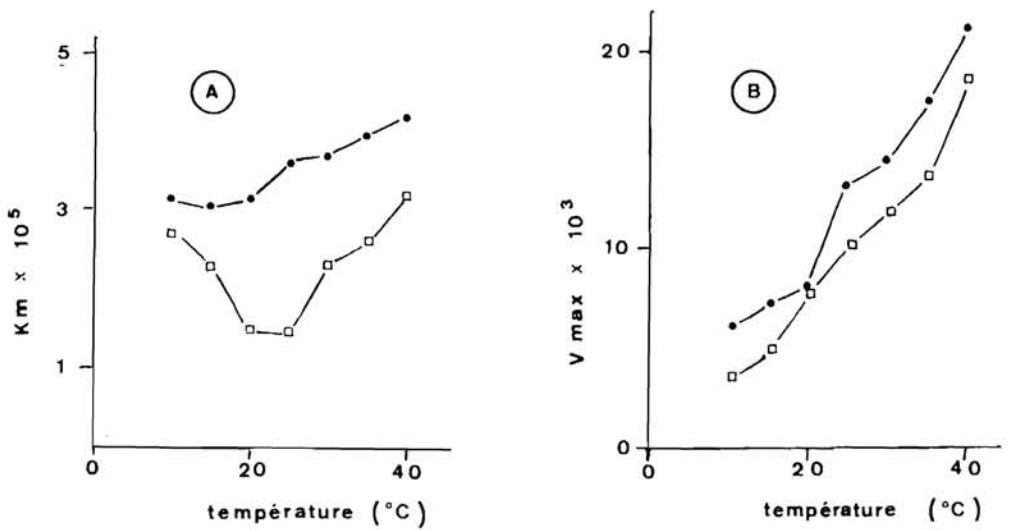


Figure 4 : Variation des paramètres cinétiques de la trypsine purifiée à partir des crevettes *Penaeus japonicus* acclimatées à 17°C (●—●) et 29°C (□—□).

(A) constante d'affinité apparente (K_m)

(B) vitesse maximale d'hydrolyse du substrat (V_{max})

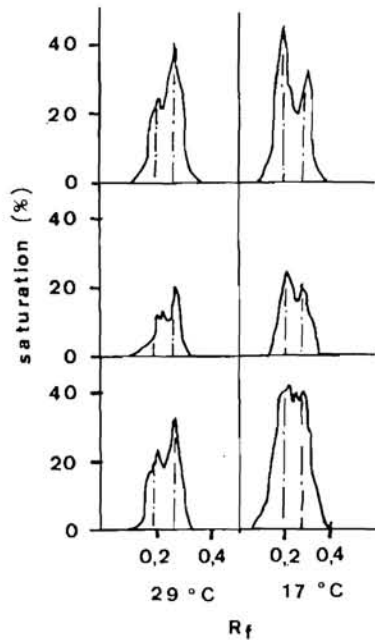


Figure 5 : Etude des isoenzymes de la leucine aminopeptidase de *Penaeus japonicus* en fonction de la température d'acclimatation. Enregistrements densitométriques (densitomètre VERNON) des gels après électrophorèse et révélation spécifique de l'enzyme

modification de la concentration de trypsine comme cela a été démontré pour d'autres enzymes (Haschenmeyer et Persell, 1973) mais le fait d'un changement des propriétés catalytiques de l'enzyme. Des résultats antérieurs ont montré que les modifications de la capacité catalytique peuvent être le fait de formes enzymatiques multiples (Baldwin et Hochachka, 1970 ; Somero, 1975) ou de variations conformationnelles (Somero, 1969 ; Low et Somero, 1976). Dans le cas de *Penaeus japonicus* aucune modification du spectre isoenzymatique n'est observée. Bien que les trypsines d'animaux élevés à deux températures différentes présentent les mêmes propriétés pour la stabilité, des modifications de structure tertiaire de l'enzyme pourraient expliquer les variations des paramètres cinétiques.

L'affinité maximale de l'enzyme correspond à une température proche de la température d'acclimatation des animaux. Ce résultat est identique à ceux obtenus pour la trypsine et la chymotrypsine de l'actinie *Actinia equina* (Van Praet, 1982), pour l'amylase de *Palaemon serratus* (Van Wormhoudt, 1980) et pour la lactico-déshydrogénase de *Palaemon serratus* (Thébault et al., 1980) et de la truite *Salmo gairdneri* (Hochachka et Somero, 1968)..

Les résultats obtenus pour les énergies d'activation sont en accord avec ceux de Hochachka et Somero (1971) pour lesquels il n'y a pas de relation entre les énergies d'activation des enzymes et la température d'acclimatation des animaux.

Pour la leucine aminopeptidase, les mécanismes de compensation de l'activité enzymatique semblent liés au taux de synthèse différentiel des isoenzymes. Ce résultat est proche de celui obtenu par Guerin et Kerambrun (1982) pour la leucine amino-peptidase de l'annélide *Scololepsis fuliginosa*. Des mesures des paramètres cinétiques de chaque isoenzyme permettraient peut-être de mettre en évidence l'existence d'isoenzyme "froide" ou "chaude" comme cela a été décrit pour les pyruvate-kinases de plusieurs espèces (Low et Somero, 1976).

4. ACTION DE LA SALINITE SUR L'ACTIVITE TRYPSIQUE

Peu de travaux décrivent l'influence de la salinité du milieu ambiant sur les activités enzymatiques des crustacés. Emerson (1967) a montré que les activités spécifiques de la glutamate déshydrogénase, la glutamate pyruvate transaminase et la glutamate oxaloacétate transaminase de *Artemia salina* ne suivaient pas les variations de salinité du milieu ambiant. Plus récemment, Hand et Conte (1982) ont montré que l'activité spécifique et la quantité de malate déshydrogénase de la même espèce augmentaient quand la salinité augmentait.

Le présent travail concerne les variations des activités protéasiques, des quantités de trypsine et des profils électrophorétiques des protéases en fonction de la salinité du milieu ambiant.

Quatre lots de 8 animaux sont acclimatés à différentes salinités (19, 25, 31 et 37 ‰). L'adaptation est réalisée sur une période de 4 j, par addition d'eau douce courante préalablement déchlorée par bullage (24h). Les salinités sont contrôlées à l'aide d'un réfractomètre. La durée de l'expérience est de 20 j. Les quantités de trypsine sont mesurées par immunoelectrophorèse quantitative.

Les variations du poids frais de l'hépatopancreas par rapport au poids frais total des animaux et les concentrations des protéines solubles de l'hépatopancreas ont été étudiées en fonction de quatre salinités. Les résultats sont représentés dans le Tableau II.

Tableau II : Variations du poids de l'hépatopancréas et des protéines solubles en fonction de la salinité.

Salinité (en p.1000)	19	25	31	37
Poids hépatopancréas	0,035±0,0025	0,035±0,0026	0,036±0,0040	0,037±0,0044
Poids frais total				
Protéines solubles	9,79±1,16	10,95±1,19	10,86±1,08	12,78±1,24

On observe une baisse de la concentration des protéines solubles de l'hépatopancréas pour des faibles salinités.

Ce résultat est identique à celui obtenu pour *Artemia salina* (Conte *et al.*, 1973).

Les activités protéolytiques globales, trypsiques, leucine aminopeptidasiques et carboxypeptidasiques, mesurées sur des extraits d'animaux élevés à quatre salinités différentes, ne présentent pas de variation. Parallèlement, la quantité de trypsine, exprimée en pourcentage des protéines solubles, reste constante (fig. 6).

Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de modification importante des profils électrophorétiques des protéines solubles, de la trypsine, de la leucine aminopeptidase et de la carboxypeptidase A quand la salinité du milieu varie.

5. L' α -AMYLASE CHEZ *Palaemon serratus*

5.1. Propriétés

L' α -amylase a été purifiée à partir de l'hépatopancréas par chromatographie sur une colonne d'amidon réticulé. L' α -amylase se présente sous la forme de 3 isoenzymes dont l'une α -2 est largement dominante et représente 90% de l'activité de l'enzyme. La composition en acides aminés de l' α -amylase purifiée est comparable à celle de l' α -amylase de mammifère, mais elle est légèrement déficiente en acides aminés soufrés, la cystéine en particulier.

Un anticorps anti α -amylase de *Palaemon serratus* a été préparé chez le lapin mâle de race New Zealand, avec l'adjuvant complet de Freund, après 3 rappels. Ses réactions sont nulles avec l' α -amylase de bactérie ou de porc. Elles sont très faibles avec celles de l'écrevisse *Astacus leptodactylus*, du homard *Homarus gammarus* du crabe *Cancer pagurus*.

5.2. Localisation

La localisation de l' α -amylase a été réalisée également par la méthode de la peroxydase-antiperoxydase dans les cellules des tubules de l'hépatopancréas. L' α -amylase se présente au microscope optique sous forme de granules. Elle est localisée dans les 3 types de cellules différenciées : fibrillaire, absorbantes et sécrétrices, alors qu'elle est absente dans les cellules embryonnaires. Les granules sont généralement localisés dans le cytoplasme, bien qu'il en existe aussi dans les vacuoles.

5.3. Rôle des facteurs du milieu

L'activité de l' α -amylase dépend, surtout *in vitro*, de la teneur en Na Cl qui entraîne des changements de propriétés de l'enzyme modifiant les valeurs de la

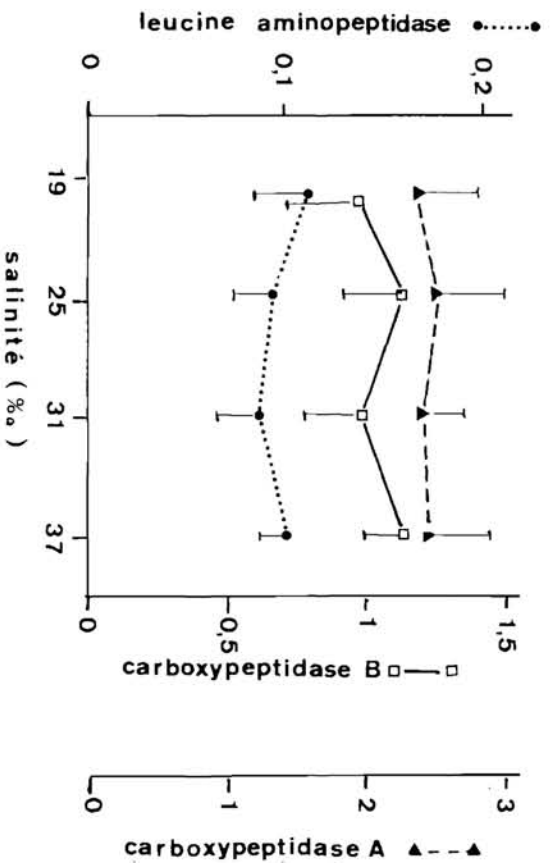
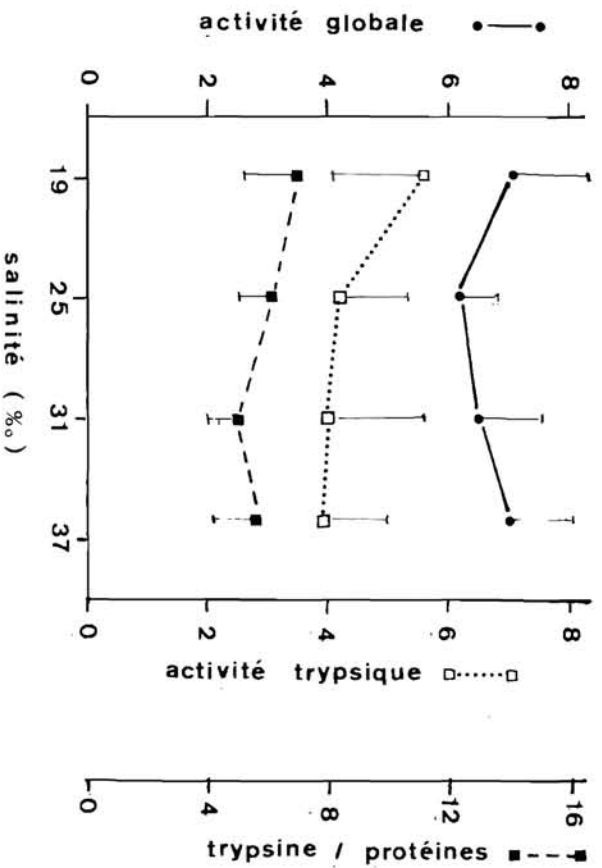


Figure 6 : Activités spécifiques des protéases digestives de Penaeus japonicus acclimatées à différentes salinités .
Les résultats sont des valeurs moyennes ($\bar{x} \pm t Sm, \alpha = 0,05$) obtenues sur 8 animaux

constante de Michaelis.

Par ailleurs, l'affinité de l'enzyme pour son substrat est maximal à une température de mesure voisine de la température d'adaptation.

La température du milieu agit non seulement sur les propriétés cinétiques de l' α -amylase mais également en compensant partiellement l'augmentation de la synthèse des protéines lors de l'adaptation au chaud.

Le facteur trophique est responsable de l'induction de la synthèse des enzymes chez les larves. D'autre part, chez les adultes, l'activité des amylases et des protéases est modulée par le régime alimentaire. Elle est maximale pour une teneur en amidon du régime de 2,5 %, et une teneur en protéines de 45 % (voir Tableau III).

Tableau III : Variation de l'activité spécifique de protéases (a) et des amylases(b) en fonction du pourcentage de protéines et de glucides consommables de l'alimentation chez *Palaemon serratus*.

% protéines (a)	0,25	6,5	25,8	36	45	53-56	63
Protéases spécifiques	1,7 ± 0,3	2,6 ± 0,2	2,8 ± 0,4	3,5 ± 0,7	3,9 ± 0,6	2,5 ± 0,5	2,5 ± 0,5

% glucides consommables (b)	0,1	0,3	0,6	2,8	5,6	9,4	10,5	20,5	51,6	80
Amylases spécifiques	3,2 ± 0,9	3,8 ± 0,6	4,8 ± 0,4	5,4 ± 1,4	5,2 ± 0,7	4,6 ± 0,5	4,3 ± 0,6	3,9 ± 0,6	4,1 ± 1,7	2,3 ± 0,7

Les expériences sont réalisées sur des juvéniles de 1 cm pêchés au mois de mai à Concarneau. Elles durent 3 semaines à 17°C.

5.4. Rythme circadien d'activité enzymatique

Chez les larves du stade 1 qui ne se nourrissent pas, il n'y a pas de rythme circadien de variation des enzymes digestives. Par contre, au stade zoé 4, le rythme possède les mêmes caractéristiques que celles décelées chez l'adulte. Les variations d'amplitude sont importantes (30 - 40 %). Ces dernières sont encore plus fortes au stade post-larvaire et juvénile (70 % environ). Le rythme est à tendance générale diphasique.

5.5. Contrôle hormonal des synthèses enzymatiques

Trois approches ont été envisagées pour mettre en évidence le contrôle hormonal. D'une part l'ablation de glandes endocrines, d'autre part la mesure de certaines

hormones peptidiques par immunocytochimie.

Chez les larves, seule l'ablation des pédoncules oculaires a pu être réalisée : à partir des derniers stades zoés il y a inhibition de l'activité spécifique des amylases. Les protéases semblent moins affectées. L'existence d'un facteur stimulateur de la synthèse des amylases est donc probable chez les larves de stade 7. Des expériences d'injection et de purification sont nécessaires pour confirmer ce résultat.

Une mesure du taux des ecdystéroïdes a été effectuée dans les pédoncules oculaires et dans le reste du corps. Ce taux est très élevé au stade zoé 1 et diminue fortement par la suite. Par contre, la concentration augmente dans le reste du corps (tableau IV).

La localisation de l'hormone hyperglycémiant par immunocytochimie a pu être réalisée dans la glande du sinus et de quelques cellules neuroendocrines dès le stade zoé 4.

Tableau IV : Variation de la concentration en ecdystéroïde dans les pédoncules oculaires au cours du développement larvaire de *Palaemon serratus*

* Valeur variable au cours du cycle d'intermue, 180 pg/mg poids sec représentant la valeur optimale obtenue en fin de prémue (Van Wormhoudt, 1980). La spécificité de l'antisérum utilisé est de 100 % pour l'ecdysone ou l'ecdystérone ; 52 % pour l'inokostérone, 2 % pour la makistérone et très faible pour les autres ecdystéroïdes.

nd = non déterminé.

Stades larvaires	pg/mg poids sec	
	Pédoncules oculaires	Reste du corps
Zoé 1	450	475
Zoé 4	134	208
Zoé 5	34	85
Post-larves	14	50
Adulte	0 - 180 *	nd

5.6. Variations au cours du cycle d'intermue

Au cours de l'année, les variations observées au cours du cycle d'intermue sont les plus marquées durant les mois de fin de printemps et les mois d'été. L'activité des enzymes digestives présente alors deux maximums, l'un au stade B₂ - C et l'autre au stade D₁" - D₂. Ces maximums dépendent des facteurs trophiques et des facteurs hormonaux décrits en 5.3., 5.4. et 5.5., qui sont eux-mêmes sous le contrôle des facteurs du milieu. Au niveau cellulaire, une séquence des événements a pu être établie entre la teneur en ADN, en ARN et en protéines au niveau du cytoplasme

et du noyau.

6. ENZYMES DIGESTIVES CHEZ *Homarus gammarus*

Six aliments composés, présentés sous forme de granulés secs, et contenant différents taux de protéines (farines de poissons et de crustacés, gluten de blé) : de 21,8 à 45,5 %, sont testés sur six lots de 100 homards juvéniles, ayant atteint le stade VIII, et élevés individuellement.

Les meilleures croissances, pondérale et linéaire, sont obtenues avec un régime contenant au moins 35 % de protéines. La teneur en ADN et le rapport poids frais/ADN montrent que les animaux nourris avec l'aliment contenant 36,6 % de protéine, ont la meilleure croissance au niveau cellulaire, due plus à l'hyperplasie qu'à l'hypertrophie. La teneur en ARN et en protéines totales de l'individu entier confirment ces résultats. Le rapport ARN/ADN, qui est un indice de l'activité cellulaire, est meilleur pour ce lot : 2,1 après 146 jours.

Les mesures effectuées sur l'hépatopancréas, et en particulier les activités spécifiques des protéases et des amylases digestives aboutissent aux mêmes conclusions.

Au cours de cette expérience une relation inverse entre la décoloration des homards et la teneur en protéines du régime alimentaire a pu être observée.

7. CONCLUSION

L'ensemble des résultats obtenus chez les Pénéides concernant l'influence des facteurs externes sur les activités protéasiques montre que :

- l'activité d'une enzyme n'est pas nécessairement liée à la quantité d'enzyme. Elle fait intervenir des mécanismes de régulation qui peuvent être différents des changements de concentration.

- les mécanismes de régulation sont propres à chaque activité enzymatique. Ainsi, pour l'action de la température, la régulation de l'activité trypsique s'effectue par des modifications des capacités catalytiques de l'enzyme alors que la régulation de l'activité leucine aminopeptidasique semble s'effectuer par des changements quantitatifs d'isoenzymes.

- la salinité ne semble pas affecter spécifiquement les activités protéasiques digestives mais l'ensemble des protéines solubles.

Ces résultats montrent que les facteurs externes n'affectent pas tous les protéases digestives. L'étude d'autres facteurs externes tels que l'intensité lumineuse du milieu, la photophase et surtout l'alimentation doit apporter des renseignements complémentaires concernant les mécanismes de régulation intervenant dans la digestion des protéines (Ceccaldi, 1982).

REMERCIEMENTS : Cette étude a été réalisée dans le cadre du contrat de l'ATP mixte CNRS-CNEXO Bases biologiques de l'aquaculture 82/2773.

Nous tenons à remercier le CNRS et le CNEXO pour leur aide matérielle dans la réalisation de ces travaux.

- BALDWIN J. et HOCHACHKA W. 1970 - Functional significance of isoenzymes in thermal acclimatation : acetyl cholinesterase from trout brain. *Biochem. J.* 244, p. 4480-4489.
- CECCALDI H.J. 1982 - Contribution of physiology and biochemistry to progress in aquaculture. *Bull. Japan. Soc. Fish.* 48 (8), p. 1011-1028.
- CONTE F. , PETERSON G. et EWING R. 1973 - Larval salt gland of *Artemia salina* nauplii : regulation of protein synthesis by environmental salinity. *J. Comp. Physiol.*, 82, p. 277-289.
- DALL W. 1975 - Indices of nutritional state in the western rock lobster *Palinurus longipes* (Milne edwards). II : Gastric fluid constituents. *J. exp. Mar. Biol. Ecol.*, 18, p. 1 - 18.
- EMERSON D.N. 1967 - Some aspect of free aminoacid metabolism in developing encysted embryos of *Artemia salina* the brine shrimp. *Comp. Biochem. Physiol.*, 20, p. 245-261.
- GUERIN J.P. et KERAMBRUN P. 1982 - Effet à court et moyen terme de chocs thermiques et influence de la cinétique de décroissance de la température consécutive au choc sur l'activité de la leucine aminopeptidase chez *Scololepis fuliginosa* Clarapède (Annelida, Polychaeta). *J. exp. Mar. Biol. Ecol.*, 64, p. 271-286.
- HAND S. et CONTE F. 1982 - Larval brine shrimp malate deshydrogenase biosynthesis and temporal pattern related to environmental salinity. *J. exp. Zool.*, 219, p. 17-27.
- HASCHENMEYER A. 1969 - Studies on the control of protein synthesis in low temperature acclimatation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 28, p. 535-552.
- HASCHENMEYER A. et PERSELL R. 1973 - Kinetic studies on aminoacid uptake and protein synthesis in liver of temperature acclimated toadfish. *Biol. Bull.* 145, p. 472-481.
- HOCHACHKA P. et SOMERO G. 1968 - The adaptation of enzymes to temperature *Comp. Biochem. Physiol.*, 27, p. 659-668.
- HOCHACHKA P. et SOMERO G. 1971 . Biochemical adaptation to the environment. *Fish physiology*, vol 6, Acad. press. N.Y.
- LOW P. et SOMERO G. 1976 - Adaptation of muscle pyruvate kinase to environmental temperatures and pressures. *J. exp. Zool.*, 198, p. 1-12.
- LUCIEN-BRUN H., Van WORMHOUDT A., LACHAUX A. et CECCALDI H.J. (1984). Effets de régimes composés sur la croissance de homards juvéniles *Homarus gammarus* L; estimation biochimique de la composition optimale du régime alimentaire en protéines. *Aquaculture* (sous presse)
- PROSSER C. 1974 - Température. *Comparative Animal Physiology*, IIIrd ed., SAUNDERS, Philadelphia, p. 362-428.
- SOMERO G. 1969 - Pyruvate kinase variants of the alaskan king crab. *Biochem. J.*, 114, p. 237-241.
- THEBAULT M:T., BERNICARD A. et Le GAL Y. 1980 - Effect of acclimatation temperature on lactate deshydrogenase activity in *Palaemon serratus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 65 (B), p. 357-361.
- Van PRAET 1982 - Amylase and trypsin - and chymotrypsin - like proteases from *Actinia equina* L.; their role in the nutrition of the sea anemone. *Comp. Biochem. Physiol.*, 72 (A), p. 523-528.
- Van WORMHOUDT A. 1980 - Adaptations des activités digestives, de leurs cycles et de leur contrôle, aux facteurs du milieu chez *Palaemon serratus* (Crustacea Decapoda Natantia). Thèse, université Aix-Marseille II, 351 pages.