

PROBLEMES DE MORPHOGENESE CUTICULAIRE CHEZ LES CRUSTACES

BOULIGAND Y.

RESUME - Le tégument des Crustacés est un excellent modèle pour la morphogenèse cuticulaire, aux divers niveaux d'organisation. A l'échelle supramoléculaire, les sous-unités chitino-protéiques s'assemblent selon une organisation spécifique de type cristal liquide stabilisé. A l'échelle des cellules et des populations cellulaires, interviennent divers contrôles, celui de l'architecture fine de l'épicuticule, celui de la distribution du minéral et celui des caractères globaux tels que les isométries et les allométries de croissance.

MOTS CLES - Métrique de la cuticule, Listes de priorité, Cristaux liquides stabilisés, Minéralisation, Artéfacts.

ABSTRACT - The crustacean integument is an excellent model for the study of cuticular morphogenesis, at different organization levels. At the supermolecular level, subunits of chitin and protein assemble and show the organization of a stabilized liquid crystal. At higher levels corresponding to cells and cells populations, several controls are involved in the fine architecture of the epicuticle, in the mineral distribution and in characters which concern the whole animal, such as isometric or allometric growth.

KEY WORDS - Cuticle metrics, Priority lists, Stabilized liquid crystals, Mineralization, Artifacts.

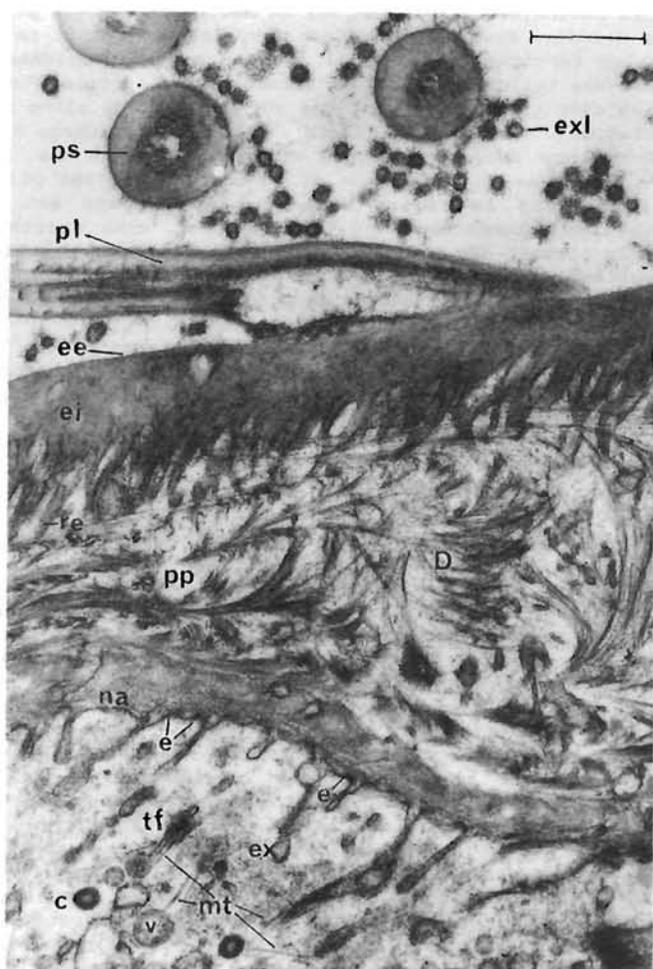
INTRODUCTION - Les progrès en morphogenèse depuis une dizaine d'années doivent beaucoup à la renaissance de la génétique de la Drosophile et, en particulier, à la découverte de gènes impliqués dans la segmentation et dans la différenciation des métamères (Revue dans Spierer et Goldschmidt-Clermont, 1985, ainsi que dans Gehring, 1987). Les caractères étudiés sont repérables dans la morphologie externe et comportent une part importante de leur expression au niveau cuticulaire. Il faut donc s'attendre à un renouvellement de nos connaissances sur la cuticule des Arthropodes au cours de la prochaine décennie. Les Crustacés tiendront une place originale au sein de ce courant et il convient de faire le point des problèmes de morphogenèse cuticulaire tels qu'ils se posent aujourd'hui. Nous les examinerons à divers niveaux d'organisation, en soulignant les principaux écueils à surmonter, notamment les variations insoupçonnées de l'épiderme et des structures cuticulaires, ainsi que les artéfacts.

Laboratoire d'Histophysique et de Cytophysique de l'E.P.H.E.,
Centre de Biologie Cellulaire du C.N.R.S.,
67, rue Maurice-Günsbourg, 94200 Ivry-sur-Seine (F.)

MORPHOLOGIE GENERALE - Chez les Crustacés Décapodes, après le développement larvaire, les jeunes accèdent à leur forme presque définitive, en dépit de certaines allométries très sensibles, comme l'écart relatif des yeux plus prononcé en début de croissance. Pour d'autres régions cependant, il y a presque similitude. Le crabe qui se défait d'une ancienne carapace en a élaboré une nouvelle de forme presque identique, la différence portant principalement sur la taille. Avant la mue, les cellules épidermiques se divisent et leur effectif est pratiquement doublé. Cette "crise mitotique" s'accompagne d'un décollement entre l'ancienne cuticule et l'épiderme; celui-ci se plisse et produit une nouvelle cuticule souple et plus étendue. La cytologie de l'épiderme qui sécrète cette nouvelle cuticule est d'autant plus complexe, que vient se surajouter à l'activité de synthèse du système chitinoprotéique, la production, avant la mue, de particules chargées de la résorption de l'ancienne cuticule. Nous appelons "exolysomes" ces corpuscules extracellulaires qui permettent la lyse plus ou moins prononcée des matrices extracellulaires. Dans le cas qui nous intéresse, ces particules comportent probablement des chitinases et des enzymes protéolytiques et ont l'allure de minuscules liposomes de 120 nm de diamètre environ, à une seule bicouche. Leur production paraît assurée par certaines cellules épidermiques. Quelques micrographies illustrent les principes de ce renouvellement cuticulaire (Fig. 1 et 2).

Lors de l'exuviation, le crabe absorbe une grande quantité d'eau qui passe dans la cavité générale et gonfle le corps, en dépliant progressivement la jeune cuticule; ceci aide aussi à rejeter l'ancienne carapace. La minéralisation commence quand le dépliement est achevé (Drach, 1939). Le gonflement hydrique ne produit aucune extension de la cuticule nouvellement élaborée, parce que les forces mises en jeu sont loin d'atteindre le seuil à partir duquel une telle extension serait possible. La carapace a donc été sécrétée sous forme plissée, en ayant d'emblée sa forme définitive, aux plis près. Les crabes savent se préparer un habit plus grand sous un vêtement ancien, devenu trop petit, et donnent ainsi une illustration des talents de géomètre de leurs cellules épidermiques. La sécrétion d'une cuticule à l'état plissé, avec la métrique correcte, n'est pas un mince problème.

Figure 1 - Coupe de cuticule de *Carcinus maenas* en cours de renouvellement (D2). Un spécimen de 1,2 cm de large au niveau du céphalothorax est examiné dans sa région sub-branchiale latérale. La couche pigmentaire (pp) est en cours de sécrétion. Des pinnules sont observées en section (ps) ou en vue longitudinale (pl). Le liquide exuvial renferme des exolysomes (exl). L'épicuticule comporte deux couches, l'une externe très mince (ee) et l'autre interne (ei), plus épaisse et munie de racines (re) s'enfonçant plus ou moins dans l'épaisseur de la procuticule. Les strates de la cuticule pigmentaire présentent une zone de forte distorsion D. A la base de la procuticule, on observe un niveau d'assemblage des fibrilles (na). Le cytoplasme épidermique renferme divers corpuscules et vésicules (c et v), des épaisissements (e) de la membrane plasmique, des configurations d'exocytose (ex), des microtubules (mt) et leur regroupement en tonofibrilles (tf). Un paysage cytologique très différent est observé lors de la sécrétion de la couche principale. Fixation: glutaraldéhyde, acide osmique; contraste: acide phospho-tungstique; barre: 1µm. La préparation du matériel est la même dans les deux planches suivantes (Fig. 2 et 4).



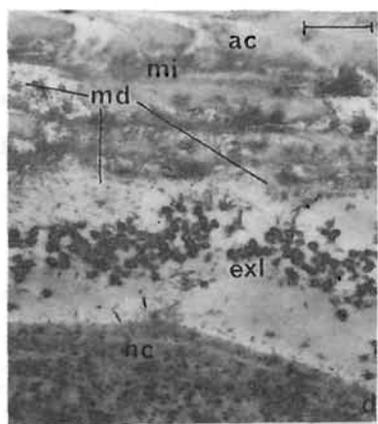
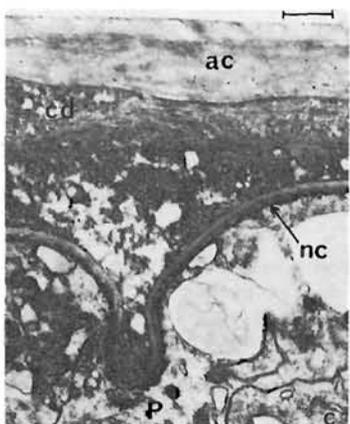
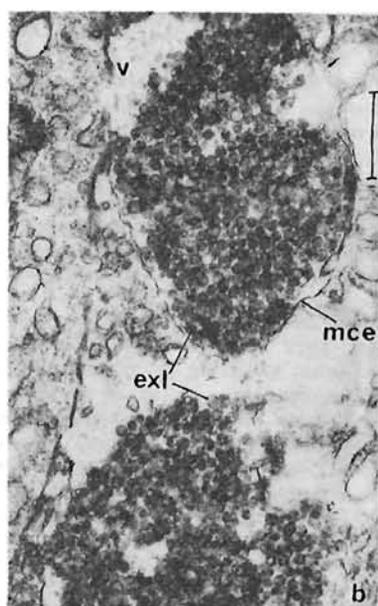
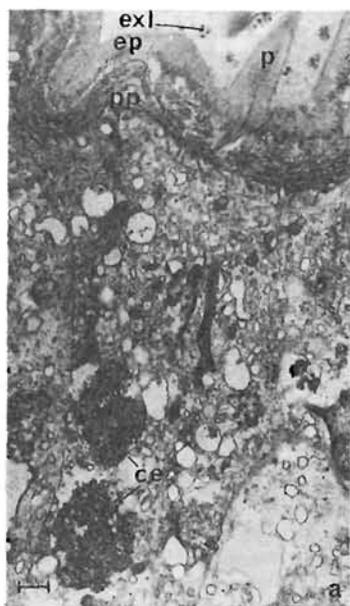
Imaginons deux feuilles de papier, l'une ordinaire, s'appliquant sur un plan, et l'autre de même matière et même épaisseur, que l'on aurait obtenue (par un procédé peu usuel) sur un moule sphérique. Si nous chiffonnons ces deux feuilles, rien de leur aspect ne les distingue plus. Au contraire, si nous les déplissons, l'une d'elles s'applique sur un plan et non l'autre, parce que les deux feuilles ont conservé leur métrique.

De même, une carapace de crabe présente des régions relativement planes et d'autres qui ne sont pas applicables sur le plan. Quand la nouvelle carapace se déplisse au cours de la mue, elle conserve sa métrique. Par conséquent, la cuticule est sécrétée sur un moule épidermique plissé, avec une métrique définie. Pour revenir à nos feuilles de papier, on aurait pu imaginer de les fabriquer elles-aussi sur des moules complexes figurant des plis. Dans une telle situation, il serait très difficile d'obtenir des papiers qui se développent sans problème sur une surface plane ou sur une surface sphérique. C'est pourtant ce que sait faire l'épiderme d'un crabe, lorsqu'il sécrète une nouvelle carapace en prévision de la mue. Les choses peuvent être examinées au microscope et on constate que les plis ne sont pas aléatoires. Dans la région dorsale, la carapace est ornée de nombreuses petites intumescences ou tubercules et, chez *Carcinus maenas* par exemple, la plupart des plis sont orientés en formant des lignes plus ou moins concentriques autour des axes des tubercules. Entre les tubercules eux-mêmes, la distribution de plis paraît souvent aléatoire.

Chez les Insectes, des plis analogues existent, notamment chez la punaise *Rhodnius prolixus*. Ils sont visibles au microscope avant le repas de sang et disparaissent avec la réplétion. Leur distribution est pratiquement aléatoire et c'est dans l'état plissé que la cuticule est sécrétée (Wigglesworth, 1945). Au contraire, lorsqu'on observe l'éclosion d'un papillon, les ailes sont très finement plissées selon un ordre régulier, avec des plis équidistants se recoupant souvent à angle droit.

Le problème posé est de comprendre comment la métrique de la cuticule est maintenue à travers ce processus de croissance par mue, qui exige un plissement de l'épiderme, selon des orientations aléatoires ou non. L'exemple des crabes est utile, parce que l'on observe facilement dans l'ancienne et la nouvelle carapaces les traces des limites des cellules épidermiques qui les ont sécrétées. On peut comparer des régions homologues de l'ancienne et de la nouvelle cuticule, mais la mise en correspondance précise des cellules-mères et cellules-filles est souvent

Figure 2 - Quelques aspects des processus d'exolyse. Spécimens et préparation comme dans la Fig.1. a) Le liquide exuvial renferme des exolysomes (exl) et, sous l'épicuticule (ep) avec ses pinnules (p) et la couche pigmentaire (pp), certaines cellules épidermiques renferment des corps à exolysomes ou supposés tels (ce). b) Grandissement plus élevé des deux corps à exolysomes (exl) de la figure précédente et la membrane enfermant ces corps (mce). c) Espace exuvial entre l'ancienne et la nouvelle cuticule (ac, nc) de la partie latérale de la cavité branchiale. La cuticule dilacérée (cd) forme une masse importante et on observe un pli P de la nouvelle cuticule encore très mince. d) Espace exuvial dans la région sub-branchiale, entre l'ancienne cuticule (ac) et la nouvelle (nc). Les exolysomes (exl) en présence de la couche membraneuse intacte (mi) ou dilacérée (md). Chaque barre correspond à un μm .



difficile ou même impossible et il faudra trouver des marqueurs cellulaires. Dans l'épiderme, qui est un épithélium simple à cellules presque isodiamétriques, il suffit, pour que la métrique de la cuticule soit conservée d'un stade au suivant, que la distribution des fuseaux mitotiques soit isotrope dans le plan même de l'épiderme. L'orientation d'un fuseau s'identifie à celle du segment qui joint les centres de deux cellules soeurs. On repère parfois assez bien les couples de cellules issus d'une même cellule mère. L'examen comparé des mosaïques cellulaires de l'épiderme devrait, grâce aux traces laissées dans les cuticules successives, permettre d'analyser l'origine des allométries. Plusieurs facteurs peuvent être impliqués et, en particulier, la perte de l'isodiamétrie des cellules et l'anisotropie de distribution des fuseaux mitotiques, mais rien n'est encore démontré. Les méthodes automatiques d'analyse des textures et des réseaux seront de précieux auxiliaires dans l'étude des mécanismes de l'isométrie ou de l'allométrie et des comportements des populations cellulaires qui en sont à l'origine.

MORPHOLOGIE DE SURFACE - Le dépôt de l'épicuticule intervient juste après l'apolyse, lors des premières étapes de la phase D chez les Crustacés, et coïncide avec la mise en place de la morphologie. Il y a maintien de certaines structures du stade précédent, à l'échelle près, avec parfois introduction de nouveautés importantes ou, au contraire, disparition de structures antérieures. Il faut souligner que c'est la mince couche de surface de l'épicuticule qui est la première dépositaire de la morphologie externe. Les principaux caractères différenciés à ce niveau concernent la segmentation du corps et celle des appendices, la distribution des soies et l'élaboration des structures ornementales de surface, examinées notamment par Bocquet et al. (1976) et par Renaud (1977). Cette couche externe de l'épicuticule est élaborée initialement sous forme de plaques qui deviennent rapidement jointives. Ces plaques apparaissent au sommet de replis ou de microvillosités de la membrane plasmique externe des cellules épidermiques. La membrane présente un épaississement assez semblable à un hémidesmosome sous chaque plaque épicuticulaire en différenciation (Bazin, 1977). L'intervention du cytosquelette est manifeste dans cette initiation de la morphogenèse cuticulaire et mérite une étude immunocytochimique, aussi bien à l'échelle ultrastructurale qu'à celle de la microscopie photonique, afin d'avoir une vue globale des phénomènes. Ces structures proches d'hémidesmosomes furent observées initialement chez les Insectes par Rinterknecht et Lévi (1966) et analysées plus en détail par Locke et Huie (1979).

Peut-on espérer, dans un avenir pas trop éloigné, relier ces processus morphogénétiques intervenant au niveau du cytoplasme épidermique le plus externe et les mécanismes génétiques du développement tels que l'étude de la *Drosophile* permet de les envisager aujourd'hui? Une amorce de réponse vient de certaines convergences apparaissant entre les résultats génétiques récents, les concepts classiques de l'embryologie causale et les travaux de Grandjean sur la segmentation et les phanères à caractère aléatoire dans un groupe d'Acariens du sol. L'évocation de ces travaux nous éloignerait des Crustacés, mais indiquons seulement que plusieurs méthodes furent conçues autrefois par Grandjean (1942, 1943) pour établir des listes de priorité entre organes cuticulaires parfaitement identifiés, dont la variation se fait par présence-absence. Elles sont basées sur la morphologie comparée soit des espèces, soit des stades du développement, en appliquant des calculs statistiques d'un genre inédit. Ces listes

mériterait d'être appelées "arbres de priorité", parce que les calculs permettent de définir un graphe de hiérarchies entre organes qui a la forme d'un arbre. Ce graphe rappelle celui des inductions hiérarchisées qui interviennent dans le développement embryonnaire.

Les hiérarchies mises en évidence par Grandjean à partir des seules données du phénotype cuticulaire sont également du même type que celles découvertes aujourd'hui entre les gènes de morphogénèse chez la Drosophile. Cette concordance doit faire espérer des progrès importants dans l'analyse des mécanismes morphogénétiques très en aval du génôme lui-même. Je ne présenterai pas plus en détail cette contribution de Grandjean, analysée dans un récent travail (Bouligand, 1988).

Les Arthropodes présentent une morphologie définie avec une grande rigueur géométrique et tout indique qu'ils constituent de nos jours l'un des meilleurs matériels d'analyse expérimentale de la morphogénèse. Le tégument des Crustacés paraît être un bon candidat dans cette perspective. Les méthodes introduites par Grandjean leur sont parfaitement applicables. Toutefois, les cycles ne sont pas aisément reproductibles au laboratoire et c'est un handicap pour les expériences de génétique. De nos jours, cependant, les méthodes de clonage permettent de manipuler les gènes et une partie importante des processus morphogénétiques peut être examinée en culture organotypique. L'épiderme et la cuticule des Décapodes ont donc toutes leurs chances dans la compétition.

LA STRUCTURE STRATIFIÉE ET SES CONSTANTES - Malgré des variations déconcertantes, qui seront examinées plus loin, la structure de la matrice organique de la cuticule offre deux constantes au niveau supramoléculaire. Il s'agit d'abord de l'ultrastructure du complexe chitine-protéine (Fig.3, a-d), sous forme de baguettes claires réunies par un ciment sombre, structure commune aux trois couches pigmentaire, principale et membraneuse, en dépit de très différentes proportions de la chitine (Giraud-Guille, 1984a). Cette structure en nid d'abeilles est horizontale, contrairement à celle de l'épicuticule, puisque les fibrilles de la procuticule sont, pour la plupart, parallèles au plan des strates. Des recherches en contraste de diffraction électronique confirment la présence de la chitine au niveau des éléments clairs aux électrons (Chanzy et Giraud-Guille, 1988), comme l'avait proposé autrefois Rudall (1965). L'origine de la structure en nid d'abeille n'est pas connue et diverses hypothèses ont été discutées (Giraud-Guille et Bouligand, 1986).

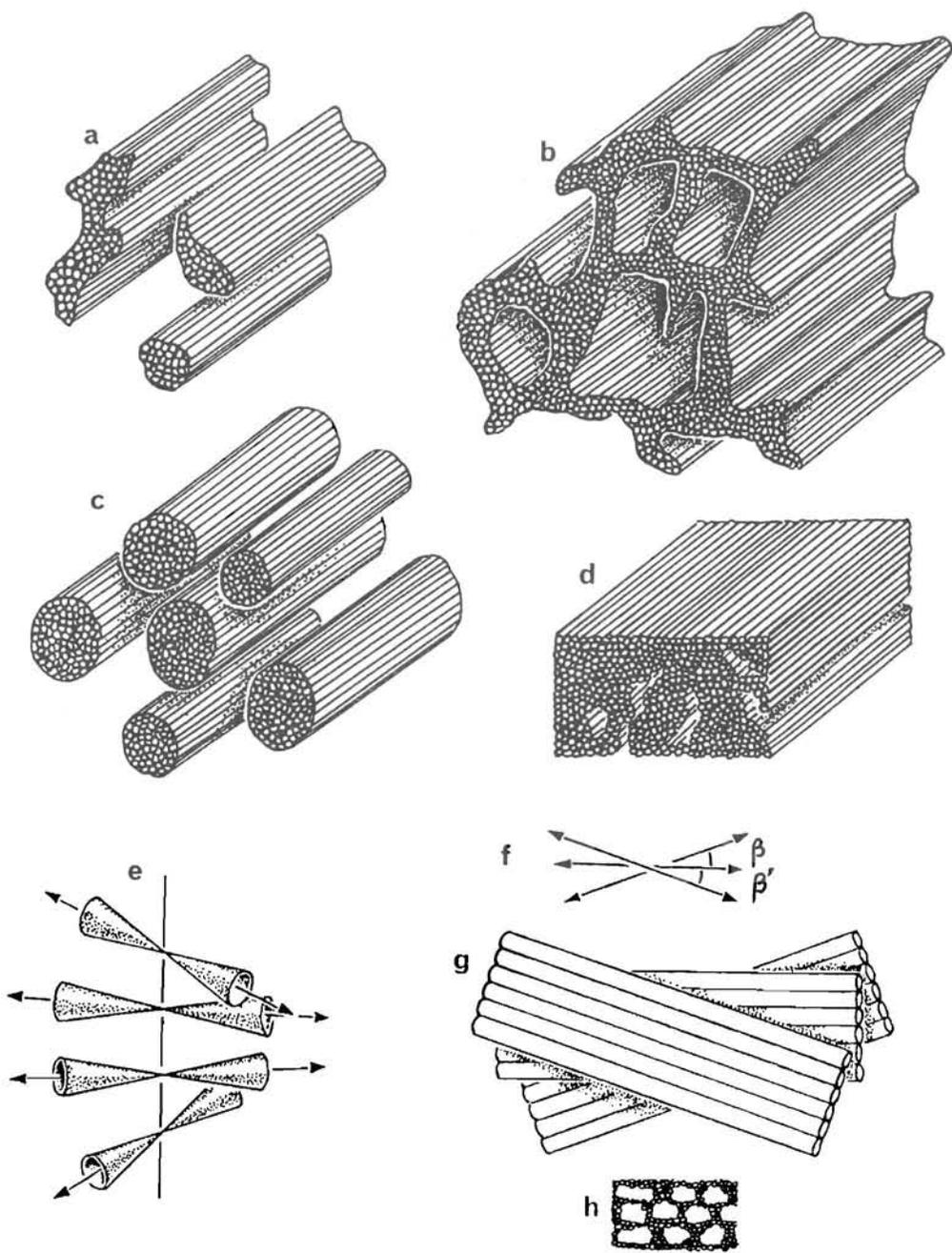
La deuxième constante structurale est la présence d'une structure torsadée, déterminant un aspect caractéristique en coupe oblique, avec des séries superposées d'arceaux emboîtés et de même orientation (Bouligand, 1965). L'étude stéréologique de ces motifs obtenus en section a montré que les fibrilles chitino-protéiques sont horizontales, c'est à dire parallèles au plan de la cuticule, alignées parallèlement entre elles à chaque niveau horizontal, avec une orientation qui tourne progressivement quand on change de niveau (Fig.3, e-h). L'empilement hélicoïdal obtenu est gauche, c'est à dire que les fibrilles vues de l'extérieur tournent dans le sens des aiguilles d'une montre, quand on change progressivement de niveau, en allant de l'intérieur vers l'extérieur de la cuticule (Bouligand, 1965). Les cônes d'incertitude dessinés autour des directions moyennes indiquent que l'ordre n'est pas rigoureux et qu'il existe certaines déviations aléatoires. Schmidt avait proposé ce modèle hélicoïdal

dès 1924, à partir d'observations au microscope polarisant, mais avait attribué les structures en arceaux à des fibrilles supplémentaires reliant des niveaux différents et assurant un surcroît de cohésion. Il existe bien des fibrilles verticales plus ou moins développées au sein des canalicules verticaux, qui jouent ce rôle, en n'ayant cependant rien à voir avec les séries d'arceaux. La structure torsadée est différente chez les Copépodes (Fig.3,f,g) et la rotation des fibrilles y est discontinue, avec de minces couches différenciées, entre lesquelles on observe des angles de 20° environ (Bouligand, 1965); les détails ultrastructuraux sont indiqués sur la Fig.3,h. Un ciment sombre contient les sous-unités chitino-protéiques entre des baguettes claires plus larges.

Les deux constantes d'organisation supramoléculaire des Crustacés, le nid d'abeilles du complexe chitine-protéine et la torsion, se retrouvent chez presque tous les autres Arthropodes. La structure torsadée est comparable géométriquement à la disposition mutuelle des molécules ou des polymères dans les cristaux liquides cholestériques, ce qui suggère l'intervention d'un autoassemblage de type cristallin liquide (Bouligand, 1967-1972). Rappelons que le terme cholestérique vient du fait que les premiers cristaux liquides de ce type furent observés avec des dérivés du cholestérol. De nos jours, les exemples de cristaux liquides cholestériques sont connus des composés chimiques les plus variés. Alors que de nombreux analogues biologiques de cristaux liquides ont pu être reproduits par autoassemblage *in vitro*, (Revue dans Livolant, 1984 et Bouligand et al., 1985), aucun progrès n'a pu être accompli dans ce sens pour la cuticule et ce sont vraisemblablement des difficultés biochimiques très réelles qui doivent être incriminées.

La chitine est un polysaccharide azoté, dont on commence à connaître des solvants (Rutherford, 1978). Certains dérivés comme l'hydroxypropyl-chitosane forment des phases cristallines liquides (Ogura et al., 1982). Les recherches sont plus avancées sur la cellulose, un autre polysaccharide fondamental de la biosphère, qui forme souvent des séries d'arceaux d'origine cholestérique dans les parois de jeunes cellules

Figure 3 - Le complexe chitine-protéine forme un tube dont la partie axiale, claire aux électrons, correspondrait à la chitine et la périphérie dense aux protéines. Ces sous-unités de 5 nm de diamètre s'alignent dans la cuticule de *Carcinus maenas* en ménageant certains espaces accessibles à la minéralisation. a) Dans la couche pigmentaire externe, elles se groupent en fibrilles séparées, de section souvent complexe. b) Dans la couche pigmentaire profonde, les sous-unités chitino-protéiques s'alignent en formant une structure réticulée en section. c) Dans la couche principale, elles donnent des fibrilles séparées, isodiamétriques. d) Dans la couche membraneuse, l'alignement est dense et ne ménage pas d'espaces suffisants pour la nucléation cristalline (a-d: d'après Giraud-Guille, 1984). e) Distribution des directions fibrillaires à plus grande échelle. L'orientation fibrillaire tourne de manière sénestre le long d'une normale à la cuticule. Les cônes indiquent la dispersion des fibrilles autour de leur direction moyenne et la rotation est continue. f,g,h) Chez les Copépodes, la rotation se fait par niveaux discrets, selon des angles β , β' ... variables, de 20° environ, de même sens. Des baguettes claires sont séparées par un ciment sombre. Celui-ci apparaît, à fort grossissement, constitué de sous-unités chitino-protéiques jointives, ménageant des espaces libres trop exigus en général pour être accessibles à la calcite.



végétales, ou dans la tunique de certaines Ascidies (Bouligand, 1972). Parallèlement, *in vitro*, certains dérivés de la cellulose comme l'hydroxypropyl-cellulose sont connus pour former des phases cholestériques (Werbowyj et Gray, 1976). De toute façon, la découverte de ces polymères cristallins liquides ne résoud pas entièrement le problème de l'autoassemblage, tel qu'il se produit à la base de la cuticule au cours de sa croissance en épaisseur. La formation des fibrilles chitinoprotéiques comporte une série d'étapes complexes, visualisées par les ultrastructures (Bouligand, 1975) et il est probable que les filaments les plus récemment déposés, non encore agrégés, correspondent à la sécrétion d'un polymère cristallin liquide, mais le caractère fluide est rapidement aboli par le regroupement en fibrilles, favorisé par la cristallisation de la chitine et la formation de liaisons covalentes, processus qui stabilisent la matrice ainsi constituée. Rappelons l'existence sous la cuticule en cours de sécrétion d'un niveau d'assemblage des fibrilles chitino-protéiques, simple pour la couche pigmentaire (Fig. 1) et différencié en quatre stades distincts pour la couche principale (Fig.4d et Bouligand, 1975).

Des microvésicules baptisées chitosomes, et contenant des chitine synthétases, ont été découvertes chez certains champignons (Bracker et al., 1976). La croissance de fibrilles de chitine est obtenue à partir de ces chitosomes isolés *in vitro* mais, à notre connaissance, ces travaux n'ont pas été reproduits chez les Crustacés et les Arthropodes, même si le rôle des membranes paraît démontré (Horst, 1983). La synthèse des fibrilles de chitine se produit à l'extérieur des cellules, au contact de la membrane épidermique, souvent au niveau de différenciations denses, semblables aux hémidesmosomes évoqués plus haut à propos de l'épicuticule, ce qui suggère une localisation membranaire des synthétases, à préciser.

VARIATIONS DES STRUCTURES TEGUMENTAIRES - La difficulté essentielle de l'étude du tégument est sa diversité insoupçonnée. On observe déjà en surface, au niveau épicuticulaire, en microscopie à balayage, des ornements très différenciés selon les régions du corps. Il existe plusieurs types de cuticule, notamment la cuticule dure et minéralisée, par opposition à celle des articulations. Dans la cuticule minéralisée, il faut distinguer celle où sont insérés les muscles, cette cuticule étant soit externe, soit interne, sous forme d'apodème ou d'endophragme. Il y a également la cuticule externe minéralisée sans insertions musculaires. Même dans ce type de cuticule apparemment homogène, les différenciations sont importantes, selon la région et l'âge. Pour la trame organique, elles portent sur plusieurs points.

1. Le mode d'agrégation des fibrilles chitino-protéiques en faisceaux dans la couche pigmentaire. (Les diverses textures qui en résultent sont représentées sur la Fig. 3).
2. La proportion des fibrilles verticales présentes au sein des canalicules verticaux, entre les microvillosités et les fibrilles horizontales.
3. Le développement des cloisons interprismatiques, sortes d'impressions laissées par les limites des cellules épidermiques dans les strates les plus externes de la couche pigmentaire.

Il est à noter que l'apolyse et la formation des divers niveaux de la trame organique de la carapace peuvent être légèrement décalés les uns par

rapport aux autres suivant les régions où on les considère. De même, pour la minéralisation, Drach (1939) avait montré les variations de texture de la mosaïque calcitique, selon le niveau dans la cuticule et la région du corps. Il en avait précisé la chronologie, en mettant en évidence des gradients. Les régions antérieures du corps, notamment celles en saillie et les extrémités distales des appendices sont les premières calcifiées.

Les observations sont aisément reproductibles à condition de préciser l'espèce, bien entendu, la région du corps examinée, le stade dans le cycle d'intermue et la largeur du céphalothorax, donnant une indication sur l'âge. On observe en effet, dans des régions comparables, des différences sensibles entre de très jeunes individus et des adultes pris au même stade du cycle d'intermue. Quelques exemples vont souligner cette diversité.

L'épicuticule interne est constituée d'une structure en nid d'abeilles, comprenant des baguettes claires aux électrons, orientées normalement au plan cuticulaire et réunies par un ciment plus opaque. Des images bien résolues en ont été obtenues par Compère et Goffinet (1987 a), chez *Carcinus maenas*. Je pense utile de préciser que cette structure est observée chez les individus de grande taille, dont le céphalothorax excède 3 cm par exemple, et n'apparaît pas jusqu'ici chez les jeunes où la largeur est de 1 cm environ. Elle n'y est pas nécessairement absente mais, dans les mêmes conditions de préparation, le contraste obtenu n'est pas le même. Cela correspond probablement à des différences biochimiques, liées au développement.

Les canaux et canalicules qui traversent verticalement la carapace des Arthropodes furent observés par les premiers histologistes, notamment Vitzou (1882) chez les Crustacés Décapodes. Leur caractère rubanné hélicoidal fut reconnu par Schmidt (1924) et rappelé par Drach (1939). Les canalicules renferment des prolongements cytoplasmiques des cellules épidermiques, comme en témoignent de nombreuses micrographies ultrastructurales (Bouligand, 1966 a, 1971). Quelques illustrations en sont proposées sur la Fig.4. Les membranes qui limitent ces microvillosités présentent des différenciations denses aux électrons (Fig.4a), distribuées de manière assez variée, à l'instar des épaisissements denses de la membrane plasmique, où s'élaborent les premiers filaments chitino-protéiques. Les canalicules sont absents en général de la cuticule des petits Crustacés et, en particulier, de celle des Copépodes (Bouligand, 1966 b), mais il y a des exceptions.

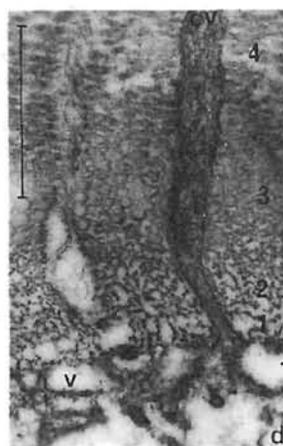
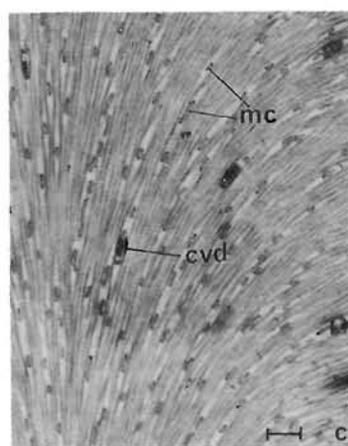
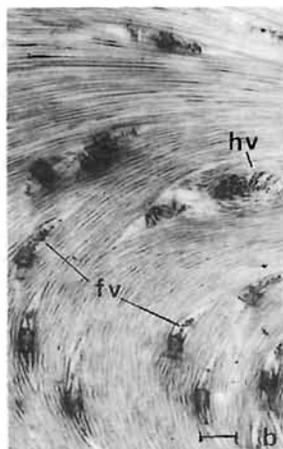
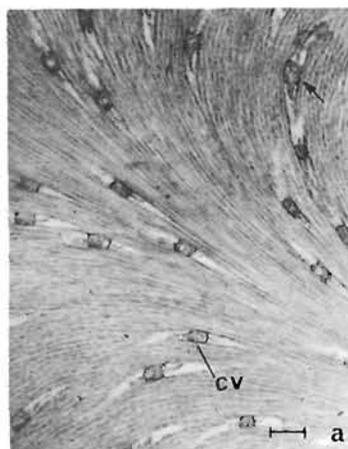
Les estimations données par les auteurs sur la densité, par unité de surface, des canalicules présents au sein de la cuticule sont contradictoires et Compère et Goffinet (1987 b) signalent que la raison en est le manque d'indications précises sur les régions étudiées. Il faut mentionner aussi l'importance de l'âge. En effet, lorsque des études suffisantes auront été accomplies, ces différences seront probablement interprétées en recourant à des arguments dimensionnels concernant les rapports surface sur volume, très diminués chez les grands individus, et corrigés par le plus grand développement des microvillosités intracaniculaires. Compère et Goffinet montrent sur de beaux clichés l'existence de branches horizontales des microvillosités cytoplasmiques (1987 a), mais cette structure présente à ma connaissance des variations avec l'âge. En effet, on l'observe chez les grands individus et rarement

chez les petits, ce qui suggère que ces expansions horizontales des microvillosités interviennent chez les jeunes de manière brève par rapport à la durée de la phase de formation de la couche pigmentaire. Compère et Goffinet (1987 a, Fig.30) suggèrent également que ces branches horizontales permettent la ramification des canalicules, mais la démonstration reste à faire. Un point essentiel est que ces expansions horizontales déterminent la texture de la couche pigmentaire, décrite en détail par Giraud-Guille (1984). Les fibrilles chitino-protéiques sont déposées entre ces expansions cytoplasmiques horizontales. Celles-ci se retirent et laissent libre un espace, qui sera occupé ultérieurement par le minéral, lors de sa mise en place après la mue.

Les variations tégumentaires les plus saisissantes sont celles des cellules épidermiques. Il en existe de nombreux types et leur cytologie présente des changements appréciables, selon les régions, le stade dans le cycle d'intermue et l'âge. Lorsque je préparais ma thèse, j'avais constaté, par extrapolation, qu'il me fallait probablement deux siècles pour explorer de manière simplement descriptive l'ensemble des structures tégumentaires de *Carcinus maenas*, avec le rythme et le degré de précision que j'avais adoptés. En termes plus réalistes, une équipe de vingt chercheurs est nécessaire pendant dix ans. Je ne connais pas de biologistes cellulaires conscients du travail qui les attend. L'épiderme des Insectes m'a toujours semblé moins diversifié, mais ce n'est peut-être qu'une apparence. La cuticule des Insectes paraît elle aussi homogène dans sa structure, mais cela tient souvent à la grande densité de la matière organique et donc à une difficile pénétration des fixateurs et des contrastants. Quand l'examen est plus approfondi, on découvre également chez les Insectes de nombreux thèmes de variations.

MORPHOGENESE DE LA MOSAIQUE CALCITIQUE - La minéralisation de la carapace des Décapodes est initiée en des régions et à des niveaux déterminés de la cuticule (Drach, 1939; Bouligand, 1970). Elle est contrôlée par une série de mécanismes très différents dans leurs principes, puisqu'ils résultent de l'intervention d'enzymes telles que les phosphatases alcalines (Travis, 1965) et l'anhydrase carbonique, dosée et localisée par Giraud-Guille (1977 a,b, 1981, 1984 b). Le rôle des phosphatases serait de couper les ions phosphates qui, en se liant au réseau de calcite, peuvent inhiber sa croissance (Simkiss, 1964). De plus, divers processus électrochimiques

Figure 4 - Variations ultrastructurales des canalicules verticaux de la carapace de *Carcinus maenas*. a) Aspect classique des sections rectangulaires des prolongements cytoplasmiques, où la membrane présente une forte densité aux électrons, en formant souvent deux zones opposées (flèche). b) Le clivage local déterminé par la présence d'un prolongement cytoplasmique, disparu ici, peut contenir des fibrilles chitinoprotéiques verticales (fv) et on observe en (hv) un passage continu entre fibrilles horizontales et fibrilles verticales. c) Dans une ancienne cuticule en phase D2, on observe parfois, au niveau de la couche principale, la présence de très fins microcanalicules (mc). Certaines microvillosités de dimensions usuelles (cvd) sont chargées d'un matériel dense. d) Coupe longitudinale de la microvillosité d'un canalicule vertical au niveau de son lien avec la cellule épidermique. Quatre stades distincts sont observés dans l'assemblage des fibrilles (1,2,3,4). Des vésicules (v) sont présentes sous la membrane plasmique externe de l'épiderme. Les barres représentent 1 µm.



jouent un rôle déterminant (Digby, 1967), ainsi que certaines particularités de la trame organique qui conduisent à la formation de dislocations-vis dans le réseau cristallin de calcite, ce qui accélère probablement la croissance du minéral (Giraud-Guille, 1984 c). Ces mécanismes sont souvent débattus comme s'il s'agissait d'hypothèses pouvant s'exclure, alors qu'ils semblent plutôt coexister et oeuvrer en synergie (Revue dans Giraud-Guille, 1980).

L'un des facteurs déterminants de la minéralisation est l'espace disponible à la croissance cristalline. La matrice organique doit ménager des espaces dont les dimensions dépassent 300 Å (Bouligand, 1970). Cela résulte du principe selon lequel un germe cristallin n'a de chance de grandir que si ses dimensions excèdent certaines valeurs critiques et s'il y a sursaturation. Cela exclut la calcite de l'épicuticule et de la couche membraneuse, contrairement à ce qui est lu dans Roer et Dillaman (1984) et Dennell (1960). L'absence de calcite dans l'épicuticule est visible dans l'une de mes micrographies publiées, mais on l'observe dans les interstices de procuticule situés entre les racines de l'épicuticule (Bouligand, 1970) et dans certains espaces libres conduisant aux épines épicuticulaire (Hegdahl et al., 1977c). La croissance de la mosaïque calcitique ne modifie pas l'espace entre les fibrilles et ne provoque pas de changement de volume appréciable sur coupe. Le front de minéralisation ne détermine aucune distorsion des strates (Bouligand, 1970).

LA QUESTION DES ARTEFACTS - La cuticule est un matériau dur, difficile à bien fixer et à inclure, présentant des propriétés mécaniques originales. Il en résulte des artefacts aussi variés que méconnus. A ce jour, on peut en reconnaître quatre types liés à la fixation, à la déminéralisation, à la déshydratation et à la microtomie. Même avec une grande rigueur sur l'âge, le stade dans le cycle d'intermue et le choix de la région, les prolongements cytoplasmiques des canalicules sont plus ou moins conservés, selon la pénétration des fixateurs. Il faut souligner la qualité de la fixation dans les travaux récents de Compère et Goffinet (1987,a,b) et le progrès paraît venir de ce qu'ils fixent longtemps, avant et après la déminéralisation. Pour celle-ci, les moyens violents doivent être proscrits et j'ai vérifié que les "macrofibres" décrites par Dennell, qui utilise du HCl (1973), sont en fait des tubes artefactuels créés par le dégagement du gaz carbonique.

L'alcool éthylique utilisé pour les déshydratations introduit des cristallisations artefactuelles, étudiées autrefois par Prenant (1927). Dans les cuticules en début de calcification, la présence des carbonates est reconnue par l'effervescence aux acides; l'état cristallisé l'est par la polarisation chromatique observée au microscope polarisant. Chez *Carcinus maenas*, la mosaïque est initiée sous forme de disques de calcite sous l'épicuticule et est bien reconnaissable au microscope polarisant, sur un tégument fraîchement prélevé. La déshydratation par l'alcool éthylique fait apparaître, autour de chaque disque, des auréoles de minuscules cristaux constitués probablement de calcite. Ces microcristaux sont également reconnaissables dans les ultrastructures. Des formations comparables ont été décrites comme représentant les premières phases de la minéralisation (Travis 1963, Yano 1975, Hegdahl, 1977b) et méritent une discussion plus approfondie. En fait, chez *Carcinus maenas*, toutes les observations au microscope polarisant sur matériel frais montrent l'existence de fronts de minéralisation bien tranchés. De plus, on

comprendrait mal comment des microcristaux naissant séparément, formeraient ultérieurement de grands domaines avec des distributions continues des axes cristallographiques de la calcite. Ces mosaïques sont bien définies au microscope polarisant, sur les cuticules en début de minéralisation, comme nous l'avons déjà indiqué, mais aussi dans la carapace entièrement calcifiée, sur coupe, comme en témoignent nos micrographies reproduites dans le livre de Neville (1975). Pour obtenir une distribution continue des axes de la calcite sur de grands domaines, il faudrait que les microcristaux originels suivent les orientations de la trame organique. Il se trouve au contraire que la mosaïque calcitique est relativement indépendante du réseau organique. Les axes isotropes ou axes c de la calcite sont généralement parallèles aux couches torsadées et sont donc horizontaux comme les fibrilles, sans leur être parallèles pour autant.

Des images d'agrégats cristallins à la surface ou à l'intérieur des villosités des canalicules furent publiées par Travis (1970) sans se poser la moindre question sur leur origine éventuellement artificielle. Celle-ci est probable puisque, dans la cuticule entièrement minéralisée en C4, la calcite est déposée entre les fibrilles verticales des canalicules, et non au sein des villosités elles-mêmes (Bouligand 1970, Hegdahl 1977 a). De plus, en C4, on peut creuser la carapace d'un crabe, sans la percer, avec une fraise de dentiste, en formant un alvéole qui atteint seulement les strates externes de la couche principale. Après quinze jours, les coupes histologiques montrent la présence d'un matériel qui couvre partiellement le fond de l'alvéole et dont les affinités tinctoriales sont semblables à celles de l'épicuticule. Ce matériel est présent dans certains des canalicules qui ont dû le véhiculer. Il est donc difficile d'imaginer la minéralisation des structures cytoplasmiques intracuticulaires, si elles demeurent ainsi fonctionnelles au sein de la carapace achevée et calcifiée.

De nombreux artéfacts sont liés à la microtomie. Pour les coupes de matériels non minéralisés ou déminéralisés, des bandes sombres courant parallèlement aux séries d'arceaux ont été interprétés comme des structures physiquement ou chimiquement différenciées, non seulement chez les Crustacés, mais chez bien d'autres Arthropodes. En fait il s'agit d'un artéfact qui tient fondamentalement à des variations d'épaisseur de coupe. Le couteau rencontre des fibrilles dont l'orientation varie périodiquement en offrant une résistance également périodique. Cela détermine des sortes de marches d'escalier à la surface des coupes. Ces marches étant décalées entre les deux faces des coupes, il en résulte des bandes épaisses alternant avec des bandes minces. Plusieurs études détaillées de cet artéfact ont été réalisées (Bouligand 1972, 1986; Giraud-Guille 1986).

Pour ce qui concerne le matériel calcifié, sa fragilité est évidente et, en coupe, on obtient le plus souvent de fines baguettes parallèles distribuées entre les fibrilles. Ainsi, les axes longitudinaux de calcite, parallèles aux fibrilles, décrits par Hegdahl (1977 a), ne correspondent en rien à des axes cristallographiques. Cet aspect résulte des fractures innombrables, introduites par le couteau du microtome au sein du minéral, entre les canaux occupés par les fibrilles. Cependant, les meilleures coupes montrent de vastes régions avec continuité du minéral entre les fibrilles. Il y a lieu aussi de rappeler une propriété connue, et non exclusive, de la calcite, qui est de former des mâcles mécaniques

(Friedel, 1910, p.226, 1964, p.423), ce qui change l'orientation des axes cristallographiques après coupe, détail qui n'a jamais inquiété les spécialistes de la biominéralisation! Les diagrammes de diffraction électronique donnent par conséquent des indications probablement erronées. Ces diagrammes demeurent utiles en révélant l'existence de domaines où les axes varient sans discontinuités. Par contre, les discontinuités mises en évidence proviennent soit d'authentiques discontinuités de la texture originale au sein de la cuticule, soit de discontinuités surajoutées par les effets mécaniques de la microtomie.

PERSPECTIVES - L'intérêt des Crustacés Supérieurs dans l'étude biochimique est évident, ne serait-ce que par la masse de la cuticule de certains Décapodes, comparée à celle des Insectes. Parmi les problèmes actuels, soulignons les difficultés rencontrées par les biochimistes dans l'étude des protéines cuticulaires, dues aux liaisons covalentes qui les lient de manière intime à la chitine, aussi bien chez les Insectes que chez les Crustacés. La voie la plus prometteuse est de cloner les gènes des protéines cuticulaires et ce travail est possible dès aujourd'hui chez les Décapodes. Des recherches considérables devraient donc être développées dans cette voie, au cours des prochaines années, parce que les complexes chitino-protéiques ont un grand avenir industriel. Les populations cellulaires épidermiques peuvent être suivies de stade en stade et des informations devraient en être retirées sur les mécanismes de l'isométrie et de l'allométrie. Les architectures dessinées au niveau de l'épicuticule méritent une étude spéciale dans le cadre des conceptions de Grandjean, qui permettent d'entrevoir un lien avec les données récentes de la génétique du développement. Bien des expériences sont à envisager sur des cultures organotypiques. La cuticule des Crustacés est également l'un des modèles biologiques fondamentaux de structure minéralisée et la formation de la mosaïque calcitique est un aspect rarement évoqué de la morphogénèse.

-
- Bazin F. Action inhibitrice de l'ecdystérone sur la régénération chez le crabe *Carcinus maenas* (L.). *Comptes Rendus Acad. Sci. Paris*, **284**, D: 1211-1214 (1977).
- Bocquet C., Cals P. et Renaud B. Ordonnance et variations locales des populations cellulaires épidermiques de *Carcinus maenas* (L.) (Crustacé Décapode). *Comptes Rendus Acad. Sc. Paris*, **283**, D: 349-352 (1976).
- Bouligand Y. Sur une architecture torsadée répandue dans de nombreuses cuticules d'Arthropodes. *Comptes Rendus Acad. Sci. Paris*, **261**, 3665-3668 (1965).
- Bouligand Y. La géométrie des constituants cuticulaires chez les Crabes à l'échelle des ultrastructures. *6th Internat. Congr. Electr. Microsc.*, Kyoto, **2**: 577-578 (1966 a).
- Bouligand Y. Le tégument de quelques Copépodes et ses dépendances musculaires et sensorielles. *Mém. Muséum Hist. Nat.*, Nouvelle Série, A, Zoologie, **40**, (4), 189-206 (1966 b).
- Bouligand Y. Comparaison de certains matériels biologiques à la structure des cristaux liquides cholestériques. *J. Microscopie*, **6**: 41 a (1967).
- Bouligand Y. Aspects ultrastructuraux de la calcification chez les crabes. *7ème Congr. Internat. Microsc. Electr.*, Grenoble, **3**:105-106 (1970).
- Bouligand Y. Les orientations fibrillaires dans le squelette des Arthropodes. I. L'exemple des Crabes, l'arrangement torsadé des strates. *J. de Microscopie*, **5**: 305-322 (1971).

- Bouligand Y. Twisted fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases. *Tissue & Cell*, **4**: 189-217 (1972).
- Bouligand Y. Defects and textures in cholesteric analogues given by some biological systems. *J. de Physique*, **36** C1: 331-336 (1975).
- Bouligand Y. Theory of microtomy artefacts in arthropod cuticle. *Tissue & Cell*, **18**: 621-643 (1986).
- Bouligand Y. La priorité des organes selon François Grandjean: une articulation précise entre ontogenèse et phylogenèse. Ontogenèse et Evolution. Coll. Internat. C.N.R.S. Editions du C.N.R.S. (sous presse).
- Bouligand Y., Denèfle J.-P., Lechaire M. et Maillard M. Twisted architectures in cell-free assembled collagen gels: study of collagen substrates used for cultures. *Biol. Cell*, **54**: 143-162 (1985).
- Bracker C.E., Ruiz-Herrera J. et Bartnicki-Garcia S. Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during microfibril synthesis *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **73**: 4570-4574 (1976).
- Chanzy H et Giraud-Guille M.-M. Communication personnelle (1988).
- Compère P. et Goffinet G. Ultrastructural shape and three-dimensional organization of the intracuticular canal systems in the mineralized cuticle of the green crab *Carcinus maenas*. *Tissue & Cell*, **19**: 839-857 (1987 a).
- Compère P. et Goffinet G. Elaboration and ultrastructural changes in the pore canal system of the mineralized cuticle of *Carcinus maenas* during the moulting cycle. *Tissue & Cell*, **19**: 859-875 (1987).
- Dennell R. Integument and exoskeleton. *The Physiology of Crustacea*. Waterman T.H. ed., Acad. Press, N.-Y. et Londres, **1**: 455-463 (1960).
- Dennell R. The structure of the cuticle of the shore-crab *Carcinus maenas* (L.). *Zool. J. Linn. Soc.*, **52**: 159-163 (1973).
- Digby P.S.B. Calcification and its mechanism in the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Proc. Linn. Soc. Lond.*, **178**: 129-146 (1967).
- Drach P. Mue et Cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes, *Ann. Inst. Océanogr.*, Paris (N. S.) **19**: 103-391 (1939).
- Friedel G. Leçons de cristallographie, 1 vol. 310 p. Hermann, Paris (1911) et nouveau tirage de la 2ème édition. 1 vol. 600 p. A. Blanchard, Paris (1964).
- Gehring W.J. Homeotic genes, the homeobox, and the spatial organization of the embryo. *The Harvey Lectures. Series*. **81**: 153-172 (1987).
- Giraud M.-M. L'anhydrase carbonique et la calcification tégumentaire chez le crabe *Carcinus maenas* Linné. *Comptes Rendus Acad. Sci. Paris*, **284**: 453-456 (1977 a).
- Giraud M.-M. Histochimie des premières étapes de la minéralisation de la cuticule du Crabe *Carcinus maenas*: tentative de localisation de l'anhydrase carbonique. *Comptes Rendus Acad. Sci. Paris*, **284**: 1541-1544 (1977 b).
- Giraud M.-M. Aspects coopératifs de la minéralisation de la carapace des Crustacés. *La Morphogenèse de la Biologie aux Mathématiques*, Bouligand Y., éd., Recherches Interdisciplinaires, Maloine, Paris: 147-150 (1980).
- Giraud M.-M. Carbonic anhydrase activity in the integument of the crab *Carcinus maenas* during the intermolt cycle. *Comp. Biochem. Physiol.*, **69** A: 381-387 (1981)
- Giraud-Guille M.-M. Fine structure of the chitin-protein system in the crab cuticle. *Tissue & Cell*, **16**: 75-92 (1984 a).
- Giraud-Guille M.-M. Calcification initiation sites in the crab cuticle. The interprismatic septa. An ultrastructural cytochemical study. *Cell Tissue Res.*, **236**: 413-420 (1984 b).

- Giraud-Guille, Les matrices extracellulaires analogues de cristaux liquides - structure et biominéralisation - exemple de la cuticule du crabe *Carcinus maenas*. Thèse d'Etat, Université Paris VI, (1984 c).
- Giraud-Guille M.-M. Direct visualization of microtomy artefacts in sections of twisted fibrous extracellular matrices. *Tissue & Cell*, 18: 603-620 (1986).
- Giraud-Guille M.-M. et Bouligand Y. Chitin protein molecular organisation in Arthropods, *Chitin in Nature and Technology*, Muzzarelli et al. ed., Plenum Publ. Co, 29-35 (1986).
- Grandjean F. Les méthodes pour établir les listes de priorité et la concordance de leurs résultats. *Comptes Rendus Acad. Sci., Paris*, 214: 729-733 (1942).
- Grandjean F. Priorité absolue et statistique en biologie. *Comptes Rendus Séanc. Soc. Phys. Hist. Genève*, 60: 135-139 (1943).
- Hegdahl T., Gustavsen F., Silness J. The structure and mineralization of the carapace of the crab (*Cancer pagurus* L.) 1. The endocuticle; 2. The exocuticle; 3. The epicuticle. *Zoologica Scripta*, 6: 89-99; 101-105; 215-220 (1977 a; b; c).
- Horst M.N. The biosynthesis of chitin. Isolation and characterization of Polyphenol-linked intermediates from brine shrimps microsomes. *Arch. Biochem. Biophysics*, 223: 254-263 (1983).
- Livolant F. Cholesteric organisation of DNA *in vivo* and *in vitro*. *European J. Cell Biology*, 33: 300-311 (1984).
- Locke M. et Huie P. Apolysis and the turnover of plasma membrane plaques during cuticle formation in an insect. *Tissue & Cell*, 11: 277-291 (1979).
- Neville A.C. Biology of the Arthropod Cuticle, Coll. *Zoophysiology and Ecology*, 4/5: 1 Vol. 448 p., Springer Vlg. (1975).
- Ogura K., Kanamoto T, Takanori S., Tanaka K. et Iwakura Y. Liquid crystalline phases based on chitosan and its derivatives, *Chitin & Chitosan, Proc. 2nd Internat Conf.*: 39-44 (1982).
- Prenant M. Les formes minéralogiques du calcaire chez les êtres vivants et le problème de leur déterminisme. *Biol. Rev.*, 2: 364-393 (1927).
- Renaud B. Les régions et les limites de la carapace d'un Crustacé décapode *Carcinus maenas* (L.) [Brachyryncha Portunidae]; leurs rapports avec les systèmes fonctionnels principaux. *Bull. Muséum Nat. Hist. Nat. 3e Série*, n° 454, Zoologie 317: 569-594 (1977).
- Rinterknecht E. et Lévy C. Etude au microscope électronique du cycle cuticulaire au cours du 4ème stade larvaire chez *Locusta migratoria*. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, 72: 390-407 (1966).
- Roer R et Dillaman R. The structure and calcification of crustacean cuticle. *Amer. Zool.*, 24: 893-909 (1984).
- Rudall K.M. Skeletal structure in insects. *Aspects of Insect Biochemistry* (T. W. Goodwin ed.), Acad. Press 83-92 (1965).
- Rutherford F.A. Characterisation of marine chitins using a unique inert solvent. Thesis, Univ. of Delaware. *Proc. 1st Internat. Conf. Chitin/Chitosan*. MITSG 78-7, 182.
- Schmidt W.J. Die Bausteine des Tierkörpers in polarisierten Lichte. Fr. Cohen Verlag, Bonn, Cf. 247-257 (1924).
- Simkiss K. Phosphates as crystal poisons of calcification. *Biol. Rev.*, 39: 487-505 (1964).
- Spieler P. et Goldschmidt-Clermont M. La génétique du développement de la mouche. *La Recherche*, 16: 452-461 (1985).
- Travis D.F. Structural features of mineralization from tissue to macromolecular levels of organization in the decapod crustacea. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*; 109: 177-245 (1963).

- Travis D.F. The deposition of skeletal structures in the crustacea. 5. The histomorphological and histochemical changes associated with the development and calcification of the branchial exoskeleton in the crayfish, *Orconectes virilis* Hagen, *Acta histochem.*, **20**: 193-222 (1965).
- Travis D.F. The comparative ultrastructure and organization of five calcified tissues. *Biological Calcification, Cellular and Molecular Aspects*. Schraer H. ed., North Holl. Publ. Co.: 203-311 (1970).
- Vitzou A. N., Recherches sur la structure et la formation des téguments chez les Crustacés Décapodes. *Arch. Zool. Exptl. et Gén.*, Sér. I, **10**: 451-476 (1882).
- Werbowyj R.S. et Gray D. Liquid crystalline structure in hydroxypropyl cellulose solutions. *Mol. Cryst. Liq. Cryst. (Letters)*, **34**: 97-103 (1976).
- Wigglesworth V.B. Growth and form in an Insect. *Essays on Growth and Form presented to d'Arcy Wentworth Thompson*. Oxford, at Clarendon Press: 23-40 (1945).
- Yano Y. An electron microscope study on the calcification of the exoskeleton in a shore crab. *Bull. Japanese Soc. Scient. Fisheries*, **41**: 1079-1082 (1975).