

Juin 1961

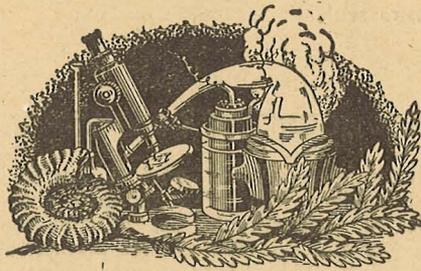
Tome I
Mémoire II

Numéro 2

BULLETIN
DE LA
SOCIÉTÉ LORRAINE DES SCIENCES

Ancienne Société des Sciences de Nancy
(FONDÉE EN 1828)

TRIMESTRIEL
Abonnement annuel : 12 NF.



NANCY
IMPRIMERIE GEORGES THOMAS
Angle des rues de Solignac et Henri-Lepage
1961

AVIS AUX MEMBRES

COTISATIONS. — Les cotisations (12 NF) peuvent être réglées à M. CÉZARD, Jardin Botanique, Nancy. C.C.P. Nancy 45-24.

SÉANCES. — Les réunions ont lieu le deuxième jeudi de chaque mois, sauf vacances ou fêtes tombant ce jour, à 17 heures, Salle d'honneur de l'Université, 13, place Carnot, Nancy.

BIBLIOTHÈQUE. — Une très riche bibliothèque scientifique est mise à la disposition des Membres. Par suite d'un accord entre la Société et la Municipalité, les ouvrages sont en dépôt à la Bibliothèque Municipale, rue Stanislas, Nancy. Les Membres ont droit d'office au prêt des ouvrages, aussi bien ceux appartenant au fonds de la Société qu'au fonds de la Ville.

Sauf en périodes de vacances, la Bibliothèque est ouverte tous les jours. Se renseigner près du Conservateur de la Bibliothèque Municipale.

BULLETIN. — Afin d'assurer une parution régulière du Bulletin, les Membres ayant fait une communication sont invités à remettre leur manuscrit en fin de séance au Secrétaire du Bulletin. A défaut, ces manuscrits devront être envoyés à son adresse (141, avenue Carnot, Saint-Max) dans les quinze jours suivant la séance. Passé ce délai, la publication sera ajournée à une date indéterminée.

Les corrections d'auteurs sur les épreuves du Bulletin seront obligatoirement faites dans les huit jours suivant la réception des épreuves, faute de quoi ces corrections seront faites d'office par le Secrétaire, sans qu'il soit admis de réclamations. Les demandes de tirés à part non formulées en tête des manuscrits ne pourront être satisfaites ultérieurement.

Les clichés sont à la charge des auteurs.

Il n'y a pas de limitation de longueur ni du nombre des communications. Toutefois, les publications des travaux originaux restent subordonnées aux possibilités financières de la Société. En cas d'abondance de communications, le Conseil déciderait des modalités d'impression.

Il est précisé une nouvelle fois, en outre, que les observations, théories, opinions, émises par les Auteurs dans les publications de la Société des Sciences de Nancy, n'impliquent pas l'approbation de notre groupement. La responsabilité des écrits incombe à leurs Auteurs seuls.

AVIS AUX SOCIÉTÉS CORRESPONDANTES

Les Sociétés et Institutions faisant avec la Société Lorraine des Sciences l'échange de leurs publications sont priées de faire connaître dès que possible, éventuellement, si elles ne reçoivent plus ses bulletins. La publication ultérieure de la liste révisée des Sociétés faisant l'échange permettra aux Membres de connaître les revues reçues à la Bibliothèque et aux Correspondants de vérifier s'ils sont bien portés sur les listes d'échanges.

L'envoi des échanges doit être fait à l'adresse : Bibliothèque de la Société Lorraine des Sciences, Bibliothèque Municipale, rue Stanislas, Nancy.

MÉMOIRES

de la

Société Lorraine des Sciences

(Ancienne Société des Sciences de Nancy, fondée en 1828)

1961

IMPRIMERIE V. IDOUX
NANCY

Roland LENEL

Docteur ès Sciences
Institut de Biologie
Faculté des Sciences
NANCY

Sur le métabolisme des pigments caroténoïdes
de *Carcinus maenas* Linné

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION	2
MATÉRIEL ET TECHNIQUES D'ÉLEVAGE	3
Matériel (p. 3). Élevage (p. 3). Contrôle de l'eau de mer (p. 4).	

PREMIÈRE PARTIE

GÉNÉRALITÉS SUR LES PIGMENTS CAROTÉNOIDES ET CONSTITUTION CHIMIQUE

I. — DÉFINITION	6
II. — TRAVAUX ANTÉRIEURS	7
A. — Sur les pigments caroténoïdes en général	7
B. — Sur les pigments caroténoïdes des Crustacés	7

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHE, NATURE, LOCALISATION DES PIGMENTS CAROTÉNOIDES DANS L'ANIMAL

INTRODUCTION	9
Chapitre I. — RECHERCHE DES PIGMENTS	10
A. — Extraction	10
B. — Saponification	11
C. — Fractionnement	11
1. — Partage entre solvants	11
2. — Chromatographie	11
a) Description de la méthode (p. 12). Adsorbants (p. 12). Éluants (p. 13).	
b) Technique de travail et matériel (p. 14). Chromatographie sur colonne (p. 14). Chromatographie sur papier (p. 15).	
D. — Détermination	16
1. — Courbe d'éluion	16
2. — Spectrophotométrie	16
a) Étude qualitative (p. 17).	
b) Étude quantitative (p. 18).	
CONCLUSION	18

Chapitre II. — NATURE ET PROPRIÉTÉS DES PIGMENTS TROUVÉS	19
1. — β carotène	19
2. — Cryptoxanthine	21
3. — « Carcinoxanthine »	22
4. — Xanthophylle	26
<i>a)</i> Ester de xanthophylle (p. 26).	
<i>b)</i> Xanthophylle libre (p. 26).	
5. — Hydroxy-céto-caroténoïde (?)	27
6. — Astaxanthine	27
<i>a)</i> Astaxanthine libre (p. 28).	
<i>b)</i> Isomères d'esters d'astaxanthine (p. 29).	
<i>c)</i> Astaxanthine — Chromoprotéïdes (p. 29).	
7. — Astacine	30
CONCLUSION	31
Chapitre III. — LOCALISATION DES PIGMENTS CAROTÉNOÏDES DANS L'ANIMAL	33
A. — Pigments caroténoïdes tégumentaires	33
1. — Pigments caroténoïdes de la carapace	34
2. — Pigments des exuvies	38
3. — Pigments de l'hypoderme	38
4. — Pigments des nouveaux téguments	41
<i>a)</i> Premier cas (p. 42).	
<i>b)</i> Deuxième cas (p. 43).	
<i>c)</i> Troisième cas (p. 43).	
B. — Pigments caroténoïdes internes	43
1. — Pigments caroténoïdes de l'hémolymphe	44
2. — Pigments caroténoïdes de l'hépto-pancréas	45
3. — Pigments caroténoïdes d'excrétion	48
4. — Pigments caroténoïdes des ovaires et des œufs	49
CONCLUSION	50
RÉSUMÉ DE LA DEUXIÈME PARTIE	51

TROISIÈME PARTIE

MÉTABOLISME DES PIGMENTS CAROTÉNOÏDES DANS L'ANIMAL

INTRODUCTION	52
Chapitre I. — ORIGINE DES PIGMENTS CAROTÉNOÏDES DANS L'ANIMAL	53
Action de la nourriture	54
1. — Méthode d'observation	55
2. — Témoins	55
<i>a)</i> Pigmentation de la carapace (p. 56).	
<i>b)</i> Pigmentation de l'hypoderme (p. 56).	
<i>c)</i> Pigmentation de l'hémolymphe (p. 57).	
<i>d)</i> Pigmentation de l'hépto-pancréas (p. 59).	
Observations macroscopiques (p. 59). Étude quantitative (p. 60).	
<i>e)</i> Pigmentation des ovaires (p. 61). Observations macroscopiques (p. 61). Étude quantitative (p. 61).	
Résumé (p. 61).	

3. — Animaux en régime totalement carencé en caroténoïdes.	61
<i>a)</i> Action sur les pigments des téguments (p. 62). Étude quantitative de la diminution du taux des pigments dans les téguments (p. 62-63).	
<i>b)</i> Action sur les pigments de l'hémolymphe (p. 63).	
<i>c)</i> Action sur les pigments de l'hépatopancreas (p. 64).	
<i>d)</i> Action sur les pigments des ovaires (p. 64).	
<i>e)</i> Remarques (p. 65). Étude quantitative sur l'animal entier (p. 65).	
4. — Animaux carencés replacés en alimentation normale ...	65
Premier cas. Étude quantitative de l'augmentation du taux des pigments (p. 65).	
Deuxième cas. Observations sur la réabsorption des pigments (p. 66).	
Troisième cas se rapportant à une expérience de jeûne (p. 66).	
5. — Animaux en régime très riche en caroténoïdes	66
<i>a)</i> Action sur les pigments des téguments (p. 67). Étude quantitative (p. 67).	
<i>b)</i> Action sur les pigments de l'hémolymphe (p. 68).	
<i>c)</i> Action sur les pigments de l'hépatopancreas (p. 68).	
<i>d)</i> Action sur les pigments des ovaires (p. 69).	
<i>e)</i> Remarques (p. 69). Étude quantitative du β carotène total (p. 69).	
6. — Cas particulier	70
CONCLUSION	71
Chapitre II. — INFLUENCE DE L'ABLATION DES PÉDONCULES OCULAIRES	72
Exposé du sujet	72
1. — Action sur les pigments tégumentaires	72
<i>a)</i> Action sur les pigments de la carapace (p. 73). Comparaison des spectres d'absorption du mélange des pigments avant et après l'ablation (p. 73).	
<i>b)</i> Action sur les pigments de l'hypoderme (p. 74). Comparaison des spectres d'absorption du mélange des pigments avant et après l'ablation (p. 75).	
2. — Action sur les pigments internes	78
<i>a)</i> Action sur les pigments de l'hémolymphe (p. 78).	
<i>b)</i> Action sur les pigments de l'hépatopancreas (p. 78). Observations macroscopiques (p. 78). Étude quantitative totale (p. 79). Étude quantitative sur l'hépatopancreas (p. 79). Interprétation des résultats (p. 80).	
<i>c)</i> Action sur les pigments des ovaires (p. 81). Étude quantitative (p. 81).	
3. — Remarque	81
CONCLUSION	82
Chapitre III. — SUR LES TRANSFORMATIONS ET LE ROLE DES PIGMENTS CAROTÉNOÏDES DANS L'ORGANISME DU CRABE	83
1. — Absorption et excrétion des pigments	83

2. — Transformations des pigments	84
Cas de l'hémolymphe, de la carapace et du tube digestif (p. 85). Transformations dans l'hépatopancreas (p. 85). Transformations dans l'hypoderme (p. 86). Interprétations biochimique (p. 87).	
3. — Mue et métabolisme des pigments	89
4. — Vitellogenèse, ovogenèse et métabolisme des pigments ..	90
Vitellogenèse et pigments (p. 90). Ovogenèse et pigments (p. 91).	
5. — Rôle des pigments caroténoïdes dans l'animal	92
Revue bibliographique (p. 92). Conclusions personnelles (p. 93).	
RÉSUMÉ DE LA TROISIÈME PARTIE	95

QUATRIÈME PARTIE

PIGMENTS CAROTÉNOÏDES ET SACCULINE, PARASITE DU CRABE

INTRODUCTION	97
Chapitre I. — PIGMENTS CAROTÉNOÏDES DE LA SACCULINE	99
1. — Pigments caroténoïdes des sacs viscéraux	99
Étude qualitative (p. 99). Étude quantitative (p. 100).	
2. — Pigments caroténoïdes des nauplii	100
3. — Pigments caroténoïdes des racines internes de la Sacculine	101
CONCLUSION	101
Chapitre II. — ACTION DE LA SACCULINE SUR LES PIGMENTS CAROTÉNOÏDES DU CRABE PARASITÉ	102
1. — Action sur les pigments caroténoïdes tégumentaires	102
2. — Action sur les pigments caroténoïdes de l'hémolymphe ..	103
3. — Action sur les pigments caroténoïdes de l'hépatopancreas	104
Observations macroscopiques (p. 105). Étude quantitative (p. 106). Cas des Crabes parasités opérés des pédoncules oculaires (p. 106).	
RÉSUMÉ DE LA QUATRIÈME PARTIE	107
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS	108
BIBLIOGRAPHIE	112
TABLEAUX	123

AVANT-PROPOS

Avant d'entreprendre l'exposé de ce travail, je tiens à profiter de l'occasion qui m'est offerte d'exprimer ici ma profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué, d'une manière ou d'une autre, à sa réalisation.

Je dois à Monsieur le Professeur A. VEILLET mon orientation dans la voie si attrayante, bien que parfois austère, de la Recherche scientifique ; en me proposant un poste parmi le personnel de son Laboratoire, il comblait un de mes désirs intimes que je n'aurais osé moi-même exprimer. Son dynamisme, son esprit d'initiative, la vivacité de son raisonnement sont autant de moteurs entraînant la marche si fructueuse d'une équipe à laquelle j'ai la grande joie d'appartenir.

Je lui dois encore ma promotion dans l'Enseignement supérieur qui, tout en permettant la poursuite de mes recherches, me procurait cependant l'occasion de contacts directs et enrichissants avec le monde étudiant.

Je le prie de vouloir bien trouver ici l'expression de mes très vifs et très sincères remerciements pour toutes ces faveurs et pour la confiance qu'il m'a ainsi toujours témoignée dans tous les domaines.

Mon intérêt toujours prononcé pour le monde végétal ne saurait avoir d'autres causes que l'enseignement si riche et si documenté donné par M. le Professeur R. ECHEVIN. Ce fut donc pour moi un grand plaisir et un grand honneur de le voir accepter de faire partie de mon Jury de thèse. Qu'il veuille bien recevoir l'assurance de ma profonde reconnaissance.

Malgré la lourde charge que représente la réorganisation de son Service, M. le Professeur J. GAYET a bien voulu sacrifier de son précieux temps pour juger la valeur de ce travail ; je le prie d'accepter mes remerciements bien sincères.

Je suis très reconnaissant envers M. le Professeur L. FAGE, Membre de l'Institut, qui m'a toujours fait l'honneur de présenter mes publications à l'Académie des Sciences, et, à mes remerciements, je joins l'assurance de ma respectueuse admiration.

Je tiens également à remercier Messieurs les Professeurs P. DRACH et M. AVEL qui avaient successivement accepté d'assurer auprès de moi la responsabilité de parrains durant les trois années que j'ai passées au Centre National de la Recherche Scientifique.

Je remercie encore M. le Professeur G. TEISSIER, Directeur de la Station biologique de Roscoff, qui m'a autorisé à effectuer plusieurs séjours dans cette Station scientifique où le travail est si fécond et si agréable du fait de l'obligeance et de la compétence de tout son personnel ; c'est avec empressement que j'associe celui-ci à mes remerciements.

Enfin, l'exécution de ce travail doit beaucoup à tous mes Amis chercheurs et collaborateurs de l'Institut de Biologie de Nancy ; l'équipe que tous forment ainsi est sans égale par la bonne humeur, les liens amicaux et le soutien mutuel de chacun de ses membres ; je les remercie tous bien vivement du réel privilège que représente pour moi la participation à un tel ensemble.

INTRODUCTION

L'intérêt de l'étude des pigments a été reconnue depuis longtemps par les nombreux auteurs de toutes disciplines scientifiques qui l'ont déjà abordée. La Biologie, en particulier, doit retirer de précieux renseignements de l'étude de ces substances. En effet, comme l'a écrit VERNE (1926 a, p. IV), « Un pigment ne représente « autre chose qu'un stade naturellement coloré du métabolisme... de la substance « vivante... A partir de ce stade facile à observer en raison de son caractère physique, il semble que l'on puisse, dans de meilleures conditions, pénétrer les secrets « de ce métabolisme ».

Parmi les pigments, les caroténoïdes présentent une importance particulière bien mise en évidence par KARRER (1955, p. 166) : « Les caroténoïdes sont des « produits naturels qui ont un très grand intérêt non seulement en chimie mais « aussi en biologie. Certains de ces pigments se trouvent être des provitamines A, « d'autres des pigments rétinien et d'autres encore des substances de croissance ». Cependant, il reste encore beaucoup de choses à connaître de leurs fonctions biologiques et physiologiques. C'est pourquoi les caroténoïdes étant présents en très grande quantité et sous des formes très variées chez les Crustacés, j'ai pensé qu'une étude de ces corps chez le Crabe *Carcinus maenas* Linné se justifiait amplement.

Je me propose de rechercher et d'expliquer les différentes phases du métabolisme des pigments caroténoïdes de cet animal en fonction de son métabolisme général.

Ce travail, qui se veut d'ordre biologique, devra pourtant emprunter les voies de la physico-chimie et de la biochimie, du fait même des méthodes et techniques utilisées. N'étant moi-même nullement spécialiste de ces disciplines, je m'abstiendrai parfois de conclusions définitives, me contentant de citer les faits observés. D'ailleurs, BUSNEL et DRILHON (1948) ont bien montré les difficultés auxquelles se heurtait le chercheur aux moyens techniques et matériels limités s'engageant dans ce domaine réservé d'ordinaire à des équipes spécialisées.

Après quelques brèves indications sur le matériel objet de ces recherches, sur ses conditions d'élevage, je donnerai dans une première partie la définition et la constitution chimique des caroténoïdes tout en notant leurs principales propriétés. J'exposerai également l'essentiel des travaux déjà réalisés sur ces corps, chez les Crustacés en particulier.

La deuxième partie sera consacrée à la recherche, à la détermination et à la localisation dans l'animal des pigments caroténoïdes ; je décrirai les différents aspects de leur étude et je donnerai la nature et les propriétés des pigments que j'aurai isolés ; j'indiquerai ensuite la localisation de ces corps et leur présence dans les différents organes, tissus ou téguments de l'animal.

La troisième partie sera réservée au métabolisme de ces substances. Je montrerai d'abord leur origine et leurs transformations, l'action de certains organes sur elles et leur action sur ces organes. Enfin, j'analyserai l'influence de la mue et celle des éléments endocrines se trouvant dans les pédoncules oculaires. Bien souvent, l'aspect quantitatif sera envisagé en même temps que l'aspect qualitatif.

Une courte quatrième partie sera consacrée aux caroténoïdes de la Sacculine parasitant le Crabe et à l'action de cette dernière sur les pigments de l'hôte.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES D'ÉLEVAGE

I. — MATÉRIEL.

Ces recherches ont été effectuées sur le Crabe « enragé » *Carcinus maenas* Linné (1). C'est le « Crabe vert » de nos côtes. Les animaux provenaient soit de la Manche (Station biologique de Roscoff, Finistère), soit de la Mer Méditerranée (Station biologique de Sète, Hérault). La taille, le sexe ou le stade de mue des Crabes en expérience étaient fonction du travail envisagé ; je le préciserai dans le texte toutes les fois que cela sera nécessaire.

La récolte de ces animaux est facile. A Roscoff, à marée basse, ils sont nombreux sous les pierres ou dans les herbiers émergés. A Sète, ils sont capturés dans le filet des pêcheurs, ou par dragage dans les herbiers, ou à la main sur les rives. Le lieu d'origine de l'animal n'a d'ailleurs pas d'influence sur la nature des caroténoïdes ni sur leur métabolisme. C'est pourquoi je ne tiendrai pas compte, dans cet ouvrage, de l'existence de deux variétés raciales entre les animaux de ces deux régions (DEMEUSY et VEILLET, 1953 ; DEMEUSY, 1953).

II. — ÉLEVAGE.

Les animaux ont été maintenus en élevage dans des boîtes individuelles en matière plastique selon une technique mise au point dans notre laboratoire et détaillée par VEILLET et DEMEUSY (1951). Quelques modifications ont été apportées à cette installation dans le but d'assurer une eau plus oxygénée et plus propre pour les boîtes de fin de série.

Cette méthode d'élevage individuel est particulièrement intéressante pour le genre de travail réalisé ici. Chaque individu doit être en effet étudié séparément afin de pouvoir suivre le processus de l'évolution des pigments en fonction des différentes étapes qui marquent sa vie.

Ce travail a été réalisé en partie à la Station biologique de Roscoff où l'eau de mer abondante et pratiquement courante dans les laboratoires ne nécessite pas de précautions spéciales pour la survie des animaux.

Durant les périodes de travail à l'Institut de Biologie de Nancy, les animaux ont été maintenus en élevage dans de l'eau de mer circulant en circuit fermé. L'installation qui a été réalisée par les chercheurs et le personnel de l'Institut de Biologie a déjà été décrite par DEMEUSY (1958, pp. 265-267) (2). Certaines transformations ont, depuis lors, amélioré ce montage sans toutefois en modifier le principe.

De cette façon, j'ai pu suivre en élevage certains Crabes pendant plus de huit mois, ce qui est un délai satisfaisant. Les constantes physiques et chimiques de l'eau de mer circulant en circuit fermé sont surveillées de très près ; en effet, des modifications qui, à long terme, seraient dangereuses pour les animaux, sont susceptibles de se produire.

(1) *Carcinides* Rathbum (1897) = novum nomen pro *Carcinus* Leach (1814) (nec Latreille). Cependant, le terme *Carcinus* a été conservé.

(2) Thèse soutenue en Juin 1955.

III. — CONTROLE DE L'EAU DES ÉLEVAGES.

L'eau de mer utilisée provient de l'Étang de Thau (Hérault) ; la quantité dont nous disposons au Laboratoire est d'environ 150 hectolitres.

— Densité.

La densité de l'eau est maintenue autour de 1,027 à 17° C ; elle varie d'ailleurs très peu car toutes les boîtes et cuves sont, en général, constamment fermées et l'évaporation est, de ce fait, pratiquement nulle.

— Salinité.

La densité étant constante, la salinité l'est aussi. La chlorinité, vérifiée par la méthode de Knudsen au nitrate d'argent, est alors de 19,54 ‰ alors que l'eau de mer standard du Laboratoire hydrographique de Copenhague a généralement une chlorinité de 19,38 ‰.

Pour connaître la salinité de l'eau de mer du laboratoire, on peut appliquer la relation :

$$S \text{ ‰} = 0,030 + 1,8050 \text{ Cl ‰}$$

On obtient une salinité de 35,3 ‰.

— Vérification de la concentration des principaux sels.

Pensant enregistrer des variations importantes en fonction du temps, j'ai également vérifié la teneur de l'eau en Ca, Mg et SO_4 . Là encore, l'expérience montre que les constantes sont respectées, la quantité de ces éléments n'étant pratiquement pas modifiée. J'ai toujours trouvé environ 0,450 g/l pour Ca + Sr ; 1,300 g/l pour Mg et 2,900 g/l pour les sulfates.

Je signale, à titre indicatif, qu'il faut, pour faire de l'eau de mer artificielle, 0,397 g de Ca + 0,013 g de Sr = 0,410 g/l, 1,270 g de Mg et 2,648 de SO_4 .

— pH et oxygène de l'eau.

La concentration en ions hydrogène de l'eau est évidemment liée à sa concentration en gaz carbonique libre. Les animaux mis dans les boîtes d'élevage respirent, c'est-à-dire consomment une partie de l'oxygène de l'eau et y rejettent du gaz carbonique ; il en résulte une baisse de pH de plus en plus importante et qui peut devenir dangereuse pour les individus se trouvant dans les dernières boîtes par rapport à l'arrivée de l'eau. On sait en effet que les animaux marins sont sensibles à de légères variations de pH.

Pour mesurer le pH de l'eau de mes élevages, j'ai utilisé, de préférence au pH-mètre, la méthode expliquée par HARVEY (1949, p. 59) et basée sur l'étude d'une gamme colorée constituée par le mélange de Palitzsch.

A son arrivée au laboratoire, l'eau de mer a un pH de 8,2. Après un certain temps de passage dans les boîtes d'élevage, l'eau est à pH de 7,6. Par contre, l'eau de réserve non utilisée et gardée en récipient fermé maintient son pH à 8,2.

On montre facilement que la baisse de pH enregistrée dans l'eau des élevages résulte de la respiration des animaux.

En effet, à la sortie d'une série de 9 boîtes contenant chacune un Crabe de taille moyenne, le pH de l'eau n'est plus qu'à 7,6 alors qu'il était égal à 8 à l'entrée.

Si on prend deux boîtes contenant chacune de l'eau de mer à pH 8,2 et si, dans l'une d'elles, on place un Crabe de 3 cm de large, l'autre servant de témoin, au bout de 16 heures le pH de l'eau de la boîte témoin sera encore de 8,2 et, dans l'autre boîte, il sera tombé à 7,5.

Les variations de la teneur de l'eau en oxygène sont identiques et aussi significatives. L'analyse de l'oxygène a été faite par la méthode de DUSSART et FRANCIS BŒUF (1949) dérivée de la méthode de WINKLER.

L'eau contenant 5 ml d'O₂ par litre à son arrivée n'en contient plus que 3,15 ml à la sortie des élevages et 4 ml dans la cuve de récupération. Le barbotage des filets d'eau provenant des élevages et tombant dans la cuve de récupération provoque une réoxygénation. Nous avons accentué ce phénomène par une arrivée constante d'air comprimé fourni par un compresseur et se dégageant dans la cuve de récupération par des bougies de porcelaine. On sait en effet que plus le volume des bulles est petit, plus la surface totale de diffusion du CO₂ dans ces bulles sera grande. Le CO₂ est alors éliminé et l'équilibre de l'eau en O₂ se rétablit.

Après deux heures de réoxygénation, la quantité d'O₂ est de 5,77 ml par litre ; il y a donc sursaturation dans la cuve de récupération, mais il y a stabilisation à 5 ml/l dans la grande cuve réservoir, le pH étant alors de 8,2.

On voit donc que l'élevage des animaux dans de l'eau de mer en circuit fermé devient possible grâce à la réoxygénation de cette eau.

La synthèse artificielle de certains caroténoïdes a été réalisée par différents auteurs dont on trouvera les principales références chez KARRER (1955, p. 167) et par ISLER et ZELLER (1957), ce qui a permis de mieux les connaître et de prévoir certaines de leurs propriétés.

La longue chaîne de doubles liaisons conjuguées laisse prévoir une assez grande fragilité de ces molécules qui se détruisent en produits incolores ou se transforment en stéréoisomères cis-trans ayant des propriétés très peu différentes.

La forme entièrement « trans » est la plus répandue, mais des stéréoisomères mono- et poly-cis existent à l'état naturel ; c'est la double liaison centrale de ces molécules symétriques qui paraît la plus sensible au phénomène d'isomérisation.

Ces différentes formes ont été reproduites expérimentalement par quelques chercheurs et MEUNIER, JOUANNETEAU, ZWINGELSTEIN (1951) puis GRANGAUD, CHARDENOT (1956) ont montré leur formation par action de certains facteurs physiques ou chimiques. Ces mêmes facteurs seront susceptibles d'intervenir au cours de mes manipulations de solution ; il me sera alors impossible de préciser si ces dérivés existent effectivement chez l'animal ou si leur présence est accidentelle.

Les pigments caroténoïdes sont solubles dans les graisses et plus ou moins dans la plupart des solvants organiques. La majorité d'entre eux sont insolubles dans l'eau, mais certains peuvent former avec des protéines un complexe chromoprotéique qui est alors hydrosoluble. Dans l'animal, ils sont donc dissous dans les graisses ou combinés à des protéines.

II. — TRAVAUX ANTÉRIEURS.

A. — *Sur les pigments caroténoïdes en général.*

Les premières références concernant les caroténoïdes se situent en 1831 par la découverte du β -carotène par WACKENRODER. Puis, parmi d'autres auteurs, citons ZOPF (1893) qui entreprend une étude chimique de la « carotène jaune » et de la « carotène rouge ». Mais la première étude appréciable sur leur biochimie est l'œuvre de PALMER, en 1922. Par la suite, les recherches se sont amplifiées et perfectionnées, les publications se sont multipliées, et on peut citer comme principaux ouvrages :

- Celui de ZECHMEISTER (1934) donnant les dernières précisions, pour l'époque, sur la chimie de ces substances ;
- L'intéressant travail de LEDERER (1935) sur les caroténoïdes des animaux ;
- L'important livre de KARRER et JUCKER (1948) (traduit en anglais et révisé en 1950 par BRAUDE), documentation détaillée des propriétés de ces pigments, auxiliaire indispensable à tout chercheur s'intéressant à ces questions ;
- Les publications de MACKINNEY (1952) ;
- Les travaux de GOODWIN (1952 a) établissant une revue complète et comparée de leur biochimie et montrant l'intérêt sans cesse rebondissant de la connaissance des caroténoïdes (1955), etc...

Ainsi, malgré les lacunes qui subsistent encore et les difficultés soulevées par leur étude, les pigments caroténoïdes sont de mieux en mieux connus et les publications les concernant de plus en plus nombreuses.

B. — *Sur les pigments caroténoïdes des crustacés.*

Les travaux réalisés sur les caroténoïdes des Crustacés sont presque aussi anciens que la découverte des pigments. En 1872, POUCHET isole, à partir du

Homard, un pigment cristallisable en violet, dont la nature exacte n'est pas déterminée. Puis, JOLYET et RENARD (1877) découvrent le pigment rouge du sang des Crustacés. Ce pigment rouge a reçu des noms variés selon les auteurs : crustacéo-rubine de MOSELEY (1877), zoon-érythrine signalée chez un grand nombre de Crustacés par MEREJKOWSKY (1881), vitello-rubine de MALY (1881) et tétron-érythrine de Mac MUNN (1883).

Le terme « zoonérythrine » est repris par HEIM (1892) qui parle, en outre, de pigment jaune et place ces deux sortes de pigments dans la classe des lutéines.

SMITH (1911), 1913) mentionne, chez *Carcinus maenas*, la présence de deux lipochromes : la tétronérythrine et la lutéine. En 1916, VEGEZZI étudie le pigment rouge des Crustacés et conclut que ce pigment représente un mélange de pigments analogues. C'est ensuite la thèse de VERNE (1921) dont une partie importante est consacrée à la zooérythrine et à d'autres pigments qui doivent lui être associés. En 1926 (a), le même auteur publie un volume sur les pigments dans l'organisme animal, où une large part est consacrée, sous plusieurs aspects, aux caroténoïdes des Crustacés. En 1926 et 1928, ABELOOS et FISCHER étudient l'origine, la migration et l'absorption des pigments caroténoïdes par *Carcinus maenas*. La nature et la chimie des pigments étant encore peu connues à cette époque, ils s'en tiennent uniquement à des observations d'ailleurs fort intéressantes. Jusqu'à cette époque, les auteurs français utilisaient le terme « carotinoïde ».

Pour la première fois, en 1931, LONNBERG signale le carotène chez *Carcinus maenas* sans donner plus de précision, et il faut attendre 1933 pour voir KUHN et LEDERER établir la présence de l'astacine, « caroténoïde différent de ceux des végétaux », dans la carapace et les œufs de Homard. En 1934, BROWN indique, chez *Palaemonetes sp.*, un pigment jaune épiphastique et un pigment rouge hypophasique dont il étudie les propriétés d'absorption en remarquant que les courbes ont des formes variables selon les proportions des deux pigments. LEDERER (1938 a) publie alors que l'astacine est le pigment principal des Crustacés Décapodes où il trouve en outre un peu de α et de β carotène, puis KUHN et SORENSEN (1938) démontrent l'existence de l'astaxanthine et ses relations de structure avec l'astacine.

Par la suite, les méthodes et le matériel de recherches s'étant améliorés les travaux sur les pigments des Crustacés se développent et les noms de GOODWIN et SRISUKH (1949 a), GOODWIN (1951), de GRANGAUD, CHECHAN, MASSONET (1950), CHECHAN, GRANGAUD, MASSONET (1950), ceux de FISHER, KON, THOMPSON (1952), (1953), (1954), (1955), (1957), etc... sont les plus souvent cités dans la bibliographie concernant cette question. Pourtant, à ma connaissance, depuis LONNBERG (1931), aucun auteur n'a indiqué en détail, ni étudié de façon précise, les pigments caroténoïdes de *Carcinus maenas*. Dans les ouvrages de KARRER et JUCKER (1948, pp. 83-84), de GRANGAUD (1951, p. 16) ou de GOODWIN (1952 a, p. 181), si on consulte les tableaux pourtant très documentés donnant la distribution des différents caroténoïdes chez les Crustacés, on constate qu'aucune autre indication concernant *Carcinus maenas* ne peut être trouvée.

D'ailleurs, les progrès de nos connaissances dans le domaine des pigments — en particulier la découverte de certains « caroténoïdes mineurs » (NICOLA, 1954 a) pouvant être considérés comme des intermédiaires dans la transformation des pigments — accentuent encore la nécessité de reprendre l'étude de ce sujet et de combler cette lacune. Il faudrait en outre essayer de comprendre le métabolisme des pigments en suivant leurs réactions suivant les étapes de la vie de chaque animal élevé individuellement.

DEUXIÈME PARTIE

**RECHERCHE, NATURE, LOCALISATION
DES PIGMENTS CAROTÉNOIDES DANS L'ANIMAL**

Avant d'aborder l'aspect biologique de ce travail, il est nécessaire de connaître la nature et les propriétés des pigments étudiés. Il faut donc tout d'abord examiner les manipulations et les méthodes utilisées pour les extraire, les séparer et les déterminer ; il nous sera plus facile alors de les retrouver dans les tissus ou organes de l'animal et d'analyser leur comportement. La relative fragilité des molécules de ces corps, leur sensibilité à l'oxygène et, surtout, les phénomènes d'isomérisation accidentelle déjà évoqués plus haut (p. 7) en relation avec le temps, la température, l'action de certains agents chimiques, de la lumière, nous obligent à certaines précautions : l'étude du pigment devra se faire rapidement, si possible à l'abri de l'air. Si une conservation est nécessaire, elle devra être de courte durée et se faire à l'obscurité et au froid ; on évitera ainsi au maximum l'altération ou la modification du pigment.

CHAPITRE I

RECHERCHE DES PIGMENTS

Elle repose sur une méthode d'étude utilisée avec quelques adaptations personnelles par de nombreux chercheurs (LEDERER 1938 a) et comportant divers procédés d'extraction et de séparation des différents constituants des mélanges obtenus.

A. — EXTRACTION.

Elle se fait en général par l'acétone qui facilite la dissolution des pigments en déshydratant le tissu, mais peut se présenter sous des aspects variés. Un traitement préalable, variable selon la nature du tissu à étudier ou l'expérience à réaliser, sera quelquefois nécessaire.

Ainsi, les pièces calcifiées sont d'abord décalcifiées par HCl dilué, puis rincées à l'eau distillée. Ce traitement est indispensable pour extraire la totalité du pigment qui resterait par adsorption sur le CO_3Ca . On peut constater que l'acide n'a pas d'action sur le pigment dans les conditions de l'expérience : des extractions faites sur des carapaces non encore calcifiées, immédiatement après la mue, ne nécessitant donc pas le traitement par HCl ont donné les mêmes résultats que sur des carapaces calcifiées traitées par l'acide. Le phénomène d'autoxydation de certains caroténoïdes sous l'action d'acide, observé par BODEA, NICOARA, MECEA (1957) ne se produit donc pas ici.

Les tissus ou organes mous sont dilacérés par action d'un broyeur cellulaire ou par broyage au mortier avec du sable de Fontainebleau en présence du solvant.

Le matériel dont on doit extraire le pigment est ensuite épuisé par l'acétone en plusieurs fractions jusqu'à ce que la solution soit incolore ; on filtre et on mélange les fractions acétoniques. Cette solution est agitée avec de l'éther de pétrole et de l'eau dans une ampoule à décanter ; après repos, deux phases se séparent et les pigments se trouvent à la partie supérieure dans l'éther de pétrole. Il faut, au besoin, recommencer plusieurs fois cette opération pour extraire tout le pigment, mais l'acétone aqueuse reste toujours légèrement jaunâtre par la présence de corps colorés de nature différente. La solution d'éther de pétrole est lavée soigneusement à l'eau distillée pour enlever toute trace d'acétone, puis séchée, sauf exception signalée plus loin (p. 13) sur du SO_4Na_2 anhydre. Le lavage à l'eau distillée produit, avec certains extraits, des émulsions importantes, très difficiles à résorber ; il faut alors, comme l'indique DOUIN (1953, p. 783), rincer d'abord avec du sulfate d'ammonium à 20 %, ce qui accélère la décantation. Si besoin est, la solution peut ensuite être concentrée sous vide à l'abri de la lumière.

En 1955 (a), j'ai signalé aussi la possibilité d'extraire certains pigments de la carapace sans action préalable de l'acide chlorhydrique, le tégument étant broyé dans l'acétone, soit directement, soit après séjour dans une solution de SO_4Am_2 à 35 %.

B. --- SAPONIFICATION.

Dans certains cas, des caroténoïdes existent sous forme d'esters en combinaison avec des acides gras ; il faut donc les saponifier si on désire les obtenir à l'état libre.

La solution du pigment dans l'éther de pétrole est alors additionnée d'une quantité égale de méthanol 15 % potassique ; on ajoute autant d'alcool éthylique absolu qu'il en faut pour obtenir une solution homogène. puis on laisse à la température de la pièce, à l'obscurité. Au bout de quatre heures, on dilue avec une grande quantité d'eau et on ajoute de l'acide acétique ; il se forme alors deux phases. En présence d'une quantité suffisante d'éther de pétrole, tout le pigment passe dans la phase supérieure éthéro-pétrolique qui est alors isolée, rincée puis séchée sur SO_4Na_2 anhydre.

Cette saponification n'est pas toujours possible car elle provoque, en présence d'oxygène, une autoxydation de certains pigments qui sont alors dénaturés.

C. — FRACTIONNEMENT.

Divers procédés permettent d'isoler les pigments constituant le mélange obtenu par extraction. Le comportement des molécules de caroténoïdes vis-à-vis de ces méthodes de séparation basées sur les différences de constitution chimique des corps analysés permet en partie de prévoir leur nature.

1. — PARTAGE ENTRE SOLVANTS.

Depuis les travaux de WILLSTÄTTER et STOLL (1913), on sait qu'il est possible de séparer les pigments caroténoïdes d'une solution, selon leur solubilité, par partage entre deux solvants non miscibles.

PETRACEK et ZECHMEISTER (1956) ont défini, pour de nombreux caroténoïdes, le « coefficient de partage » qui dépend de certains groupes fonctionnels.

Les deux solvants utilisés sont généralement l'éther de pétrole pur et le méthanol à 90 % de densité 0,830 à 15° C ; ce dernier est préparé en mélangeant 90 volumes d'alcool méthylique absolu avec 10 volumes d'eau mesurés séparément (ALLPORT, 1947).

Pratiquement, on agite dans une ampoule à décanter la solution de pigment dans l'éther de pétrole avec la même quantité de méthanol à 90 % puis on laisse reposer. Il se forme alors deux phases : l'épiphase au-dessus, constituée par l'éther de pétrole, et l'hypophase en dessous, constituée par le méthanol.

Les pigments épiphasiques sont les caroténoïdes hydrocarbures et les esters de certains caroténoïdes oxygénés.

Les pigments hypophasiques sont ceux qui ont deux groupes hydroxyles ou plus (poly-hydroxy-caroténoïdes). Les mono-hydroxy-caroténoïdes sont en partie épiphasiques et en partie hypophasiques ; dans ce cas, les deux phases sont colorées.

Sans être rigoureuse ni absolue, cette technique, qui aide à la séparation de groupes de pigments caroténoïdes, permet donc aussi un début d'identification.

2. — CHROMATOGRAPHIE.

Cette méthode d'analyse, fondée sur une différence d'adsorption, c'est-à-dire de fixation des molécules d'un mélange complexe sur un substrat convenable, permet, dans certaines conditions, la séparation qualitative et quantitative ou la purification de substances organiques ou minérales colorées ou incolores.

C'est un botaniste russe, TSWETT, qui, en 1906, découvre et met au point les principes de la chromatographie dont il publie les détails en 1910.

L'intérêt de cette méthode, dont on trouvera les données très complètes dans le livre de E. LEDERER et M. LEDERER (1953), tient à ce que la plus petite modification dans une molécule entraîne une grande modification de son comportement chromatographique, ce qui est appréciable pour l'étude des caroténoïdes. D'ailleurs, c'est depuis que KUHN et LEDERER (1931) ont réutilisé la méthode chromatographique que nos connaissances sur les pigments caroténoïdes ont connu un grand développement et fait de grands progrès.

a) Description de la méthode.

Il existe évidemment plusieurs méthodes et techniques de chromatographie s'adaptant à chaque problème posé dont COSTES (1958) fournit une critique justifiée de quelques-unes d'entre elles. J'ai utilisé celle de SERVIGNE, GUERIN de MONTGAREUIL, PINTA (1951) particulièrement indiquée pour mes recherches, en y apportant certaines modifications.

Pratiquement, cette méthode consiste à faire passer la solution du pigment dans l'éther de pétrole au travers d'une colonne d'adsorbant de qualité et de quantité variables. Cette colonne retient plus ou moins fortement les différents caroténoïdes sous forme de bandes ou de zones diversement colorées. On peut parfaire le « développement du chromatogramme », c'est-à-dire la séparation de ces zones, en continuant à laver la colonne avec le même solvant ou en modifiant légèrement ou totalement la nature de celui-ci. Lorsque les différentes zones sont bien individualisées, il faut récupérer chacune d'elles ; il y a deux possibilités : fractionner la colonne en autant de tronçons qu'il y a de bandes et récupérer les pigments par des solvants appropriés, ou bien éluer les diverses bandes les unes après les autres. L'élution consiste à poursuivre le développement des bandes par des éluants spécifiques (solvants différents ou mélange de solvants). Ces éluants se fixent sur l'adsorbant à la place du pigment permettant à celui-ci de traverser complètement la colonne ; on recueille alors séparément les solutions à la sortie du tube de chromatographie.

La position des pigments sur la colonne, leur sensibilité aux divers éluants étant en rapport avec leur constitution moléculaire, leur identification, déjà amorcée par leurs propriétés de partage, est encore un peu plus nette.

Certains pigments sont pourtant difficiles à séparer sur la même colonne ; c'est pourquoi le choix de l'adsorbant et des solvants est très important. Il faut rechercher empiriquement les meilleures conditions et le meilleur matériel en utilisant la gamme des nombreux adsorbants et éluants possibles pour obtenir la séparation totale de chaque constituant du mélange.

— *Adsorbants.*

L'alumine est un des adsorbants les plus fréquemment employés pour la chromatographie des caroténoïdes. Son activité est liée, en particulier, à son hydratation ; il faut donc connaître parfaitement celle-ci pour se placer toujours dans les mêmes conditions de séparation, une variation très faible pouvant amener un bouleversement complet du chromatogramme.

On utilise une « alumine de base » complètement déshydratée, obtenue en chauffant l'alumine de chromatographie du commerce dans un flacon en verre Pyrex et en agitant constamment pour éliminer toute trace d'eau. On ajoute ensuite après refroidissement en atmosphère sèche, la quantité d'eau distillée nécessaire pour obtenir l'hydratation désirée, puis on secoue le flacon pendant 20 minutes pour homogénéiser l'adsorbant qui est alors prêt à être utilisé. Son activité est vérifiée par la quantité de rouge Cérol adsorbé par un poids connu de cette alumine ; cette quantité doit être invariable pour un titre d'hydratation déterminé.

Après différents essais, j'ai été amené à utiliser pour mes recherches l'alumine Prolabo hydratée à 5 % et l'alumine Merck d'activité I (d'après BROCK-

MANN et SCHODDER, 1941). Pour simplifier l'exposé, j'utiliserai dorénavant, dans cet ouvrage, les abréviations Al_2O_3 P.L. 5 % et Al_2O_3 M.I pour désigner ces deux adsorbants.

L'utilisation de l'alumine peut provoquer des phénomènes d'isomérisation déjà signalée (p. 7), des réactions secondaires (LEDERER, 1955) et des réactions d'oxydation puisque certains caroténoïdes sont sensibles à l'action des oxydes métalliques (MEUNIER, JOUANNETEAU, ZWINGELSTEIN, 1950), (GRANGAUD et CHAR-DENOT, 1957). En outre, cet adsorbant a été inefficace pour certaines extractions. Pour ces raisons, la chromatographie a été effectuée, dans certains cas, sur des colonnes longues et bien tassées de CO_3Ca . Le saccharose essayé plusieurs fois ne m'a pas donné de résultats satisfaisants.

J'ai aussi utilisé comme adsorbant le SO_4Na_2 anhydre. J'avais en effet remarqué, en séchant certaines solutions de pigment sur de petites colonnes de ce sel, qu'il se formait des bandes colorées témoignant l'adsorption de certains pigments, modifiant donc la composition des solutions. Ceci explique que tous les extraits ne peuvent être séchés sur SO_4Na_2 comme je l'ai signalé page 10. SERVIGNE et Coll. (1951, p. 55) avaient déjà observé ce phénomène.

Par ailleurs, la chromatographie sur papier ayant été appliquée aux caroténoïdes par quelques chercheurs (STRAIN, 1949, l'utilise le premier pour la séparation des chlorophylles et des xanthophylles), je l'ai essayée en employant différentes techniques.

Ce procédé a l'avantage de ne pas provoquer l'isomérisation ou l'oxydation des pigments se produisant sous l'influence des autres adsorbants, mais il est difficilement quantitatif. J'ai pensé alors allier les avantages de la chromatographie de partage sur papier à ceux de la chromatographie sur colonne en faisant des colonnes de cellulose en poudre. Tous les essais se sont soldés par des échecs, aucun pigment n'étant retenu sur la colonne malgré divers traitements de la cellulose. Pourtant, COSTES (1958) a, depuis, signalé une méthode de séparation des caroténoïdes foliaires sur colonne de cellulose. Mais il reconnaît lui-même que « L'inconvénient « majeur de cette séparation sur cellulose est de ne pas réaliser une résolution « totale des caroténoïdes ». Elle permet seulement une séparation en groupes chimiques.

La chromatographie sur papier est assez délicate à utiliser pour les caroténoïdes, comme le montre NUNEZ (1954) ; la composition du solvant mobile est difficile à définir et doit être rigoureusement fixée, ce qui, d'après cet auteur, limite les possibilités de la méthode à la séparation de substances de solubilité très proche. Je pense en outre que, dans le cadre de mes recherches, la chromatographie circulaire sur papier adaptée par WITTMANN (1957) aux caroténoïdes, ne présente pas plus d'intérêt. C'est donc simplement, selon l'avis de BAUER (1952), pour compléter la séparation classique sur colonne que j'ai utilisé, dans certains cas, la chromatographie sur papier.

A. JENSEN et S.-L. JENSEN viennent de décrire dernièrement une autre méthode de chromatographie circulaire des caroténoïdes. La publication en est très récente (1959) et je n'ai pas encore eu l'occasion de l'essayer.

— *Eluants.*

L'absolue pureté des éluants est d'une importance capitale car la plus infime trace d'impureté peut entraîner des altérations et des modifications du chromatogramme.

Le plus largement employé, à la fois comme solvant et comme premier éluant, est l'éther de pétrole, défini comme un mélange d'hydrocarbures légers non cycliques, saturés, de densité 0,65 à 20° C, de point d'ébullition compris entre 40° et 60° C. Il faut, avant de l'utiliser, le déshydrater, éliminer les impuretés et la plus grande

partie des peroxydes en le faisant passer sur une assez grande colonne « d'alumine de base » (DASLER et BAUER, cités par LEDERER, 1949, p. 30).

Les autres éluants sont, dans l'ordre d'utilisation :

- l'éther de pétrole additionné d'une quantité croissante de méthanol, 0,5 %, 1 %, 5 %, ce qui revient, dans ce dernier cas, à saturer l'éther de pétrole par l'alcool ;
- l'éther de pétrole additionné de 10 % d'acide acétique ;
- le méthanol 5 % potassique utilisé le dernier car il peut altérer certains pigments.

J'ai également essayé des mélanges de plusieurs autres solvants : éther sulfurique, acétone, benzène, chloroforme, pyridine, etc... mais, quelles que soient les proportions respectives, les résultats ne furent pas supérieurs.

b) Technique de travail et matériel.

— *Chromatographie sur colonne*

Le matériel est décrit par SERVIGNE et Coll. Il consiste (fig.1), en un

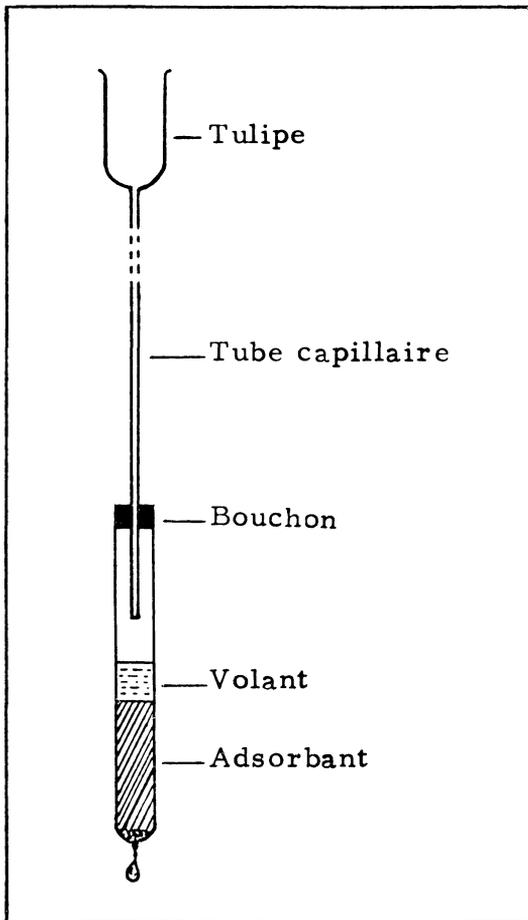


Fig. 1. — Dispositif de chromatographie sur colonne.

tube de verre de 1 cm. de diamètre et de 15 à 20 cm. de longueur ; l'ouverture inférieure rétrécie n'a que 0,5 cm. de diamètre ; on la bouche avec un léger tampon de coton que l'on étire au-dehors pour former une sorte de mèche. On introduit dans ce tube l'adsorbant dont la quantité et la qualité sont fonction de la solution à étudier (généralement 1 à 2 grammes d'alumine) ; on remplit le tube d'éther de pétrole et, tout en maintenant les deux extrémités bouchées, on agite fortement l'ensemble pour bien homogénéiser la colonne et en éliminer totalement l'air. On maintient ensuite le tube verticalement et on tapote sa surface extérieure : l'adsorbant se dépose régulièrement, se tasse et la partie supérieure de la colonne se régularise. On ajuste alors à l'extrémité du tube (voir fig. 1) un bouchon raccord en caoutchouc traversé par un tube capillaire de 0,3 cm. de diamètre intérieur et de 55 cm. de longueur, terminé par une partie évasée en forme de tulipe. Ce dispositif permet, en remplissant le capillaire et la tulipe, d'assurer une pression constante et relativement importante sur la colonne. En laissant sortir une partie de l'air emprisonné

dans le tube au-dessus de la colonne, on ménage, sur l'adsorbant, une hauteur de liquide de 1,5 cm. environ appelée volant. Ceci permet de maintenir l'alumine constamment mouillée pendant l'analyse et d'éviter des remous à sa surface.

On verse successivement dans la tulipe le solvant pur, puis la solution à analyser, enfin les différents éluants. Pour éviter le mélange des solutions, on laisse le tube capillaire se vider en partie avant de verser chacun des liquides ; il s'interpose ainsi une bulle d'air entre deux solutions différentes. A la sortie de la colonne, les gouttes se forment à l'extrémité de la mèche de coton, ce qui évite une trop grande perte de pigment par capillarité et évaporation le long des parois du tube que l'on rince d'ailleurs après le passage de chaque bande. Lorsqu'on exécute la chromatographie sur CO_3Ca , il n'est pas nécessaire d'utiliser le tube capillaire, l'éluant se faisant assez rapidement sans pression auxiliaire.

Ce montage simple et pratique permet de recueillir facilement à la sortie du tube, dans un petit récipient les solutions qui ont traversé la colonne ; il est facile de changer rapidement de récipient après le passage de chaque bande ou d'une quantité jaugée de liquide.

Nous avons déjà signalé qu'il n'était pas toujours nécessaire d'éluer séparément chaque bande. Après le développement du chromatogramme, quand il n'y a plus d'éluant dans le tube, on peut sortir la colonne en faisant pression à la partie inférieure et découper les différentes régions colorées pour reprendre les pigments dans des solvants spécifiques. Il est préférable dans ce cas d'utiliser des tubes en chlorure de polyvinyle que l'on coupe au rasoir dès que les bandes sont bien distinctes (VEVERS et MILLOTT, 1956). Il faut évidemment s'assurer au préalable qu'il n'y a pas réaction entre les solvants et la matière plastique.

— Chromatographie sur papier

La méthode la plus simple est celle de GRANGAUD et GARCIA (1952 a) basée sur le phénomène d'ascension capillaire et dérivée de la méthode de WILLIAMS, KIRLY (1948). Je l'ai utilisée de la façon suivante :

Sur une bande de papier Whatman n° 1 de 24 centimètres de hauteur et de 4 à 6 centimètres de largeur, à 3 centimètres environ du bord inférieur, on dépose le pigment en solution concentrée dans l'éther de pétrole. On sèche rapidement et on place le papier dans une grande éprouvette cylindrique hermétiquement fermée, le bord inférieur de la bande trempant, sur une hauteur de 1 cm., dans l'éther de pétrole ou dans un autre solvant se trouvant au fond de l'éprouvette.

Au cours de son ascension dans le papier, le solvant entraîne plus ou moins vite les pigments qui se séparent en larges bandes. Il faut plusieurs heures à l'obscurité pour obtenir une bonne séparation. On découpe alors le papier suivant les bandes et on redissout les caroténoïdes. Il faut prendre soin que l'extrait à chromatographier soit bien desséché car l'humidité empêche l'ascension des bandes.

GRANGAUD et GARCIA (1952 b) montrent que la méthode est surtout valable pour les caroténoïdes à noyaux oxygénés ; ils n'ont pas réussi à séparer les carotènes.

J'ai alors essayé la méthode préconisée par DOUIN (1953) : le pigment est déposé à la base d'une bande humide de papier Durieux n° 147 trempant dans du méthanol à 100° placé dans un tube perforé de nombreux trous. L'ensemble est placé en atmosphère humide dans une cuve fermée. Les caroténoïdes se séparent en fonction de leur solubilité dans le méthanol qui, au cours de son ascension, est de plus en plus hydraté. Cependant, DOUIN (1956) fait remarquer que les impuretés de nature lipidique rendent difficile la montée des bandes ; or, j'ai souvent des graisses dans mes solutions et je ne peux pas toujours les saponifier.

En raison de toutes ces restrictions, je n'ai utilisé que très rarement la chro-

matographie de partage, quand toutes les ressources de la chromatographie sur colonne étaient épuisées.

D. — DÉTERMINATION.

1. — COURBE D'ÉLUTION.

Après l'extraction des pigments et avant de rechercher la nature de chacun d'eux, il est nécessaire de connaître leur nombre dans le mélange, et les conditions exactes de leur séparation. Il faut donc établir une courbe d'élution de l'extrait, qui figurera le résultat de son examen chromatographique.

L'extrait éthéro-pétrolique est chromatographié sur colonne d'alumine. On recueille les éluats dans des fioles jaugées de 5 à 10 ml selon les cas. La solution est ainsi fragmentée en volumes unitaires ; le débit d'écoulement étant constant, ils serviront à compter le temps (SERVIGNE et Coll., 1951) et la place de chaque pigment dans le déroulement de l'élution. On change d'éluant lorsque les bandes colorées restent sur la colonne ne descendent plus. Les numéros d'ordre chronologique des fioles sont portés en abscisses du graphique. Les ordonnées sont les concentrations du contenu de chaque fiole, définies optiquement au photocolorimètre de Bonet et Maury (écran Wratten n° 35).

L'étude de la courbe d'élution ainsi obtenue permet plusieurs conclusions :

— Chacun des constituants du mélange se comportant, dans une certaine mesure, comme s'il était seul, le nombre de maxima indique le nombre de caroténoïdes élués séparément et leur position respective dans l'ordre d'élution.

— Les concentrations les plus basses entre les maxima révèlent le degré de sélectivité de l'analyse. Si elles ont la même valeur que celle du solvant pur, la séparation peut être considérée comme complète ; sinon, il y a mélange des pigments. Sur les pigments supposés purs, ou sur les mélanges, on réalise d'autres chromatographies en modifiant les conditions de l'opération. L'analyse de la forme de ces nouvelles courbes d'élution peut confirmer ou ne pas confirmer les premières conclusions ; cela permet d'accroître l'efficacité de la méthode en l'adaptant aux résultats recherchés.

La figure 2 (p. 17) montre en exemple une courbe d'élution d'un extrait total de Crabe ♀.

La solution initiale est de 200 ml en éther de pétrole ; la chromatographie est faite à partir de 10 ml de cette solution sur 1,5 g d'alumine Prolabo hydratée à 15 %. Les éluants ont été successivement l'éther de pétrole pur puis additionné de 0,2 % de méthanol, de 1 % de méthanol et, enfin, de 10 % d'acide acétique.

On remarque qu'il y a 4 pigments ou groupes de pigments différents. Le premier (fioles 1 à 6) et le dernier (fioles 30 à 36) sont bien séparés des deux autres ; ceux-ci, par contre, se trouvent en partie mélangés puisque la fiole 18 est plus concentrée que le solvant pur (fiole 0). D'autres chromatographies ont permis de les isoler complètement et de mettre en évidence le caractère hétérogène des solutions de caroténoïdes paraissant pures d'après la courbe. Comme le faisait remarquer SERVIGNE, la méthode a « une efficacité limitée à un nombre fini et souvent très restreint de constituants ».

2. — SPECTROPHOTOMÉTRIE.

Les pigments séparés, il reste à définir leur nature par étude de leurs propriétés d'absorption au spectrophotomètre. On trouvera les principes et l'essentiel de la technique dans « Spectrophotometry and Colorimetry » de BRÔDE (1950).

On sait qu'un corps traversé par un rayonnement absorbe une quantité variable de l'intensité de ce rayonnement. La perte d'énergie varie avec la longueur

d'onde λ du rayonnement utilisé ; elle dépend de la concentration ou de l'épaisseur du corps traversé ainsi que de la structure de sa molécule. Par une étude qualitative, nous pourrions déterminer la nature des pigments, tout au moins pour ceux dont la nomenclature a déjà été établie, ainsi que les modifications intervenant dans leur structure ; la constance des propriétés d'absorption après différents traitements nous dira si un caroténoïde est pur ou non. FIESER (1950) a défini des équations empiriques permettant de calculer les maxima d'absorption des pigments caroténoïdes ; mais ces données purement chimiques débordent le cadre de ce travail. Une étude quantitative permettra d'apprécier la concentration des pigments.

Mes recherches ont été effectuées avec le spectrophotomètre de Beckman, type « DU » de la Station Biologique de Roscoff et avec le spectrophotomètre électronique Jobin et Yvon, type « Algérie », de notre laboratoire. Les résultats qualitatifs et quantitatifs fournis par ces deux appareils se sont révélés concordants.

Les études ont été faites dans le spectre visible entre 390 μ et 550 μ puisque les propriétés d'absorption dans l'ultra-violet ne sont pas caractéristiques pour les caroténoïdes (KARRER et WURGLER, 1943).

Les valeurs de l'absorption de la solution sont données en Extinction = E (Synonyme de Absorption = A, ou de Densité optique = D). Elles sont enregistrées automatiquement sur un cadran de lecture. Il faut tenir compte de l'absorption du solvant en faisant le « zéro » sur une cuve de référence contenant du solvant pur (hexane ou éther de pétrole en général).

a) Etude qualitative.

Par comparaison des valeurs de l'extinction portées en ordonnées en fonction des longueurs d'onde portées en abscisses, on établit une courbe d'absorption

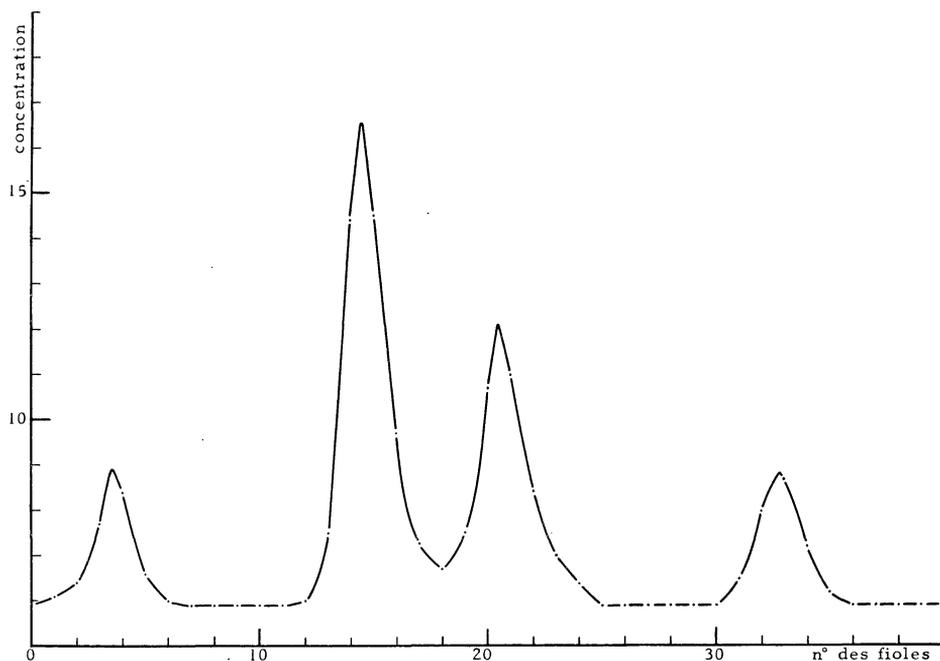


Fig. 2. — Exemple de courbe d'élution d'un extrait total dans l'éther de pétrole

qui est caractéristique du corps étudié, compte tenu de la nature du solvant. La forme de cette courbe dépend des « chromophores » de la molécule, c'est-à-dire de certains groupements d'atomes dans la molécule.

Exemple : — En général, les caroténoïdes ont une courbe d'absorption à 3 maxima, mais on sait que celle d'un caroténoïde ayant un ou plusieurs groupements CO n'a qu'un seul maximum.

— Plus il y a de doubles liaisons conjuguées, plus la courbe est décalée vers les hautes longueurs d'onde, etc... (voir KARRER et JUCKER, 1948, pp. 53-59).

b) Etude quantitative.

C'est une application de la loi de Lambert-Beer qui aboutit à la formule :

$$E = kcd \text{ d'où } c = \frac{E}{kd}$$

sachant que :

c = concentration du pigment dans la solution ;

k = coefficient d'extinction spécifique d'une solution standard ramenée à l'unité de poids et d'épaisseur pour une λ donnée qui est celle de la plus grande absorption ;

d = épaisseur en centimètres de l'échantillon analysé ;

E = extinction du pigment analysé à la même λ que k et dans le même solvant.

Les cuves mesurant exactement 1 cm de largeur intérieure, la solution a donc 1 cm d'épaisseur. On mesure l'extinction du pigment à analyser à la longueur d'onde d'extinction maximum et, si on connaît k , on en déduit la concentration.

Pour le β carotène, l'extinction d'une solution de 1 g de pigment dans 100 ml de solvant (hexane) sous une épaisseur de 1 cm, étudiée à 4.500 Angström de longueur d'onde, est de 2580 (GOODWIN, 1952 c). Le même auteur (1952 d) indique aussi la valeur de 2590. Pour mes recherches, j'ai utilisé une extinction spécifique, k , égale à 0,26, correspondant à une solution de 1 μ g (millième de milligramme = γ) par millilitre. J'ai donné toutes les concentrations en μ g par gramme de tissu, en appliquant la formule :

$$c^{\mu\text{g/g}} = \frac{E \times V \text{ ml}}{0,26 \times P\text{g}}$$

Dans certains cas, j'ai employé ces mêmes données pour analyser quantitativement des mélanges de pigments. Les chiffres ainsi obtenus n'ont évidemment aucune valeur intrinsèque et ne sauraient indiquer en aucun cas la quantité réelle de caroténoïde se trouvant dans la solution. Ils permettent cependant des comparaisons très valables et très intéressantes entre différents extraits traités et analysés de la même façon.

CONCLUSION

L'extraction des pigments des animaux fournit une solution complexe. La séparation en ses différents constituants est obtenue après des manipulations variées pouvant comporter une saponification, un partage entre divers solvants et une ou plusieurs chromatographies. Les pigments isolés, ou même quelquefois les mélanges simples ainsi obtenus, sont étudiés quantitativement et qualitativement au spectrophotomètre pour déterminer leur importance relative et leur nature.

CHAPITRE II

NATURE ET PROPRIÉTÉS DES PIGMENTS TROUVÉS

La détermination de la nature exacte des pigments caroténoïdes extraits d'un animal ou d'un de ses organes ou tissus présente des difficultés variables, quelquefois très importantes, pour certains d'entre eux. De nombreux facteurs déjà mentionnés tels que la lumière, la température, l'oxygène de l'air peuvent agir en cours d'extraction ou de manipulation et modifier la nature des pigments, certains étant même complètement détruits.

En outre, les phénomènes d'isomérisation naturelle ou accidentelle ajoutent encore à la difficulté en introduisant des pigments à propriétés variables mais voisines les uns des autres et difficiles à définir. KARRER (1955) a justement signalé l'existence naturelle d'isomères pourtant « impossibles » d'après leur structure moléculaire, et qui ont un grand intérêt en biologie.

Enfin, certains pigments sont difficiles à séparer les uns des autres ; on ne peut être certain de les avoir bien isolés. Il faut alors comparer les courbes des mélanges faits en proportion variable pour déduire la constitution des éléments en présence.

Cela explique que parmi les pigments caroténoïdes trouvés dans les animaux et dont j'avais indiqué incomplètement la nature de certains en 1953 a et 1953 b, puis en 1955 a et 1955 b, quelques-uns ont été nettement déterminés par leurs caractères et leurs propriétés, alors que le doute subsiste sur la nature exacte de certains autres.

Rappelons d'ailleurs que la science des caroténoïdes est une science jeune comportant encore de nombreuses inconnues ; les règles de la nomenclature unifiée et normalisée sont d'introduction assez récente (KARRER, 1948). La liste des pigments bien connus n'est pas définitive et les propriétés et réactions de certains sont encore très mal précisées.

Les pigments caroténoïdes mis en évidence au cours de mes expériences sont :

1. — β CAROTÈNE $C_{40}H_{56}$.

Sa formule développée a été donnée comme type de caroténoïde page 6. C'est un pigment jaune lorsqu'il est en solution dans l'éther de pétrole ; après agitation de cette solution avec le méthanol à 90°, il est entièrement épiphasique. Il n'est pas adsorbé sur les colonnes d'alumine P.L. 5 %, ni sur celles de CO_3Ca , mais il forme une bande jaune orange qui s'élue avec l'éther de pétrole pur sur l'alumine M.I.

Le spectre d'absorption du β carotène (fig. 3) présente une courbe à deux maxima à 477 et 450 $m\mu$ plus une inflexion vers 425 $m\mu$ dans l'hexane ;

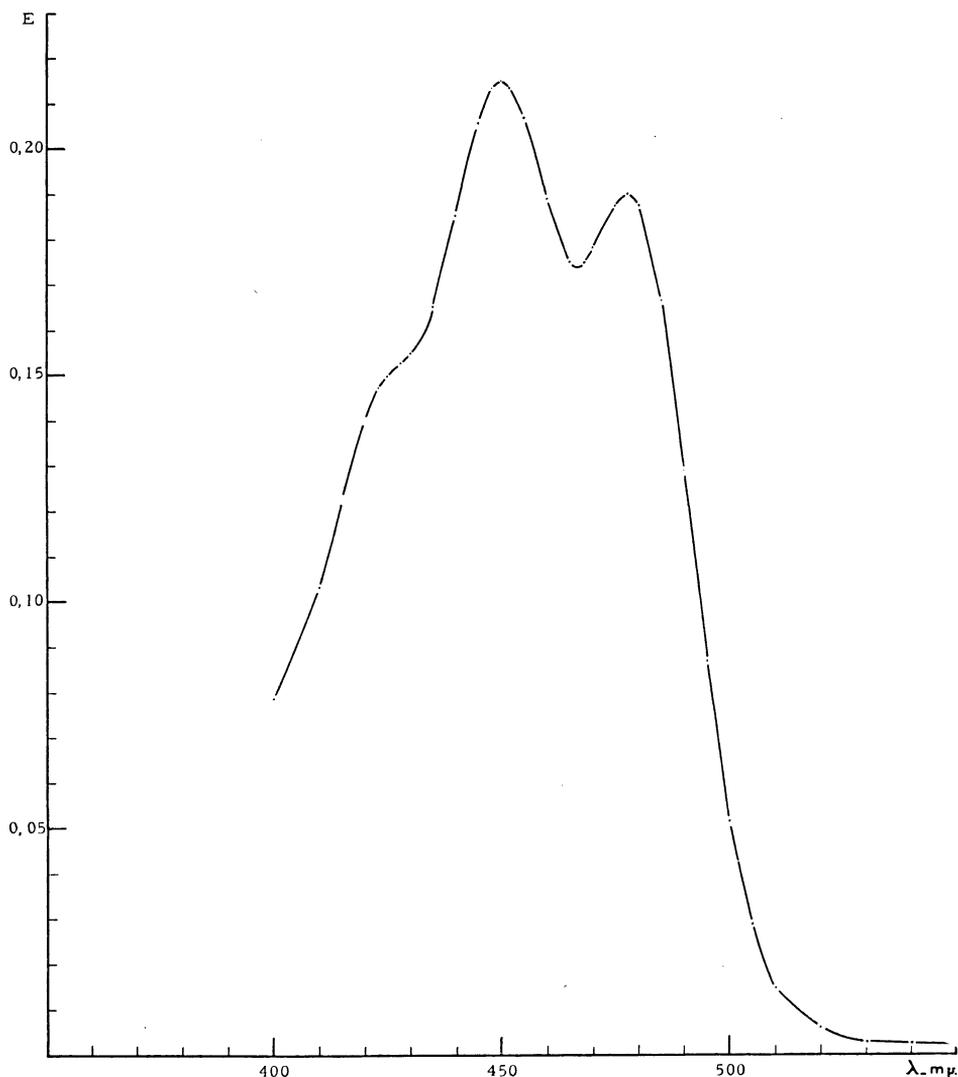


Fig. 3. — Spectre d'absorption du β carotène dans l'hexane

dans le sulfure de carbone, la courbe a deux maxima à 520 μ et 485 μ plus une inflexion vers 450 μ .

Ce pigment n'est ni altéré, ni modifié par la saponification comme le démontrent les propriétés de partage, de chromatographie et de spectrophotométrie qui restent rigoureusement inchangées après ce traitement. Tous ces caractères mis en évidence lors de l'étude du caroténoïde sont bien ceux du β carotène.

La présence de ce pigment en quantité relativement importante dans certains cas, et dans des organes ou tissus variés de l'animal, est intéressante à remarquer car, à part quelques exceptions comme les Daphnies par exemple (GREEN, 1957), et malgré le travail de WAGNER (1939) critiqué d'ailleurs par FISHER, KON, THOMPSON (1954), il est le plus souvent absent ou existe seulement à l'état de

traces dans l'organisme de la plupart des Crustacés (LEDERER, 1938 b ; GOODWIN et SRISUKH, 1949 a ; KON, 1954 ; GRANGAUD et MASSONET, 1955 a, MASSONET, 1958). Son rôle n'est peut-être pas à négliger puisqu'il est susceptible d'être à la fois anti-oxygène ou pro-oxygène (CHEVALIER, BURG, MANUEL, 1949).

2. — *CRYPTOXANTHINE* $C_{40}H_{56}O = 3$ *HYDROXY- β CAROTÈNE*.

A l'occasion de certaines extractions, j'ai remarqué l'existence d'un pigment jaune en solution dans l'éther de pétrole, faiblement adsorbé sur colonne de CO_3Ca ou d'alumine P.L. 5 %, d'où il s'élué lentement par le solvant pur, mais rapidement par l'éther de pétrole + 1 % de méthanol. Il est entièrement épiphasique et son spectre d'absorption montre deux maxima à 476 et 450 m μ plus une inflexion

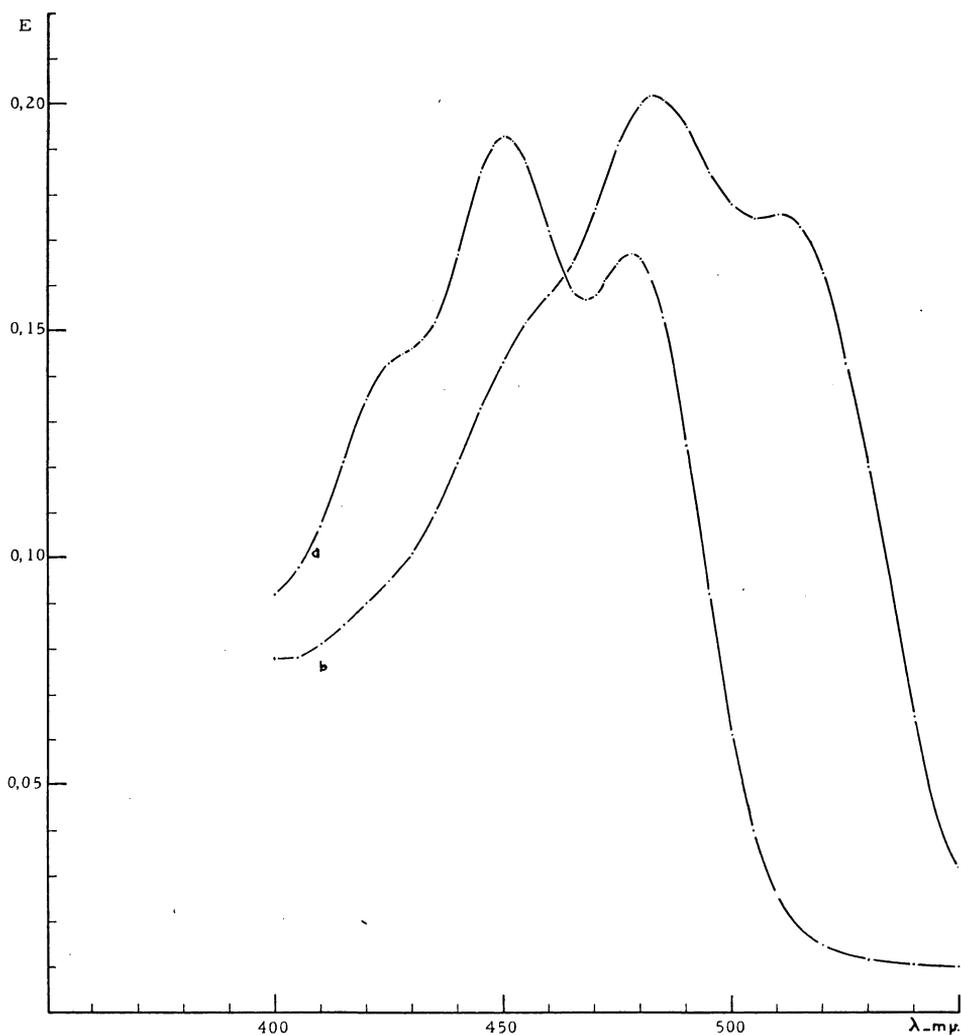


Fig. 4. — Spectres d'absorption de la cryptoxanthine :
 a = dans l'hexane ;
 b = dans le sulfure de carbone.

vers 425 m μ dans l'hexane ; c'est donc, dans ce cas, une courbe pratiquement identique à celle du β carotène. Dans le sulfure de carbone, les deux maxima se situent vers 510 et 483 m μ , l'inflexion vers 455 m μ (fig. 4).

La saponification, qui rend ce caroténoïde légèrement plus adsorbé sur colonne de chromatographie, ne modifie ni son caractère épiphase, ce qui démontre la présence d'un seul groupe OH dans la molécule, ni la forme et la position des maxima des courbes d'absorption.

Ce pigment, qui a des propriétés de partage et d'absorption analogues à celles du β carotène, mais qui est plus fortement adsorbé que ce dernier, doit être la cryptoxanthine ou un de ses cis-trans isomères dont l'existence a été révélée par ZECHMEISTER et LEMMON (cités par KARRER et JUCKER, 1948).

Le Professeur GOODWIN, que j'ai personnellement consulté à ce sujet, conclut à la présence d'un caroténoïde « cryptoxanthine like ».

Je dois mentionner les remarques faites par WALLCAVE et ZECHMEISTER (1953) sur la présence d'une interzone contenant plusieurs zones jaunes entre le β carotène et l'isocryptoxanthine sur le chromatogramme, lors de la transformation du déhydro- β carotène à partir de l'isocryptoxanthine.

De même, NICOLA et GOODWIN (1954 a), en étudiant les caroténoïdes extraits de jeunes Etoiles de mer (*Echinaster sepositus*) ont mis en évidence, entre autres, trois pigments jaunes légèrement adsorbés sur Al_2O_3 , dont les maxima d'adsorption sont très voisins de ceux du β carotène. Les auteurs ne se prononcent pas sur la nature de ces corps.

Signalons encore que GOODWIN et FOX (1955) ont trouvé, chez un Mollusque, *Archidoris montereyensis*, un pigment semblable « similaire d'un pigment « non identifié observé dans le sang humain et le lait et les baies de *Lonicera japonica* ».

La nature de ce pigment est donc difficile à définir exactement ; cependant, ses diverses propriétés permettent de l'assimiler à un pigment proche de la cryptoxanthine, sinon ce pigment lui-même.

La présence d'un tel caroténoïde n'est pas étonnante et nous verrons par la suite son intérêt si, comme NICOLA (1954 a) et d'autres auteurs, nous admettons l'existence de la cryptoxanthine comme forme intermédiaire dans la transformation par l'animal du β carotène en pigment spécifique.

3. — « CARCINOXANTHINE » (?).

Ce pigment, pourtant très abondant dans certaines conditions, est celui dont la nature est la plus difficile à mettre en évidence. Il semble toujours associé à un ou plusieurs autres constituants caroténoïdes dont, jusqu'à présent, je n'ai pu le séparer complètement et de façon satisfaisante avec les méthodes que j'ai utilisées.

Cela explique la difficulté à obtenir des courbes d'absorption rigoureusement identiques dans leur forme pour des extractions différentes.

Devant l'impossibilité de préciser sa nature avec certitude en le comparant aux caroténoïdes déjà connus, j'ai adopté le principe des « règles de nomenclature » définies par KARRER (1948) : « pour de nouveaux caroténoïdes contenant de l'oxygène dont la structure est encore inconnue, on pourra choisir des noms qui possèdent la terminaison « xanthine » et qui, par leur préfixe expriment l'origine ou quelques propriétés de la matière colorante ».

D'après ces considérations, j'ai adopté, uniquement dans le cadre de cet ouvrage et pour faciliter la compréhension des chapitres suivants, la désignation de « carcinoxanthine » pour ce pigment.

En solution dans l'éther de pétrole, il est très légèrement adsorbé sur colonne d'alumine P.L. 5 % sur laquelle il forme une zone jaune devant les autres

pigments. Celle-ci s'élué très lentement avec le solvant pur ; en fractionnant la colonne, on reprend facilement le pigment avec l'éther de pétrole additionné de 0,5 % de méthanol.

La courbe d'absorption la plus caractéristique (fig. 5) présente, dans l'éther de pétrole, deux maxima principaux à 447 et 422 m μ et une inflexion assez prononcée vers 400 m μ . Dans le sulfure de carbone, les maxima sont à 477 et 451 m μ ; dans le chloroforme, ils sont à 458 et 433 m μ et dans le benzène à 456, 431 m μ plus une légère inflexion vers 408 m μ .

Ces données spectrophotométriques indiquent que le pigment ne contient pas de groupement CO puisqu'il y a deux maxima dont la position, très nettement vers les basses longueurs d'onde, fait prévoir un nombre plus réduit de doubles liaisons conjuguées (peut-être 3) dans la molécule.

Ce pigment, épiphastique avant la saponification, devient nettement hypophastique après la saponification. Il est donc estérifié à l'état naturel et sa molécule contient plusieurs groupements OH. Il est stable dans cet état mais assez fragile après le traitement par le méthanol 15 % potassique ; il se décolore et se détruit alors assez rapidement.

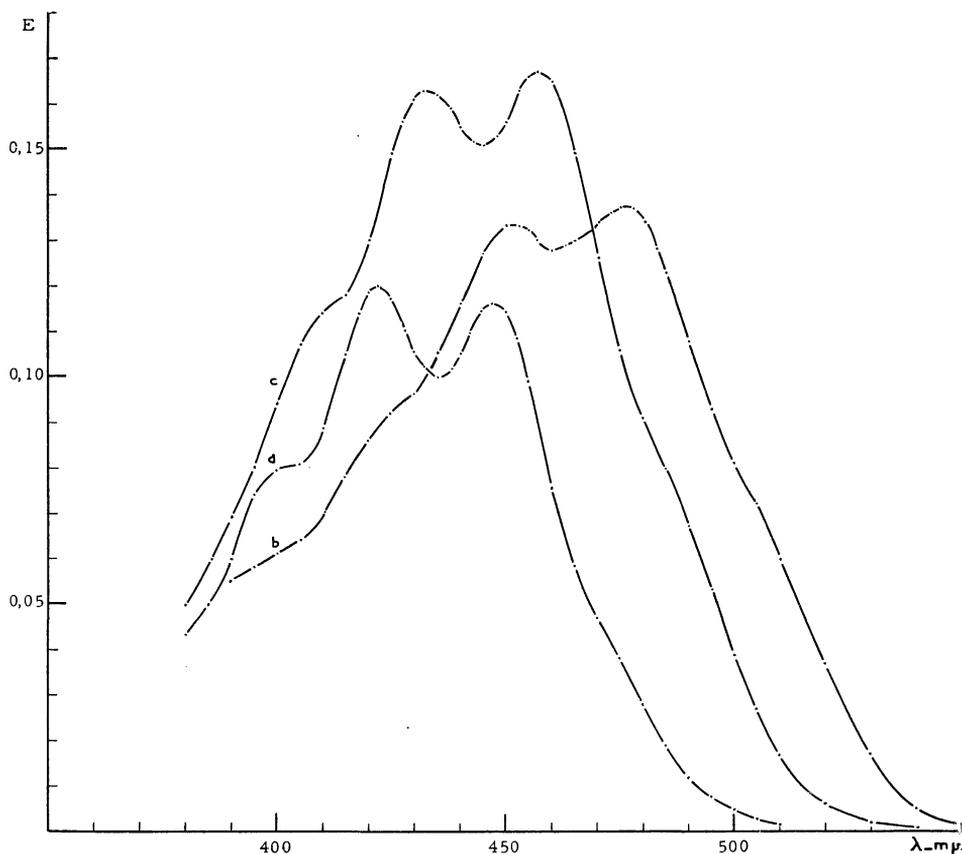


Fig. 5. — Spectres d'absorption de la « carcinoxanthine » :
 a = dans l'éther de pétrole ;
 b = dans le sulfure de carbone ;
 c = dans le chloroforme.

Dans certains cas, le maximum situé à 447 m μ dans l'éther de pétrole est aussi important, donc à la même hauteur que celui qui est situé à 422 m μ ; je pense que cela tient à la présence, à côté du pigment, d'un produit d'altération, de transformation, ou même d'un pigment très voisin de celui-ci.

En comparant toutes ces propriétés, on constate qu'elles sont, à quelques exceptions près, pratiquement identiques à celles de la flavoxanthine C₄₀H₅₆O₃, 5-8 époxyde de xanthophylle (forme furanoïde) ; seule la forme de la courbe d'absorption diffère parfois dans la hauteur du maximum à 447 m μ .

La flavoxanthine, que l'on trouve surtout chez les végétaux, a toutefois été signalée dans le règne animal, par exemple chez plusieurs Etoiles de mer (NICOLA, 1956). Il faut noter que ce caroténoïde résulte le plus souvent de l'isomérisation du 5-6 époxyde de xanthophylle sous l'action de traces d'acide ; il se forme alors en même temps un peu de xanthophylle. Ce serait le mélange flavoxanthine + xanthophylle que j'obtiendrais dans certaines conditions. Ce phénomène, déjà mis en évidence par TAPPI et MENZIANI (1955), expliquerait les formes variables du spectre d'absorption de ces extraits. D'ailleurs, des séparations par chromatographie sur papier, sur SO₄Na₂ et sur Al₂O₃ P.L. hydratée à 15 % m'ont permis d'obtenir, à partir de ces solutions, un pigment précédant la flavoxanthine (?) sur le chromatogramme dont la courbe est exactement celle de la xanthophylle. Or, on sait que les β carotène époxydes sont les premiers stades de la destruction oxydante du β carotène (GOODWIN, 1955, p. 507) ; il faut donc considérer ces caroténoïdes 5-6 et 5-8 époxyde de xanthophylle comme des produits de dégradation de la xanthophylle (GOODWIN, communication personnelle), elle-même très abondante dans le Crabe. De plus, NICOLA (1956) considère le flavoxanthine comme produit final au métabolisme peu actif s'il est sous forme d'ester, ce qui est le cas ici. C'est pour ces raisons que je ne considère pas le « carcinoxanthine » (?) comme identique à la flavoxanthine. Sa localisation dans l'animal et son abondance dans certaines conditions me portent à voir dans ce pigment, au moins dans certains cas, un produit intermédiaire au métabolisme prononcé, plutôt qu'un produit final. Pourtant, des considérations discutées plus loin (p. 41 et 88) ne me permettent pas de l'affirmer. Un autre pigment comparable, par ses propriétés, à la flavoxanthine, donc à la « carcinoxanthine » (?), est signalé par KARRER et JUCKER (1948), c'est le trollichrome. Il résulte de la conversion de la trollixanthine, 5-6 époxyde, (isolé de la Renonculacée *Trollius europaeus*) en forme furanoïde (5-8 époxyde). Il a été étudié en détail par M. LIPPERT (1).

Remarquons encore que NICOLA et MONROY-ODDO (1952) ont isolé des gonades de l'Oursin *Paracentrotus lividus*, plusieurs « poly-hydroxy-xanthophylles » ; l'un d'entre eux, qu'ils appellent xanthophylle 4 sans autre identification, présente à peu près la même courbe que cette « carcinoxanthine » (?).

Ajoutons enfin, pour compléter ce sujet, qu'il existe aussi une similitude entre les propriétés de partage, d'absorption et de stabilité de la « carcinoxanthine » (?) et de la crocétine (C₂₀H₂₄O₄, KARRER et JUCKER, 1948). Ce pigment peut théoriquement se former par dégradation d'un caroténoïde en C₄₀ (GOODWIN, 1952 a), qui pourrait être ici le β carotène ou la cryptoxanthine par exemple. En outre, sa forme estérifiée est plus stable à l'air et à la lumière que la forme libre (ISLER et Coll., 1957). J'ai signalé ces mêmes caractéristiques à propos du pigment dont je discute ici la nature.

Il eût été très intéressant de faire le spectre infra-rouge de ce caroténoïde indéterminé ; il aurait permis de préciser la structure de la molécule. Mais la quantité nécessaire pour le réaliser étant de 20 mg au minimum, je n'ai pu en

(1) Publication non datée.

isoler suffisamment. Pour être mené à bien, ce travail devra être repris par la suite et réalisé en collaboration avec des spécialistes.

En conclusion, pour le moment, j'utiliserai dans le présent travail le nom de « carcinoxanthine » pour ce pigment en disant qu'il peut être aussi bien un intermédiaire nouveau dans la transformation des caroténoïdes de certains tissus, la forme furanoïde d'un époxyde produit par la dégradation d'une xanthophylle, ou bien encore le résultat de l'altération d'un autre caroténoïde.

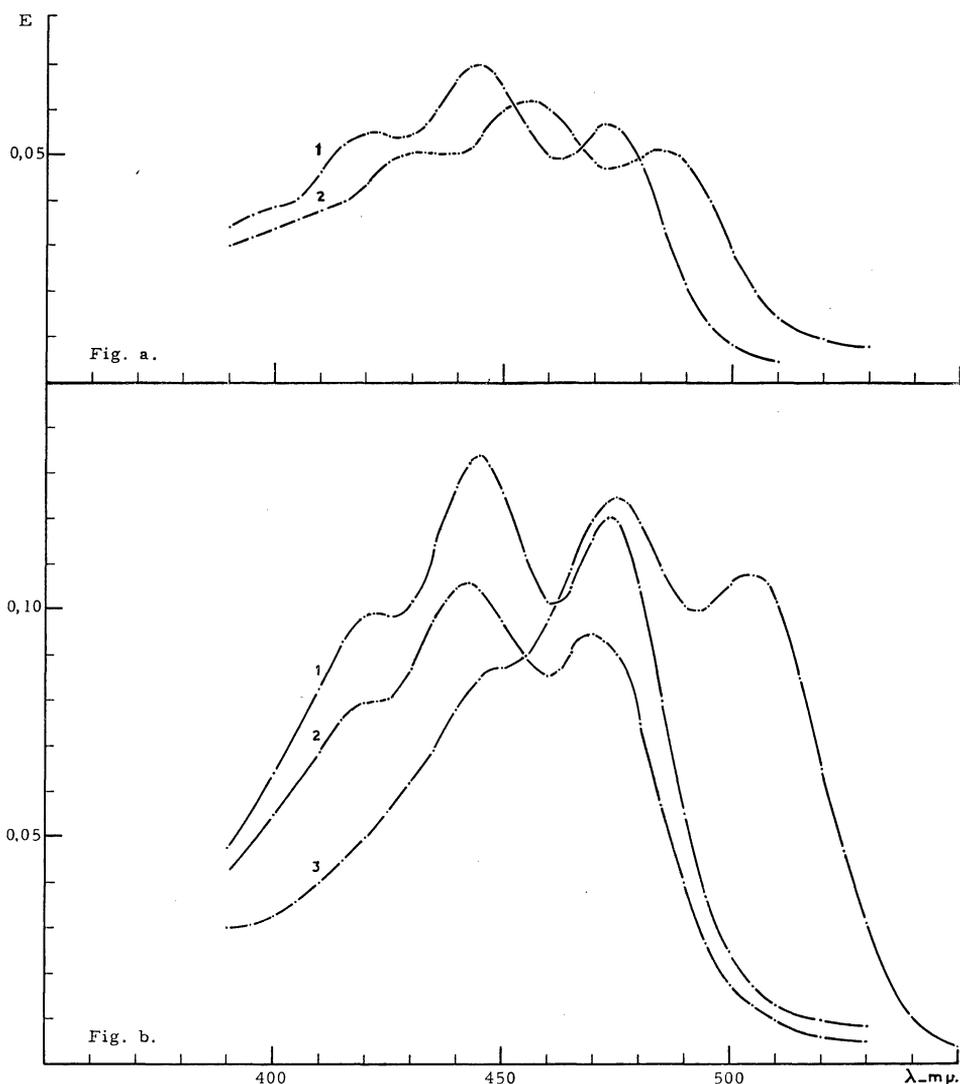


Fig. 6 a. — Spectres d'absorption de l'ester de xanthophylle :
1 = dans l'éther de pétrole ; 2 = dans le chloroforme.
Fig. 6 b. — Spectres d'absorption de la xanthophylle libre :
1 = dans l'éther de pétrole ; 2 = dans le méthanol ;
3 = dans le sulfure de carbone.

Enfin, je dirai avec LIPPERT que tous ces caroténoïdes doivent avoir des systèmes chromophores analogues à la flavoxanthine, ce qui détermine donc des spectres d'absorption semblables.

4. — XANTHOPHYLLE : $C_{40}H_{56}O_2$.

Ce terme, souvent employé improprement pour désigner au sens large tout le groupe des hydroxycaroténoïdes, s'applique, dans cet ouvrage, à un pigment bien déterminé : le dihydroxy α carotène, fréquemment appelé lutéine par d'autres auteurs (GOODWIN, 1952 a).

La solution de xanthophylle en éther de pétrole a une teinte variant du jaune d'or au jaune orange suivant la concentration. Ce caroténoïde, ayant deux groupes hydroxyles dans sa molécule, est normalement hypophasique, mais il existe souvent à l'état d'ester ; il est alors épiphasique. J'ai rencontré ces deux formes.

a) Ester de xanthophylle.

Épiphasique en éther de pétrole, il est adsorbé sur Al_2O_3 P.L. 5 % sous forme d'une bande jaune orange, éluée de la colonne par l'éther de pétrole + 1 % de méthanol. Le spectre d'absorption a trois maxima à 473, 445, 423 m μ en éther de pétrole et à 484, 456, 430 m μ dans le chloroforme (fig. 6 a). Après saponification, ce pigment devient hypophasique, mais ses autres propriétés ne sont pas modifiées.

b) Xanthophylle libre.

Pigment hypophasique, il est assez fortement adsorbé sur alumine M. I d'où on peut l'éluier par l'éther de pétrole saturé de méthanol. Le spectre d'absorption a trois maxima à 473, 445, 423 m μ dans l'éther de pétrole ; 470, 443, 422 m μ dans le méthanol ; 485, 456 m μ plus une inflexion à 429 m μ dans le chloroforme et à 506, 475, 445 m μ dans le CS_2 (fig. 6 b).

Il n'y a aucune modification de ces diverses propriétés après saponification. La xanthophylle est très largement répandue dans la nature, tant dans le règne animal que végétal, soit à l'état libre, soit à l'état d'ester ; il est donc normal de trouver ici ces deux formes.

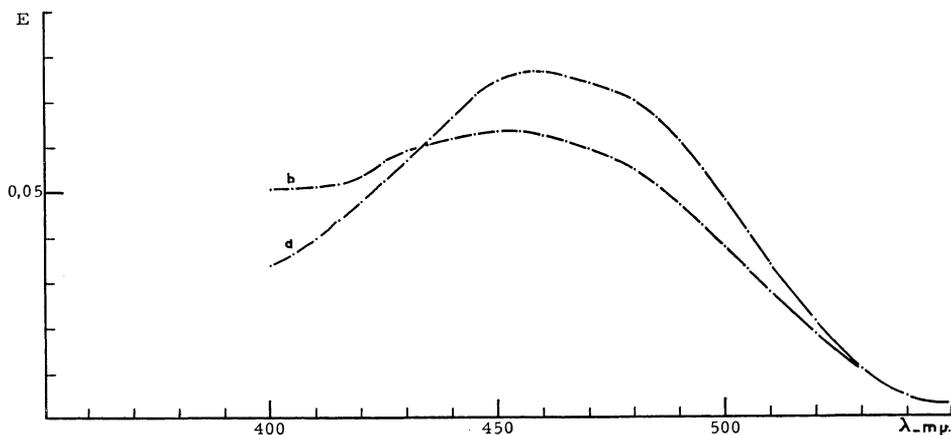


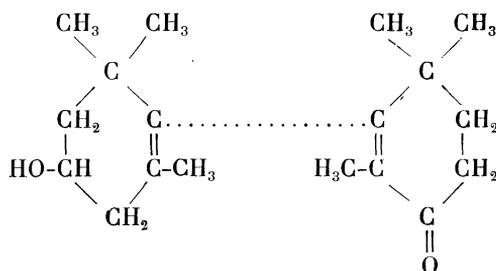
Fig. 7. — Spectres d'absorption de l'hydroxy-céto-caroténoïde dans l'éther de pétrole :
a = avant la saponification ;
b = après la saponification.

5. — HYDROXY-CÉTO-CAROTÉNOÏDE (?).

Jaune-orangé en solution dans l'éther de pétrole, ce pigment est épiphase avant la saponification ; il est alors moyennement adsorbé sur colonne d'Al₂O₃ P.L. 5 % d'où il est élué par l'éther de pétrole + 1 % de méthanol. Après la saponification, il est en très grande partie hypophasique, mais l'épiphase reste néanmoins légèrement colorée ; il est alors assez fortement adsorbé sur colonne d'Al₂O₃ P.L. 5 % d'où il peut être élué par l'éther de pétrole + 10 % d'acide acétique. Son spectre d'absorption, avant comme après la saponification, montre une courbe à maximum unique — caractéristique des pigments à un ou plusieurs groupements CO — situé entre 452 et 458 mμ en éther de pétrole (fig. 7).

La position et la forme de cette bande d'absorption unique, les caractères chromatographiques et les propriétés de partage permettent de considérer ce pigment comme un monohydroxy-monocéto-caroténoïde. Plusieurs auteurs ont eux-mêmes supposé l'existence de tels composés chez d'autres animaux.

NICOLA, étudiant les caroténoïdes des Etoiles de mer *Ophidiaster ophidianus* (1954 a) et *Asterina panceri* (1956), montre la présence de deux nouveaux pigments hydroxycéto-caroténoïdes dont l'un a des propriétés identiques à celui que je mentionne plus haut. L'auteur en donne le schéma suivant :



Deux pigments semblables avec la « bande d'absorption unique et la forte adsorbabilité » caractérisant les monohydroxy-monocéto-caroténoïdes ont encore été trouvés par NICOLA et GOODWIN (1954 a) dans les ovaires de l'Oursin *Sphaerichinus granularis*. Enfin, en 1957, VEVERS et MILLOTT retrouvent un « céto-caroténoïde possible » ayant ces mêmes propriétés dans les téguments de l'Etoile de mer *Marthasterias glacialis*.

Tous ces travaux qui démontrent une fois de plus l'existence possible d'intermédiaires dans la transformation du β carotène en astaxanthine me permettent d'envisager avec plus d'assurance la présence de tels pigments chez les animaux que j'ai étudiés.

6. — ASTAXANTHINE.

Ce caroténoïde, très fréquent dans le règne animal sous divers états, est le principal et le plus caractéristique des pigments des Crustacés. Les travaux concernant l'astaxanthine sont trop nombreux pour être tous mentionnés ici. Une documentation très complète peut être établie en consultant ces principaux ouvrages : KARRER et JUCKER (1948), GRANGAUD (1951), GOODWIN (1952 a).

Ses propriétés et ses réactions sont bien connues ; c'est donc un pigment facile à déterminer. Sa formule brute C₄₀H₅₂O₄ se développe en 3, 3'-dihydroxy-4, 4'-dicéto-β carotène.

J'ai rencontré l'astaxanthine dans mes extraits sous différentes formes :

a) *Astaxanthine libre.*

Solution orange en éther de pétrole, rouge dans la pyridine, c'est un pigment hypophasique, fortement adsorbé sur Al_2O_3 P.L. 5 %, d'où il est élué par

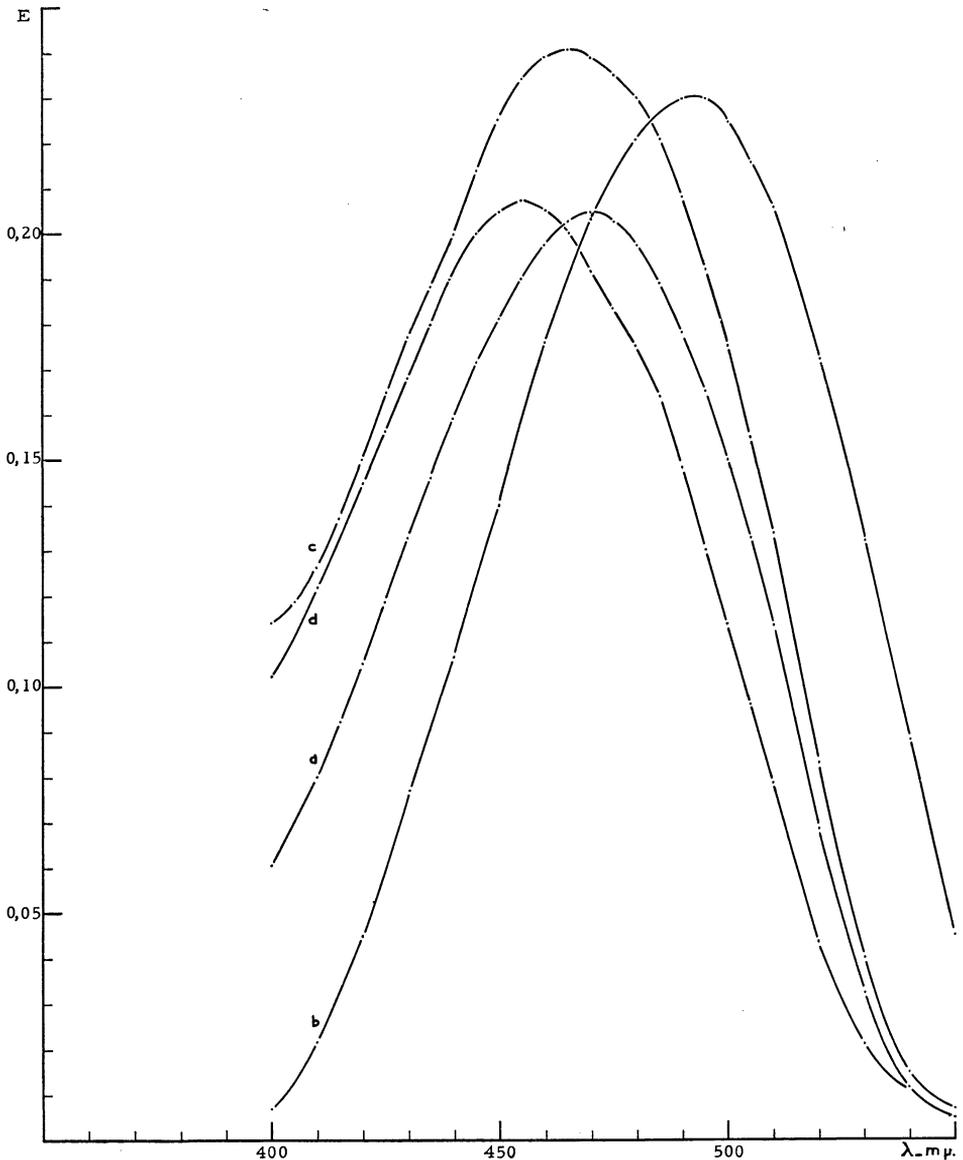


Fig. 8. — Spectres d'absorption de l'astaxanthine :
 a = astaxanthine libre dans l'éther de pétrole ;
 b = astaxanthine libre dans la pyridine ;
 c = isomère d'astaxanthine dans l'éther de pétrole (max. à 465) ;
 d = isomère d'astaxanthine dans l'éther de pétrole (max. à 455).

l'éther de pétrole + 1 % de méthanol. Sur l'alumine M. I, il ne peut être repris que par l'éther de pétrole + 10 % d'acide acétique. La courbe d'absorption présente un seul maximum à 470 m μ dans l'éther de pétrole et 492 m μ dans la pyridine (fig. 8).

Si on ajoute, après la saponification, de l'éther de pétrole et de l'eau à la solution du pigment dans le méthanol potassique, celui-ci reste dans la phase alcoolique inférieure. Il passe dans l'épiphase par addition de quelques gouttes d'acide acétique, ce qui est caractéristique des pigments « acides ». La saponification est en réalité une autoxydation en présence d'air sous l'action de la potasse, ce qui transforme l'astaxanthine en astacine.

b) Isomères d'esters d'astaxanthine.

La chromatographie de certains extraits fournit souvent sur une même colonne ou sur des chromatogrammes différents, plusieurs pigments rose orange sur l'adsorbant. Les courbes de chacun d'eux présentent un maximum unique allant, selon les cas, de 455 à 470 m μ dans l'éther de pétrole (fig. 8).

Ces pigments sont nettement épiphases mais diversement adsorbés sur Al₂O₃ M. I. Le pigment dont le maximum est à 455 m μ est le moins fortement adsorbé ; il est élué par l'éther de pétrole + 1 % de méthanol. Celui dont le maximum est à 470 m μ est le plus fortement adsorbé puisqu'il est élué par l'éther de pétrole saturé de méthanol. Quant aux pigments présentant leur maximum entre ces valeurs extrêmes, ils sont élués plus ou moins facilement par l'un ou l'autre des éluants précédents.

On pourrait envisager l'existence de plusieurs pigments différents mais la saponification de tous aboutit à la formation d'astacine très facilement identifiée. Or, KUHN et SORENSEN (1938) ont montré que c'était l'astaxanthine qui se transformait en astacine par ce traitement. Les pigments en question ont donc une propriété bien spécifique de l'astaxanthine bien que le sommet de leur courbe d'absorption puisse être décalé jusqu'à 15 m μ vers les courtes longueurs d'onde par rapport à ce caroténoïde.

CHECHAN, GRANGAUD et MASSONET (1950) avaient obtenu les mêmes phénomènes avec les pigments caroténoïdes de l'hépatopancréas de la Crevette *Aristeomorpha foliacea* ; ces auteurs avaient conclu, après expérience, que ce déplacement important de la courbe ne pouvait être causé ni par la présence de grande quantité de graisse, ni par celle de différents esters de l'astaxanthine, ces derniers ayant des maxima d'absorption très voisins de celui du pigment libre (environ 3 m μ de déplacement vers les basses longueurs d'onde). Ils avaient alors envisagé l'existence possible de formes stéréoisomères de l'astaxanthine et j'avais moi-même, en publiant mes observations (1953 b) souscrit à cette hypothèse.

Depuis, GRANGAUD et CHARDENOT (1956) ont obtenu artificiellement des isomères mono- et poly-cis d'esters de l'astaxanthine à partir de la forme naturelle entièrement trans. Ces stéréoisomères ont les mêmes propriétés que ceux trouvés chez *Aristeomorpha foliacea* ; les auteurs ont donc conclu à leur existence naturelle, ce qui confirme leur présence chez le Crabe.

Ajoutons que VEVERS et MILLOTT (1957), en chromatographiant des extraits de téguments de *Marthasterias glacialis*, ont observé « 3 bandes » qui proviendraient, pensent-ils, de « dérivés de l'astaxanthine ».

c) Astaxanthine -- Chromoprotéïdes.

Depuis longtemps (VERNE, 1921), on sait que les caroténoïdes peuvent se combiner à des protéines et former ainsi des dérivés de couleur variées. Dans ce cas, l'astaxanthine entièrement trans représente le groupement prosthétique du com-

plexe. La protéine, la nature de ses liaisons avec le pigment peuvent être variables (BALL, 1944) ; c'est ce qui expliquerait les différentes teintes des chromoprotéides décrits dans les œufs, les ovaires, les carapaces de nombreux Crustacés et chez d'autres animaux dont les Insectes (JUNGE, 1941).

La chaleur, les acides forts, les bases et la plupart des solvants organiques détruisent ce complexe par floculation de la protéine, ce qui libère l'astaxanthine libre ; de là provient le rougissement de la carapace du Crabe quand on fait agir l'un ou l'autre de ces différents agents.

Rappelons que ces chromoprotéides sont solubles dans l'eau et dans les solutions diluées de certains sels. WALD et Coll. (1948) ont étudié en détail la « crustacyanine » pigment bleu noir de la carapace du Homard, mais je n'ai pas réussi complètement à refaire cette étude sur le complexe de la carapace de *Carcinus maenas*.

Je pense qu'il est intéressant de signaler ici que l'astaxanthine sous forme d'esters (GRANGAUD et MASSONET, 1954) ou sous forme de chromoprotéide (MASSONET, 1955, 1958) peut présenter certaines propriétés de la vitamine A. D'ailleurs, GRANGAUD et MASSONET (1955 b) puis GRANGAUD, VIGNAIS, MASSONET, MOATTI (1957) ont démontré que chez le Poisson *Gambusia holbrooki* Grd, l'astaxanthine se comporte nettement comme une provitamine A, et qu'il peut y avoir formation de β carotène au cours de la transformation du pigment en vitamine A. L'astaxanthine qui, dans l'animal, résulte vraisemblablement au moins en partie de l'oxydation du β carotène, peut donc, par réduction des fonctions oxygénées et sous certaines conditions, redonner ce pigment (MASSONET, 1958).

7. — ASTACINE = $C_{40}H_{48}O_4$.

Caroténoïde à 4 groupements cétoniques, c'est le 3, 4, 3', 4' tétracéto- β carotène ; comme l'astaxanthine, ce pigment peut être envisagé sous deux formes : cétonique ou énolique. L'astacine, rose orange en solution dans l'éther de pétrole et rouge sang dans la pyridine, est un pigment totalement hypophasique qui peut repasser dans l'épiphase éthéro-pétrolique par addition d'eau à la phase alcoolique ; cependant, en présence de soude ou de potasse, il demeure dans la phase aqueuse sous forme de sel, ce qui démontre son caractère acide. On peut, à ce stade, l'extraire assez facilement par floculation ; on obtient une masse amorphe rouge qui se retrouve à l'interphase par refroidissement. L'astacine est très fortement adsorbée sur colonne d'alumine quel que soit le degré d'hydratation de celle-ci ; on ne peut l'éluer que par le méthanol + 5 % de potasse. Le spectre d'absorption est très caractéristique puisqu'il présente une seule bande à maximum unique vers 500 m μ dans la pyridine (fig. 9).

C'est le premier pigment caroténoïde mis en évidence chez les Crustacés par divers auteurs et décrit sous les noms de crustacéo-rubine, zooérythrine, vitello-rubine ou tétron-érythrine.

Rappelons pourtant que KUHN et SORENSEN (1938) ont montré que l'astacine n'est en réalité que le produit d'oxydation de l'astaxanthine. Toutes les fois que ce dernier pigment existe dans une solution, il est normal de trouver en même temps l'astacine se formant à ses dépens en cours de manipulation. On constate d'ailleurs qu'une solution d'astaxanthine chromatographiée et purifiée reforme assez rapidement et spontanément une quantité appréciable d'astacine. Il n'est donc pas certain que ce caroténoïde trouvé dans un grand nombre d'organismes y existe à l'état naturel, bien que MAYER (1957) l'ait trouvé sous cet état chez un Poisson (*Hyphessobrycon innesi* Myres).

Il faut enfin signaler la présence, au cours des différentes chromatographies réalisées, de bandes jaunes ou orange sur la colonne, s'éluant avec des concentra-

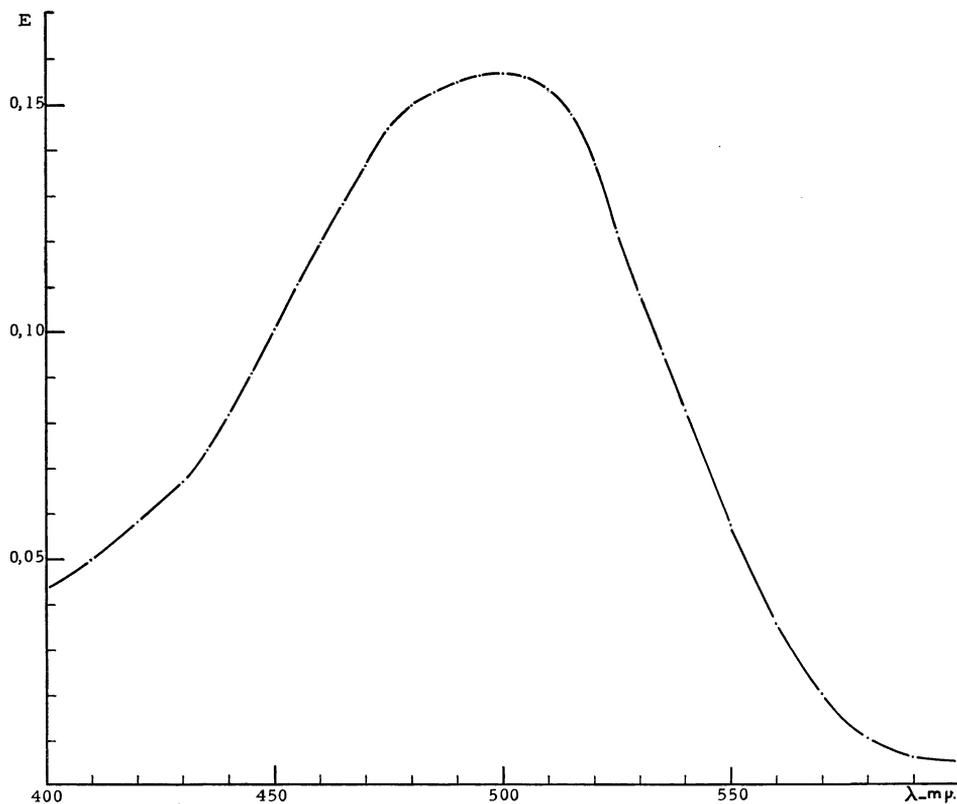


Fig. 9. — Spectre d'absorption de l'astacine dans la pyridine

tions variables de méthanol dans l'éther de pétrole ; les solutions obtenues sont très diluées et leurs spectres d'absorption, très irréguliers, avec des maxima et des minima très mal définis, montrent que ces corps ne sont pas des caroténoïdes. Je pense avec STEVEN (1948, p. 371) qu'il s'agit d'impuretés ou de produits de dégradation.

CONCLUSION

En consultant les tableaux I et II (p. 124, 125) récapitulatifs de la nature des pigments caroténoïdes mis en évidence chez le Crabe *Carcinus maenas* et de leur mode de séparation, on constate la présence de pigments bien définis et bien connus, à l'état libre, estérifiés, quelquefois isomérisés. Ce sont le β carotène, la xanthophylle (lutéine), l'astaxanthine et l'astacine. A côté de ceux-ci, j'ai montré la présence de plusieurs caroténoïdes qualifiés de « mineurs » par certains auteurs, dont la nature, plus délicate à mettre en évidence, les apparente aux mono et polyhydroxy-caroténoïdes et aux mono-hydroxy-mono-céto-caroténoïdes ; leur présence est liée à l'origine de la solution.

L'existence de ces composés ne saurait être due à des artefacts car on sait que les caroténoïdes dans un organisme sont très sensibles aux réactions d'oxyda-

tion. D'ailleurs, HEILBRON et COCK (1951) pensent, eux aussi, que les époxydes doivent jouer un grand rôle dans le métabolisme de ces pigments.

En outre, NICOLA (1954 a) montre « l'importance qu'il y a à réexaminer « les caroténoïdes des tissus animaux à la lumière des informations modernes » permettant ainsi la mise en évidence de pigments passés inaperçus des premiers auteurs du fait des moyens d'investigation alors rudimentaires. Ces pigments nouvellement trouvés, il les considère « comme intermédiaires entre β carotène et astaxanthine ».

En 1953 (b) j'avais moi-même émis cette hypothèse fondée sur des observations et travaux exposés dans ce présent ouvrage.

D'autres auteurs : FISHER, KON, THOMPSON (1954), VEVERS, MILLOTT (1957) ont aussi suggéré que certains pigments trouvés dans les organismes animaux pouvaient être des formes intermédiaires dans le métabolisme de ces deux pigments.

CHAPITRE III

LOCALISATION DES PIGMENTS CAROTÉNOÏDES
DANS L'ANIMAL

Les différents pigments caroténoïdes mentionnés précédemment se rencontrent dans divers tissus ou organes de l'animal, qu'il me faudra donc étudier séparément.

Je classerai ces pigments en pigments tégumentaires et en pigments internes.

Il est évident que la nourriture, le stade physiologique, le parasitisme ou certaines interventions de l'expérimentateur peuvent modifier la nature et les propriétés de ces caroténoïdes. Je me bornerai, dans ce chapitre, à localiser ces substances dans des animaux normaux, non conservés en élevage et considérés comme témoins, me réservant de traiter par la suite les cas particuliers.

A. — PIGMENTS CAROTÉNOÏDES TÉGUMENTAIRES.

Les téguments des Crabs comprennent plusieurs assises dont la nomenclature a été longtemps imprécise. C'est DRACH (1939, p. 272) qui a défini les différentes parties du squelette tégumentaire externe, appelé communément carapace.

On y trouve, de l'extérieur vers l'intérieur : l'épicuticule apigmentée et l'endocuticule formée par une couche préexuviale et par deux couches postexuviales : couche principale qui contient parfois du pigment caroténoïde diffus, couche membraneuse sans pigment.

La couche préexuviale présente dans de nombreuses régions une quantité très importante de pigments, d'où son nom de couche pigmentaire qui lui a été donné improprement par VITZOU (1882).

C'est l'ensemble du squelette tégumentaire qui, rejeté par l'animal à la mue, porte le nom d'exuvie.

Rappelons que DRACH (1939, p. 183) a déterminé très nettement les étapes du cycle d'intermue auxquelles correspondent une structure et un aspect très particuliers des différentes assises tégumentaires. Il est intéressant, pour ce présent travail, de savoir que la couche préexuviale se forme, comme son nom l'indique, avant la mue, entre les étapes D_2 et D_4 . Les nouveaux téguments préparés sous la carapace sont donc déjà pigmentés avant l'exuviation.

Sous le squelette externe se trouve l'hypoderme, formé d'un épithélium sécrétant l'ensemble de ce squelette tégumentaire et d'un tissu conjonctif lâche renfermant des chromatophores variés.

1. — PIGMENTS CAROTÉNOIDES DE LA CARAPACE.

Ce sont essentiellement ceux de la couche pigmentaire et ceux qui imprègnent dans certains cas la couche principale.

Ils ont été étudiés par SMITH (1913) puis par VERNE (1921, 1923 a, 1927). Ce dernier a montré que le pigment bleu de la carapace était en combinaison protéique et qu'il avait pour origine les ramifications des chromatophores de l'hypoderme venant affleurer la surface entre les cellules épithéliales. Il pense que le carotène entre, seul, dans la combinaison protéique (1926 b). D'après lui, la teinte

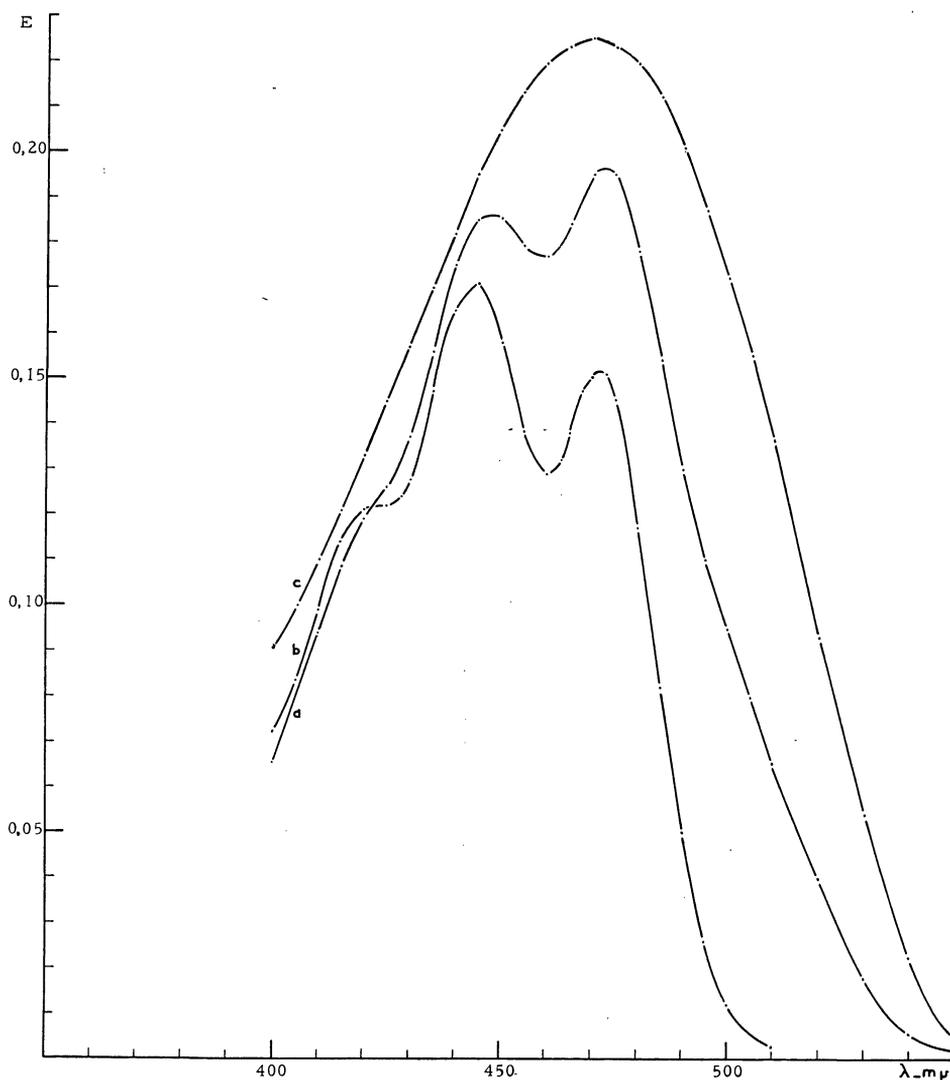


Fig. 10. — Spectres d'absorption des pigments extraits de la carapace :
 a = mélange des pigments dans l'éther de pétrole ;
 b = xanthophylle dans l'éther de pétrole ;
 c = astaxanthine dans l'éther de pétrole.

verte du Crabe est formée par la superposition de la teinte bleue de la carapace et de la teinte jaune ou rouge des pigments de l'hypoderme sous-jacent. Il montre encore qu'il y a dépôt de pigment rouge dans la couche principale au cours de l'intermue de l'animal, confirmant ainsi les expériences et observations d'ABELOOS et FISCHER (1927).

Ces auteurs n'ont pu définir exactement la nature de ces caroténoïdes encore très peu connus à cette époque.

En 1933, FABRE et LEDERER notent la présence d'astacine dans la carapace des Crustacés ; KUHN et LEDERER (1933) la trouvent en particulier dans celle du Homard, mais on sait maintenant ce qu'il faut penser de l'existence de ce corps. D'ailleurs, GOODWIN et SRISUKH (1949 a) reprenant l'étude du Homard, GARCIA et GRANGAUD (1953) celle de *Maja squinado*, montrent que, dans la carapace, il s'agit d'astaxanthine.

J'ai publié en 1953 (b) et 1955 (a) les résultats de mes recherches sur les pigments de la carapace de *Carcinus maenas*. C'est le bouclier céphalo-thoracique, région la plus colorée de l'animal, que j'ai d'abord étudié. La pièce découpée est soigneusement lavée et brossée pour éliminer les algues microscopiques qui peuvent être incrustées sur le tégument ; cela permet d'éviter la présence de chlorophylle ou d'autres pigments étrangers dans la solution. Il faut aussi veiller à ce qu'il ne reste pas de fragment d'hypoderme collé à la face interne du bouclier contre la couche membraneuse. Après décalcification du fragment de carapace dans l'acide chlorhydrique, le pigment est extrait par l'acétone additionnée de méthanol à 80°, ce qui évite une trop forte déshydratation de la pièce nuisible à l'extraction totale du pigment. La solution en éther de pétrole est d'abord chromatographiée sur Al_2O_3 P.L. 5 % ; j'obtiens alors une bande orangé-rose qui, avec l'éther de pétrole + 1 % de méthanol, se scinde en deux zones, jaune inférieure et rose supérieure. Cependant, leur extraction séparée n'est pas possible, les deux bandes étant éluées en même temps. La courbe ainsi obtenue présente alors deux maxima principaux plus ou moins prononcés vers 473 et 455 m μ dans l'hexane (fig. 10 a). Cela prouve que la solution recueillie est, en fait, un mélange. On refait alors la chromatographie sur Al_2O_3 M. I. Il se forme une bande orangé-rose en haut de la colonne qui n'est traversée par aucune zone colorée, démontrant ainsi l'absence totale de β carotène dans cette assise. L'éluion par l'éther de pétrole + 1 % de méthanol détache une zone jaune très lente à descendre ; sa migration est accélérée par l'éther de pétrole saturé de méthanol. La solution jaune recueillie est hypophasique et présente toutes les propriétés de la xanthophylle, en particulier celles de l'absorption (fig. 10 b). Il reste sur la colonne une bande rose qui s'élué avec l'éther de pétrole + 10 % d'acide acétique : ce sont les caractéristiques de l'astaxanthine libre puisque hypophasique (courbe fig. 10 c). Bien entendu, il faut encore signaler de l'astacine en surface de l'alumine.

L'astaxanthine se trouve dans la couche pigmentaire de la carapace à l'état de chromoprotéïdes variés, d'où les teintes variables des animaux. Ainsi, des Crabes de teintes très différentes, du vert très prononcé au brun, ont tous révélé à l'analyse les deux pigments précédents en proportions variables.

En outre, des extraits de carapace colorée, prélevée sur d'autres régions de l'animal, articles des pattes et abdomen, ont encore donné exactement les mêmes résultats quant à la nature des pigments trouvés. Ces données sont également valables pour les carapaces non encore calcifiées analysées au stade B, donc immédiatement après la mue ou peu de temps après.

D'autre part, on sait que des Crabes d'élevage nourris normalement après la mue acquièrent une teinte de plus en plus orange et même rouge, visible en particulier sur le plastron ventral et sur les membranes articulaires minces et non calci-

fiées. ABELOOS et FISCHER (1927) ont montré que ce pigment rouge était d'origine alimentaire puisqu'il ne se dépose pas chez des animaux à jeun ou carencés en caroténoïdes. J'ai eu moi-même l'occasion de le vérifier (voir p. 62, 68).

VERNE (1927) pense alors à l'existence d'un pigment endogène situé dans la couche pigmentaire préexuviale et d'un pigment exogène rouge imprégnant les téguments après la mue.

J'ai recherché la nature de ce dernier pigment qui imprègne en fait toute la couche principale calcifiée mais que l'on remarque surtout face ventrale car la couche pigmentaire y est moins colorée ; c'est également de l'astaxanthine caractéris-

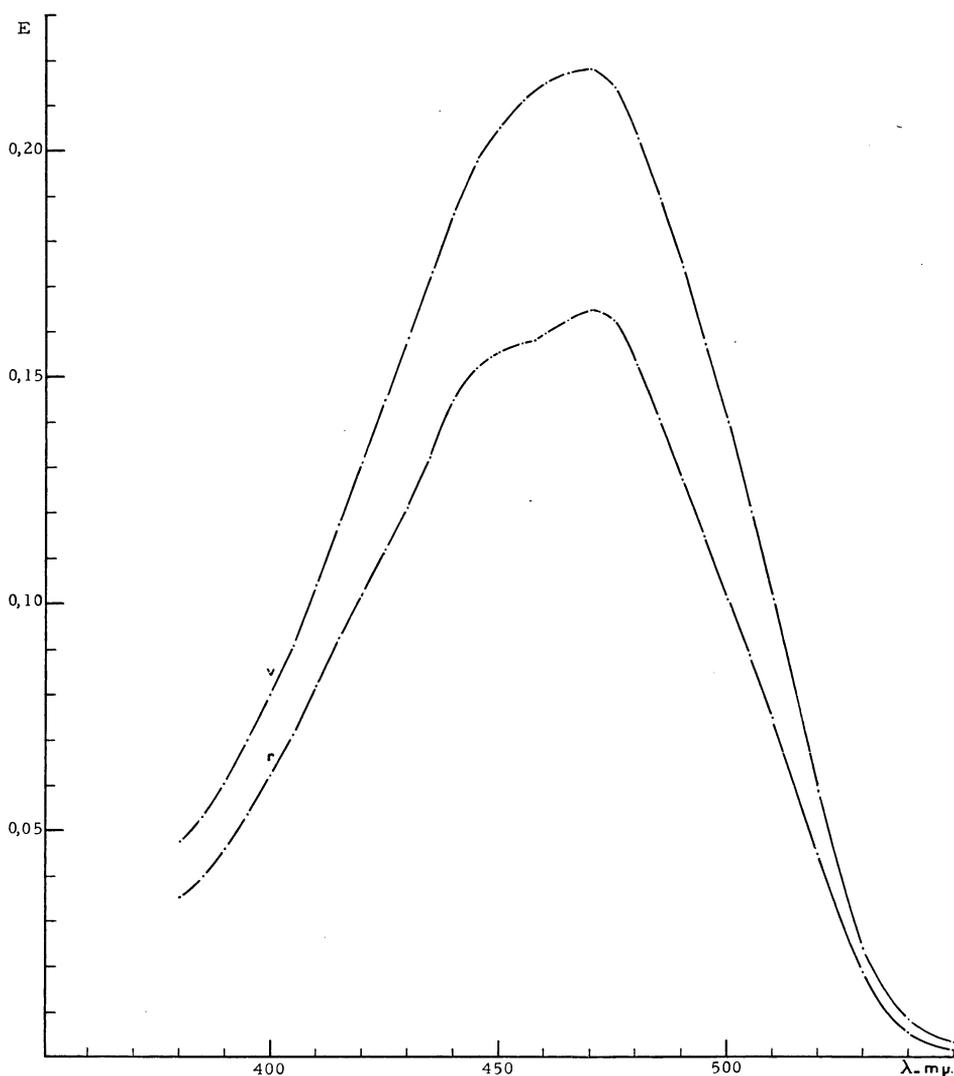


Fig. 11. — Spectres d'absorption des pigments extraits de carapaces, en solution dans l'éther de pétrole :
 v = extrait de carapace verte ;
 r = extrait de carapace rouge.

tique, absolument identique à celle des autres assises. Il en est de même pour le pigment des membranes articulaires.

En résumé, quelles que soient les assises ou régions, calcifiées ou non du squelette tégumentaire, à n'importe quel stade du cycle d'intermue, il existe dans la carapace de *Carcinus maenas* deux pigments, la xanthophylle et l'astaxanthine, tous deux entièrement hypophasiques, donc sous forme libre ; pourtant, FABRE et LEDERER (1934) signalent un pigment épiphastique dans la carapace de certains Crustacés, et SMITH (1913) n'y admet pas la présence de lutéine.

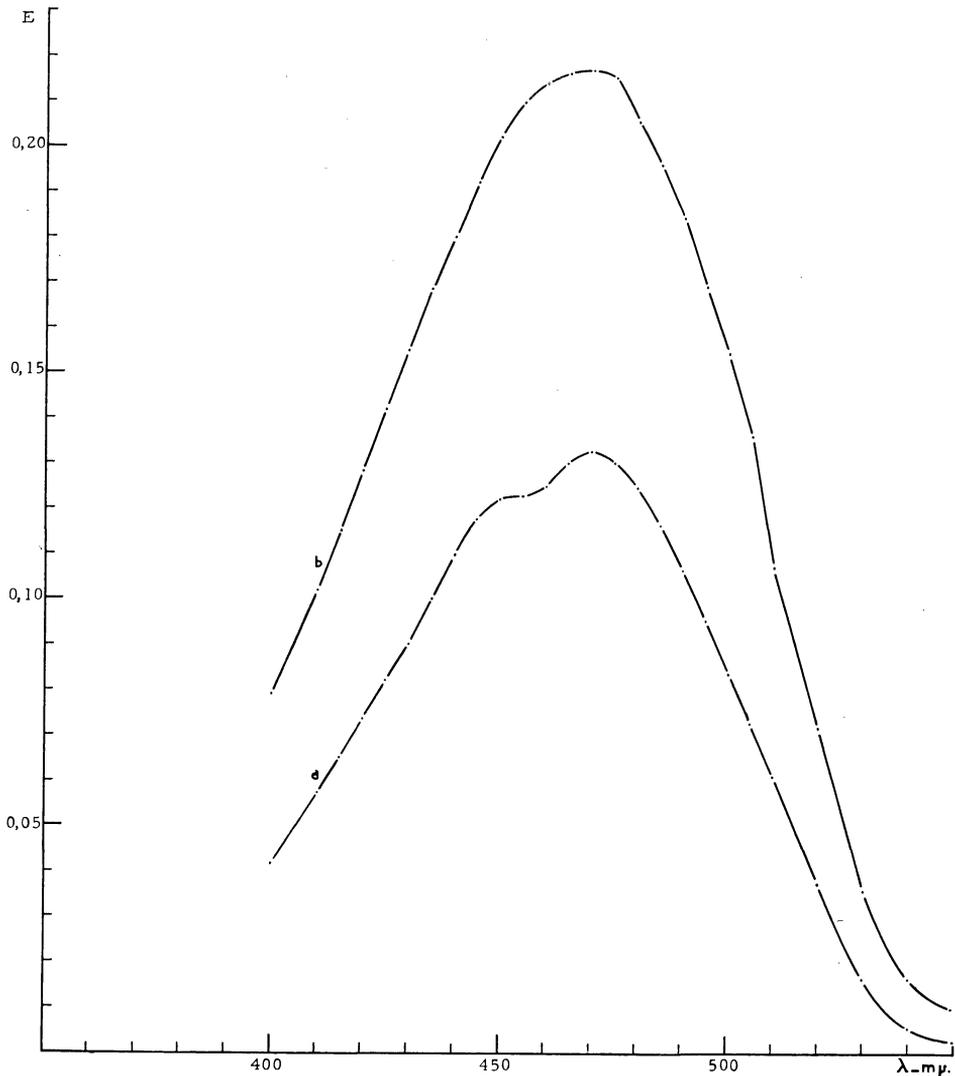


Fig. 12. — Spectres d'absorption des pigments extraits d'une exuvie, en solution dans l'éther de pétrole :
 a = spectre d'un extrait prélevé immédiatement après la mue ;
 b = spectre d'un extrait de la même exuvie prélevé plusieurs mois après la mue.

Remarquons avec intérêt que la proportion respective de ces deux pigments n'a pas de rapport obligatoire avec la teinte de l'animal. L'étude comparée de la forme des spectres d'absorption des solutions brutes (avant séparation chromatographique) extraites d'une carapace très verte (fig. 11 v) et d'une carapace très rouge (fig. 11 r) indique une plus forte quantité d'astaxanthine dans la carapace verte où elle se trouve donc sous forme de chromoprotéide. Le maximum de l'astaxanthine situé à 470 m μ est en effet moins prononcé dans la courbe de la figure 11 r que dans celle de la figure 11 v où il masque complètement le maximum à 448 m μ de la xanthophylle.

2. — PIGMENTS DES EXUVIES.

Il est évident que les pigments de l'exuvie sont les mêmes que ceux de la carapace puisque cette partie du Crabe ne subit pas, à ce point de vue, de remaniement chimique à la mue. Seule une différence de proportion entre les deux pigments présents peut être observée, en relation avec la nourriture ou le métabolisme de l'animal pendant l'intermue. Indiquons encore que la xanthophylle se détruit rapidement dans l'exuvie, comme le montrent les courbes d'absorption d'extraits de fragments prélevés immédiatement après la mue (fig. 12 a) et plusieurs mois après (fig. 12 b). On voit que le maximum à 450 m μ dû à la xanthophylle a totalement disparu dans la deuxième solution où la chromatographie ne révèle que de l'astaxanthine. Il faudra donc tenir compte de ces faits au cours de nos analyses.

3. — PIGMENTS DE L'HYPODERME.

Cette partie des téguments du Crabe est prélevée par dissection sous la carapace ou sous les nouveaux téguments. Il est nécessaire de veiller à ne pas prélever en même temps des morceaux, même infimes, d'hépatopancréas ou d'ovaire, organes situés immédiatement sous l'hypoderme et contenant eux-mêmes en grande quantité plusieurs caroténoïdes. Pour la même raison, on lave soigneusement le tissu afin d'éliminer les traces de sang ou de liquide digestif qui peuvent être extraits en même temps. J'ai effectué plus de 25 études d'hypodermes prélevés sur des animaux à diverses étapes physiologiques ou dans des conditions de vie différentes. J'ai dû essayer plusieurs méthodes de travail avant d'en adopter une définitivement.

J'ai déjà publié (1955 b) une partie de mes résultats. Je donnerai ici une synthèse de ces analyses illustrant l'étude type d'un extrait de plusieurs hypodermes et groupant toutes les observations et résultats obtenus.

Une première remarque s'impose, c'est le caractère totalement et constamment épiphastique des pigments de l'hypoderme qui sont donc tous sous forme d'esters, alors que, dans la carapace, qui en est pourtant issue, ceux-ci sont toujours et complètement hypophasiques. Il n'en est pas de même chez tous les Décapodes puisque MASSONET (1958) montre que chez *Aristeomorpha foliacea* et *Aristeus antennatus* l'hypoderme renferme une partie d'astaxanthine non estérifiée.

La solution brute, en éther de pétrole, est étudiée directement sans autre manipulation, au spectrophotomètre. La courbe d'absorption (fig. 13 a) ne peut être celle d'un pigment pur. On partage alors cette solution en deux portions A et B dont une (A) est immédiatement saponifiée ; son spectre d'absorption (fig. 13 b) comparé au précédent, montre un accroissement important du maximum situé à 470 m μ . On en déduit la formation d'astacine aux dépens d'astaxan-

thine estérifiée puisque épiphastique, et isomérisée puisque son maximum ne se trouve pas à 470 m μ avant la saponification. La suite de l'extraction confirme cette constatation.

La solution A est séparée en deux phases. L'épiphase jaunâtre est rincée puis concentrée. Son étude chromatographique sur Al₂O₃ P.L. 5 % et les courbes d'absorption des deux solutions obtenues montrent que les pigments qui la composent sont le β carotène et la cryptoxanthine en quantité peu importante.

L'hypophase, après transfert dans l'éther de pétrole, est chromatographiée sur Al₂O₃ M. I. Elle est fortement adsorbée sous forme d'une bande orange. Aucun pigment ne traverse directement la colonne. L'éluion avec l'éther de pétrole + 0,5 % de méthanol entraîne une légère bande double, orange devant, jaune derrière. Les courbes des solutions recueillies présentent de nombreux minima et maxima en position variable ; il s'agit donc d'impuretés ou de produits de dégradation.

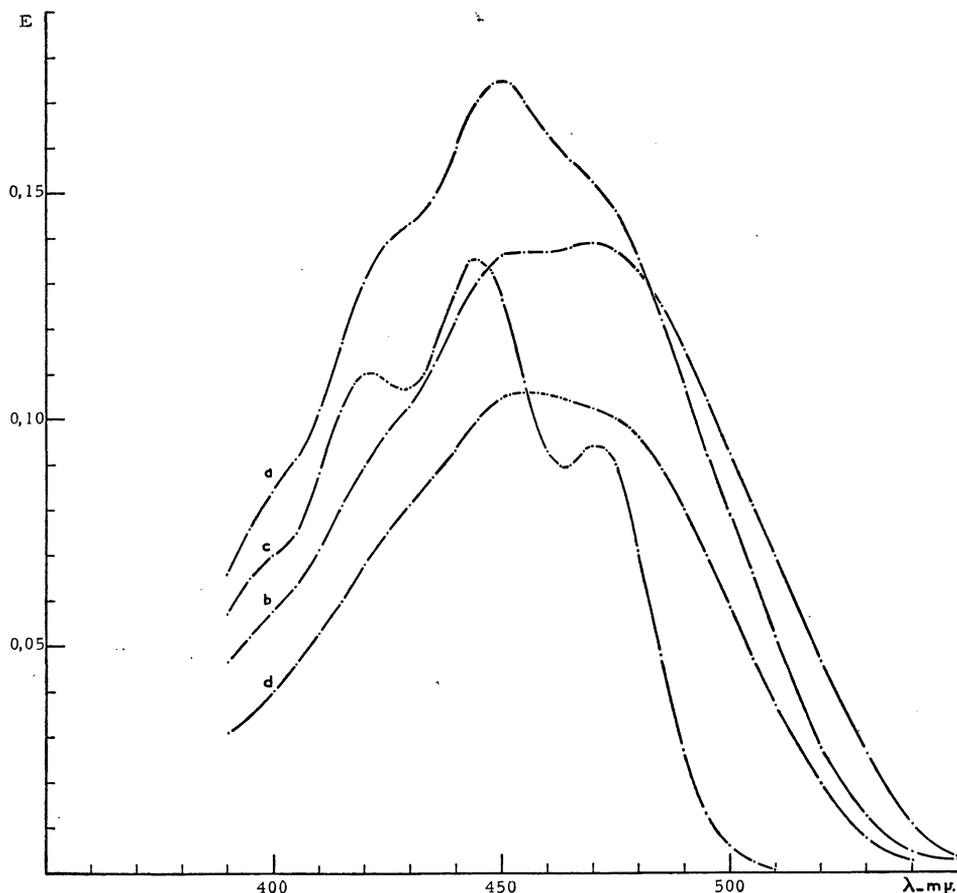


Fig. 13. — Spectres d'absorption des pigments extraits d'hypodermes, en solution dans l'éther de pétrole :

- a = extrait brut ; b = le même extrait après saponification ;
- c = solution hypophastique après saponification, éluee par l'éther de pétrole + 1 % de méthanol sur colonne d'alumine M.I. ;
- d = ester d'isomère d'astaxanthine adsorbé sur colonne de CO₃Ca.

Une solution d'éther de pétrole + 1 % de méthanol élue lentement une bande très jaune. On accélère sa descente avec l'éther de pétrole saturé de méthanol et on recueille une solution jaune (A'). Il reste alors en haut de la colonne une raie violette dont une partie est éluee par l'éther de pétrole + 10 % d'acide acétique et le reste par le méthanol 5 % potassique ; le premier de ces deux pigments doit être un hydroxy-céto-caroténoïde (?) puisque sa courbe d'absorption ne présente qu'un seul maximum à 458 m μ dans l'éther de pétrole ; le second est de l'astacine résultant de l'oxydation de l'astaxanthine en milieu potassique.

Les propriétés d'absorption de A' (fig. 13 c) démontrent la nécessité de poursuivre plus complètement la séparation. Désirant sécher cette solution après son rinçage, je l'ai versée sur une petite colonne de SO₄Na₂ ; j'ai alors remarqué que tout le pigment était retenu par le sel, la solution qui filtrait étant incolore. Partant de cette observation, je suis arrivé à séparer 3 zones nettes mais contigües sur colonne de SO₄Na₂ légèrement hydraté. En fractionnant et en prélevant uniquement le milieu de chacune des zones, on en extrait les pigments par l'éther de pétrole + 1 % de méthanol. La solution correspondant à la zone centrale s'est révélée comme étant un mélange des deux autres. D'après les courbes d'absorption, le caroténoïde de la première zone est la xanthophylle, celui de la dernière zone est le pigment que j'ai appelé carcinoxanthine (?) avec des traces de xanthophylle.

J'ai encore obtenu la carcinoxanthine (?) en chromatographiant la solution A' sur colonne d'alumine de base Prolabo ; il est, dans ce cas, plus difficile d'en séparer la xanthophylle.

La solution B est étudiée sur plusieurs adsorbants pour l'extraction des pigments entrevus ou identifiés par l'analyse de la solution saponifiée. Ainsi, une chromatographie sur colonne de CO₃Ca donne plusieurs zones colorées en jaune, orange et rose. La dernière bande rose est fractionnée du reste de la colonne et reprise par l'éther de pétrole + 1 % de méthanol. L'étude au spectrophotomètre des propriétés d'absorption en éther de pétrole montre un maximum unique à 456 m μ (fig. 13 d) ; l'absorption reste important jusqu'à 475 m μ . La saponification de ce pigment conduit à l'astacine facilement identifiée. On en déduit que ce pigment est l'ester d'isomère d'astaxanthine précédemment signalé. La présence d'une certaine quantité d'astaxanthine normale à maximum situé à 470 m μ , se formant vraisemblablement dans la solution et sur l'adsorbant, explique alors la forme de la courbe. Les pigments restant sur le CO₃Ca ne sont pas étudiés à la suite de cette manipulation.

La chromatographie de B sur alumine P.L. 5 % ne permet pas une séparation facile et complète des constituants de la solution. L'adsorption sur alumine M. I donne une large bande orange en haut de la colonne. La solution qui filtre avec l'éther de pétrole pur est incolore. Avec l'éther de pétrole + 0,5 % de méthanol, on recueille une solution orange (B') formée par le mélange de deux bandes, violette devant et jaune derrière, visibles sur le chromatogramme. L'élution par l'éther de pétrole + 1 % de méthanol puis par l'éther de pétrole saturé de méthanol n'entraîne aucun pigment. C'est avec l'éther de pétrole + 10 % d'acide acétique qu'on extrait le reste du pigment, c'est-à-dire l'hydroxy-céto-caroténoïde (?).

De la solution B', par chromatographie sur CO₃Ca ou sur SO₄Na₂, j'ai obtenu, d'une part l'ester d'isomère d'astaxanthine à maximum unique à 456 m μ et, d'autre part, une solution jaune. D'après les constatations précédentes, cette solution jaune contient le β carotène et les esters de cryptoxanthine, de carcinoxanthine (?) et de xanthophylle. C'est ce que démontre d'ailleurs la chromatographie sur SO₄Na₂ de cette solution après saponification.

Toutes ces manipulations se vérifient les unes les autres et se complètent entre elles. Elles me permettent de définir comme suit les pigments caroténoïdes que l'on est susceptible de trouver dans l'hypoderme de *Carcinus maenas* : du β carotène et les esters de la cryptoxanthine, de la carcinoxanthine (?), de la xanthophylle, d'un hydroxy-céto-caroténoïde (?) et d'un ou de plusieurs isomères d'astaxanthine. On voit ainsi que l'équipement caroténoïde de *Carcinus maenas* est plus complexe que celui de certains autres Décapodes (FABRE, LEDERER, 1934 ; GARCIA, GRANGAUD, 1953).

Remarquons encore que tous ces pigments sont estérifiés et que l'astaxanthine n'est pas à l'état de chromoprotéide, comme c'est pourtant le cas dans la carapace du même animal ou dans les téguments d'autres Invertébrés, comme le manteau du Siphonophore *Velella lata* (FOX, HAXO, 1959), les téguments des Sauterelles *Locusta migratoria migratorioides* et *Schistocera gregaria* (GOODWIN, SRISUKH, 1949 b) ou l'épiderme des Etoiles de mer (VEVERS, PHIL, 1952 ; NISHIBORI, 1954).

Le nombre relativement important de caroténoïdes de nature différente, mais voisine et intermédiaire, montre bien, comme le disent BUSNEL et DRILHON (1948), que « l'hypoderme est un tissu hautement métabolique ». C'est ce qui pourrait justifier ma remarque de la page 24 concernant la « carcinoxanthine » (?), bien qu'il soit normal, il est vrai, de trouver des substances altérées ou dégradées dans un tel tissu.

4. — PIGMENTS DES NOUVEAUX TÉGUMENTS.

Nous savons qu'on les trouve essentiellement dans la couche pigmentaire préexuviale. En conséquence, leur étude doit se faire au cours des stades D_2 , D_3 , D_4 et à la limite, au stade A_1 , immédiatement après la mue. Les résultats sont d'ailleurs variables, non seulement en fonction de ces divers stades, mais aussi, pour un même stade, selon les individus. On doit encore s'assurer, lors du prélè-

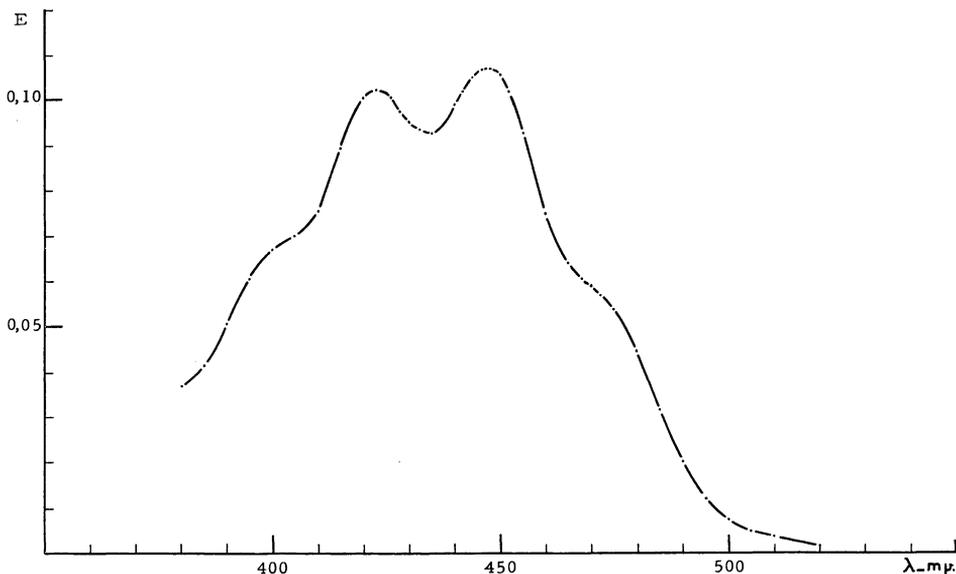


Fig. 14. — Spectre d'absorption des pigments totaux extraits des nouveaux téguments d'un animal au stade D_2 , en solution dans l'éther de pétrole.

vement des tissus à étudier, qu'il ne reste pas de lambeaux d'hypoderme sous-jacent adhérant fortement à cette assise, elle-même peu rigide.

Je me borne, dans ce paragraphe, à signaler la présence de certains pigments en réservant pour un autre chapitre l'analyse de leurs transformations de pigments caractéristiques de l'hypoderme en pigments spécifiques de la carapace.

Comme il n'y a pas de caractère constant, je prendrai plusieurs exemples illustrant les quelques cas possibles.

a) Nouveaux téguments prélevés sur le Crabe au stade D_2 avant la mue. Par action de l'acétone, on constate que le complexe pigment-protéine est déjà formé puisqu'il y a rougissement du tissu.

La solution en éther de pétrole est chromatographiée sur Al_2O_3 P.L. 5 %. Il se forme une zone jaune d'or qui s'élué facilement avec l'éther de pétrole + 1 %

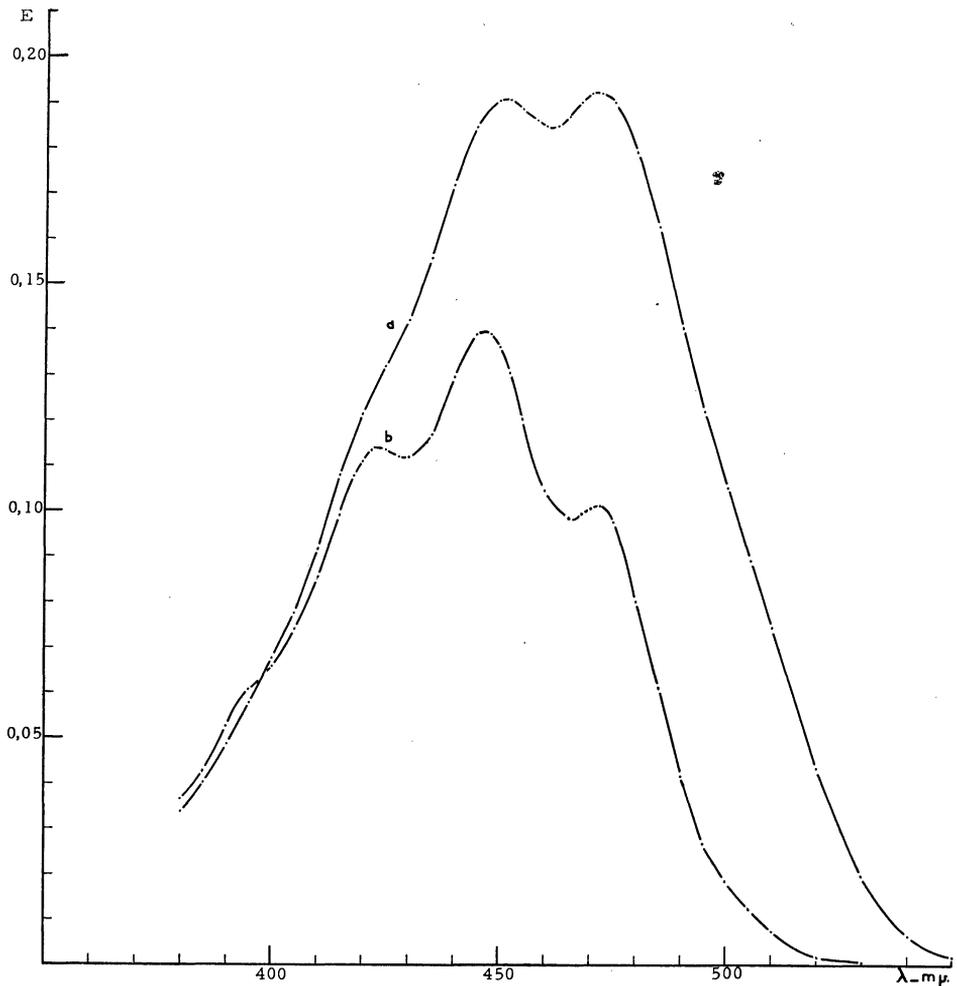


Fig. 15. — Spectres d'absorption des pigments extraits des nouveaux téguments d'un animal au stade D_2 , en solution dans l'éther de pétrole :

a = extrait des pigments totaux ;

b = mélange des pigments épiphasiques extrait de la solution brute.

de méthanol, en devenant un peu orange derrière. Il faut noter qu'il ne reste alors aucune trace de pigment en haut de la colonne, montrant ainsi qu'il n'y a pas formation d'astacine. La courbe d'absorption obtenue avec l'unique solution recueillie (fig. 14) indique d'ailleurs qu'il n'y a pas d'astaxanthine à 470 m μ . De la forme de cette courbe, on déduit encore que le pigment ne doit pas être pur. On refait donc une chromatographie sur Al₂O₃ M. I. On retrouve la même zone jaune d'or qui, là aussi, s'élue facilement avec l'éther de pétrole + 1 % de méthanol ; il ne reste toujours rien sur la colonne, ce qui prouve l'absence d'astaxanthine typique. La courbe d'absorption de cette nouvelle solution est identique à la précédente. La solution est entièrement épiphásique ; la saponification la transforme en solution hypophásique révélant à la chromatographie un pigment jaune ayant toujours la même courbe que précédemment et de l'astacine.

Ces différentes observations montrent que ces nouveaux téguments contiennent en fait de pigments caroténoïdes : un ester de « carcinoxanthine » (?) vraisemblablement, un ester de xanthophylle qui l'accompagne toujours et, en petite quantité, un ester d'isomère d'astaxanthine. C'est donc un lot de pigments en partie identiques à ceux de l'hypoderme, les proportions mises à part.

b) Je ne m'attarderai pas sur ces cas puisque les pigments isolés par chromatographie sur Al₂O₃ M. I et étudiés par leur spectre d'absorption se sont révélés être la xanthophylle libre et l'astaxanthine libre entièrement trans, à l'état de chromoprotéide. Ces pigments sont typiquement ceux de la carapace des mêmes animaux.

c) Ce sont encore des nouveaux téguments prélevés au stade D₂. Je ne redonne pas ici les détails d'extraction et de séparation et j'arrive tout de suite aux conclusions :

De la solution de base extraite des tissus dont la courbe d'absorption (fig. 15 a) montre l'hétérogénéité, on a extrait trois solutions dont deux sont hypophásiques et bien caractéristiques des pigments de la carapace : la xanthophylle libre et l'astaxanthine chromoprotéide. La troisième, par contre, est épiphásique ; c'est un mélange déjà entrevu d'après la forme de la courbe (fig. 15 b) de « carcinoxanthine » ester (?) et de xanthophylle ester, rappelant donc les pigments de l'hypoderme.

Je signalerai aussi les nouveaux téguments d'un autre animal au stade D₃ où j'ai trouvé les mêmes pigments avec, en plus, un ester d'isomère d'astaxanthine à bande d'absorption unique vers 455 m μ dans l'hexane.

Enfin, certains Crabes étudiés en A₁ présentaient encore, dans leur nouvelle carapace des esters de cryptoxanthine, de xanthophylle et du même isomère d'astaxanthine, en plus de la xanthophylle libre et de l'astaxanthine chromoprotéide.

Donc, dans tous ces derniers cas, on constate dans les nouveaux téguments la présence à la fois de pigments caroténoïdes typiques de la carapace et de l'hypoderme, bien différents entre eux.

B. — PIGMENTS CAROTÉNOÏDES INTERNES.

Le milieu intérieur, certains organes du Crabe qui peuvent être le siège de réactions métaboliques importantes : hépato-pancréas, ovaires, œufs, de même que le contenu digestif ou les excréments, sont tous plus ou moins diversement colorés. Ils contiennent des pigments caroténoïdes en qualité et en quantité très variables. Je me suis employé à définir tout d'abord leur nature, en général, sans tenir compte des modifications pouvant intervenir sous l'action de différents facteurs. Les testicules des animaux sont toujours absolument blancs et dépourvus de caroténoïdes ; il ne faut donc pas s'étonner de ne pas en trouver mention ici.

1. — PIGMENTS CAROTÉNOÏDES DE L'HÉMOLYMPHE.

J'utiliserai ici le terme hémolymphe de préférence à celui de sang employé quelquefois par d'autres chercheurs. Peu de données approfondies ont été publiées sur la nature des pigments caroténoïdes de l'hémolymphe des Crustacés et particulièrement de *Carcinus maenas*. Les auteurs ont surtout signalé la couleur du sang variant selon les sexes et les étapes physiologiques de l'animal. HEIM (1892) observe la teinte rouge du sang des Crustacés ; SMITH (1911) signale, chez *Carcinus maenas*, un sang coloré soit en rose saumon par le lipochrome tétronérythrine, caractéristique des mâles avant la mue, soit en jaune par le lipochrome lutéine présent surtout chez les femelles en vitellogenèse. ROBSON (1911) indique les mêmes caractères pour le sang du Crabe *Inachus mauritanicus*, VERNE (1921), recherchant la répartition de la zooérythrine, en mentionne une petite quantité dans le sang des Décapodes, en solution dans des lipoides, tandis que LWOFF (1927) conclut à l'existence de caroténoïdes dissous dans les globules lipidiques du sang du Copépode *Idya furcata*. ABELOOS et FISCHER (1926), puis FISCHER (1926),

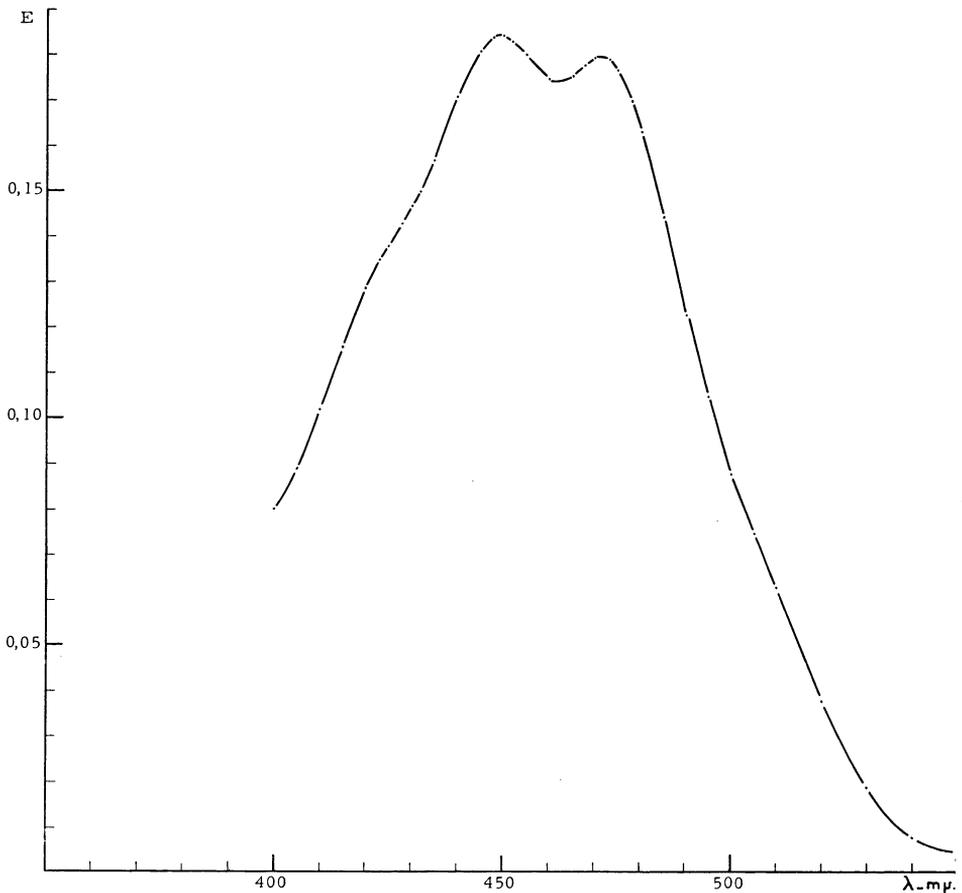


Fig. 16. — Spectre d'absorption de pigments extraits de l'hémolymphe, en solution dans l'éther de pétrole.
Pigments adsorbés sur Al_2O_3 sous forme d'une bande orange.

étudiant l'origine et l'absorption des pigments, démontrent la présence ou l'absence de pigments caroténoïdes dans le sang de *Carcinus maenas* d'après la teinte de celui-ci. Ils pensent que le pigment gagne le sang sous forme de lipochrome associé à une globuline.

La quantité d'hémolymphe recueillie chez un seul animal étant relativement réduite et la concentration de chaque pigment qui s'y trouve étant assez faible, j'ai d'abord effectué les indentifications sur des solutions constituées par le mélange d'hémolymphe de dix animaux d'un sexe ou de l'autre. Les observations ainsi enregistrées m'ont permis de retrouver ensuite les mêmes caractères, mais bien plus atténués dans l'hémolymphe d'individus étudiés isolément.

Les différences de teintes signalées plus haut, en rapport avec le sexe ou avec des aspects variés du métabolisme, ne sont pas dues à la présence de pigments de nature différente mais, comme l'analyse l'a montré, à des proportions plus ou moins importantes de l'un ou de l'autre d'entre eux. Je me bornerai donc, pour cette recherche qualitative, à l'étude d'une solution quelconque sans considération particulière.

La chromatographie en éther de pétrole sur alumine P.L. 5 % laisse passer une solution jaune qu'il est facile d'identifier comme étant du β carotène. Le développement du chromatogramme par le solvant pur permet de voir une large zone orange-jaune (b) descendant très lentement. Une bande orange (c) dont le front semble bordé de jaune s'étale un peu en haut de la colonne tandis que la surface de l'alumine reste violette (d).

Par fractionnement de la colonne, on reprend la zone b dans l'éther de pétrole + 1 % de méthanol. La courbe d'absorption dans l'hexane ou le CS_2 et le caractère épiphase avant comme après la saponification, indiquent que ce pigment est la cryptoxanthine.

La bande c est aussi reprise par le même solvant. Le spectre d'absorption de la solution après rinçage (fig. 16) montre d'une façon évidente un mélange de caroténoïdes. On chromatographie alors sur Al_2O_3 M. I où l'on observe une bande orange. Par élution avec l'éther de pétrole saturé de méthanol, il descend une bande jaune (c_1) tandis que l'alumine reste orange-rose en haut. Avec l'éther de pétrole + 10 % d'acide acétique, on obtient une solution orange (c_2).

Le pigment c_1 est hypophasique, même avant la saponification. Sa courbe d'absorption dans l'hexane ou le CS_2 est caractéristique de la xanthophylle. Le pigment c_2 est également hypophasique ; son spectre dans l'hexane montre un seul maximum à 470 $m\mu$; c'est donc de l'astaxanthine. La vérification est facile puisque la saponification conduit à l'astacine. Quant au pigment d extrait de l'alumine par le méthanol + 5 % de KOH, c'est bien entendu de l'astacine dont l'existence suffit à démontrer la présence d'astaxanthine.

L'équipement pigmentaire de l'hémolymphe d'un Crabe normal peut donc être constitué par le β carotène, la cryptoxanthine, la xanthophylle et l'astaxanthine.

2. — PIGMENTS CAROTÉNOÏDES DE L'HÉPATO-PANCRÉAS.

Parmi les auteurs qui se sont intéressés à la pigmentation de l'hépatopancréas, certains ont déjà été cités au paragraphe précédent ; cela n'est pas étonnant car il y a des rapports très étroits entre l'étude des caroténoïdes du sang et ceux de l'hépatopancréas.

Ainsi, SMITH (1911) observe les variations de la coloration et de l'aspect de cet organe chez *Carcinus maenas* ; ROBSON (1911) entreprend la même étude chez *Inachus mauritanicus*. En 1913, SMITH pense que l'hépatopancréas élabore beaucoup de lutéine et pas ou peu de tétronérythrine. ABELOOS et FISCHER (1926)

puis FISCHER (1927) suivent les variations de sa pigmentation en fonction de la nourriture et DRACH (1939) en fonction des différents stades de mue. Enfin, GOODWIN et SRISUKH (1949 a) ne trouvent pas d'astaxanthine dans l'hépto-pancréas du Homard et isolent uniquement des traces de β carotène. En 1953 (b) j'ai abordé sommairement ce sujet dont je donne ici un complément plus approfondi.

L'étude des pigments caroténoïdes d'un tel organe, d'ailleurs improprement nommé hépto-pancréas (DRACH, 1939, p. 235) n'est pas des plus faciles puisqu'il accumule de nombreuses substances de réserve, en particulier une quantité importante de graisse élaborée par des cellules à enclaves graisseuses pigmentées décrites par WEBER (1880). Les principales opérations de l'analyse en sont perturbées au point de ne pouvoir être totalement menées comme celles qui sont généralement utilisées. C'est ainsi qu'il se produit, lors de l'extraction, des émulsions considérables, difficiles à éviter ou à éliminer. Le comportement de l'extrait sur les colonnes chromatographiques est aussi modifié et les spectres d'absorption des solutions ainsi obtenues sont moins nets et moins caractéristiques.

Il est bien évident que ces inconvénients pourraient être évités en grande partie par une saponification ; mais alors on sait que les propriétés et la nature de certains caroténoïdes en seraient transformées.

Par ailleurs, cet organe joue un rôle primordial dans la physiologie et le métabolisme de l'animal. On peut donc supposer qu'il est le siège de réactions importantes et le lieu de transformation des pigments. C'est, semble-t-il, ce qui doit expliquer la présence, dans certains cas, de caroténoïdes de nature peu évidente et variable.

J'exposerai ici un exemple bien caractéristique comme type de séparation et de détermination des divers caroténoïdes identifiables dans l'hépto-pancréas de *Carcinus maenas*.

La solution en éther de pétrole est, en premier lieu, chromatographiée sur Al_2O_3 P.L. 5 %. Une solution jaune, toujours assez concentrée, traverse directement l'adsorbant. C'est bien entendu du β carotène en quantité très appréciable. Sur la colonne subsistent plusieurs bandes distinctes, diversement colorées, qui s'éluent toutes ensemble avec l'éther de pétrole + 1 % de méthanol. Le mélange recueilli est séparé en épiphase et hypophase.

L'épiphase est adsorbée entièrement sur Al_2O_3 M. I, sous forme d'une zone orange. L'éther de pétrole + 1 % de méthanol entraîne deux bandes accolées qu'on ne peut séparer, orange devant et jaune derrière. La courbe de la solution alors obtenue (fig. 17 a) indique bien un mélange de pigment. D'ailleurs, la saponification suivie d'une chromatographie sur Al_2O_3 P.L. 5 % sépare un pigment jaune, élué par l'éther de pétrole + 1 % de méthanol, restant épiphase et dont les propriétés d'absorption sont les mêmes que celles du β carotène : c'est donc la cryptoxanthine. Ce caroténoïde était accompagné d'un pigment de nature proche de l'astaxanthine puisque la surface de cette colonne reste très violette du fait de la présence d'astacine. La confirmation en est fournie par l'étude de la zone orange qui restait au centre du chromatogramme M. I ci-dessus et que l'on élue rapidement et facilement par l'éther de pétrole saturé de méthanol. L'unique maximum d'absorption de ce caroténoïde, situé vers 455 m μ dans l'éther de pétrole, montre qu'il existe bien, dans cette épiphase, un ester d'isomère d'astaxanthine dont une partie aurait été éluée en même temps que la cryptoxanthine.

L'hypophase alcoolique est remise en éther de pétrole puis chromatographiée sur Al_2O_3 P.L. 5 %. Aucun pigment ne traverse la colonne et il se forme à la surface une zone orange. Par élution avec l'éther de pétrole + 1 % de méthanol, on remarque qu'il ne descend qu'une seule bande orange tandis qu'une raie violette subsiste en haut de l'alumine. La courbe (fig. 17 b) de la solution orange

prouve la nécessité d'une autre chromatographie sur Al_2O_3 M. I pour en séparer les constituants. On obtient alors par l'éther de pétrole saturé de méthanol une solution jaune de xanthophylle et, par l'éther de pétrole + 10 % d'acide acétique, une solution orange d'astaxanthine.

D'autres vérifications consistant à mélanger, saponifier et séparer encore les pigments obtenus ont abouti à des résultats identiques. Tout ceci permet de conclure que l'hépatopancréas de *Carcinus maenas* peut contenir en tout ou en partie les pigments caroténoïdes suivants : β carotène, cryptoxanthine, xanthophylle, esters d'isomères d'astaxanthine et astaxanthine normale.

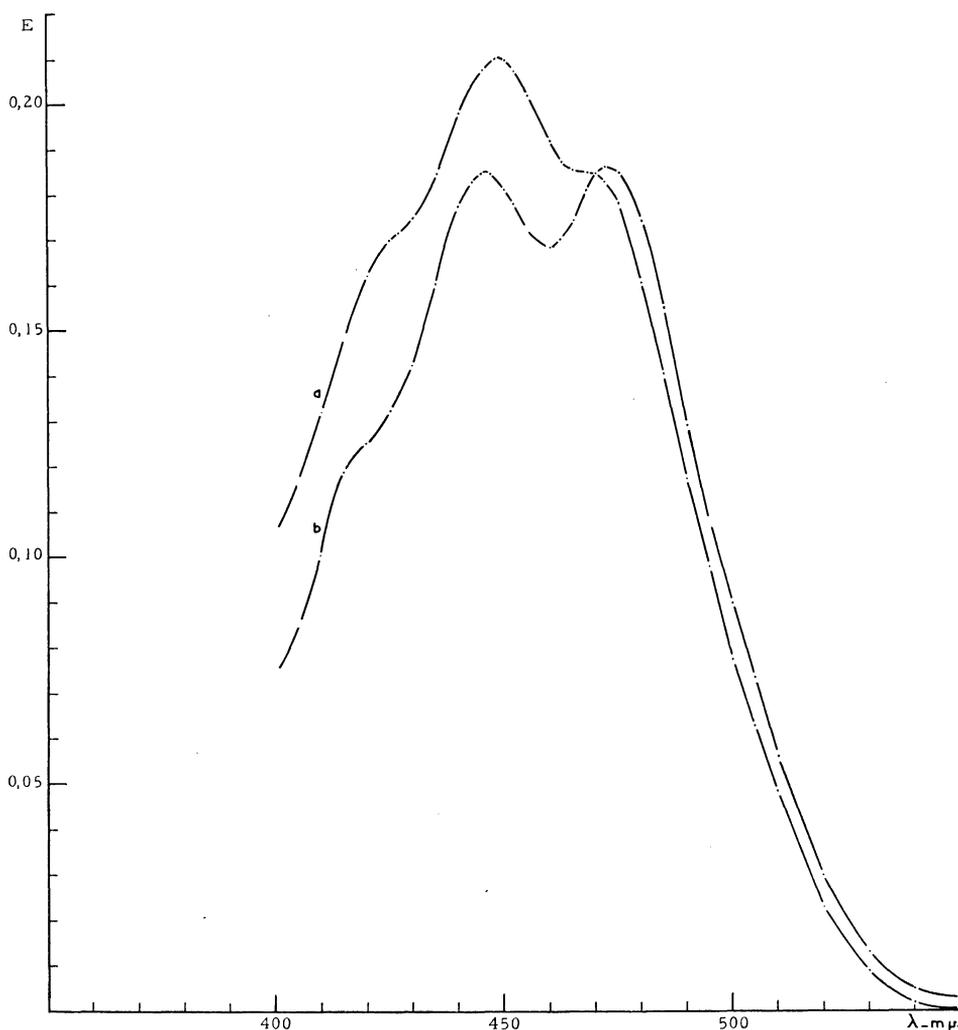


Fig. 17. — Spectres d'absorption de pigments extraits d'un hépatopancréas, en solution dans l'éther de pétrole :
 a = solution épiphásique élúée de l'alumine M.I. par l'éther de pétrole + 1 % de méthanol ;
 b = solution hypophásique élúée de l'alumine P.L. 5 % par l'éther de pétrole + 1 % de méthanol.

3. — PIGMENTS CAROTÉNOIDES D'EXCRÉTION.

Il est évident que les pigment rejetés avec l'exuvie peuvent être assimilés à des pigments d'excrétion mais, dans ce paragraphe, je considère avec FISCHER (1927 a, 1927 b) comme pigments d'excrétion ceux qui se trouvent dans le liquide digestif sécrété par l'épato-pancréas de l'animal et ceux qui sont rejetés avec les déjections. Ils dépendent pour une large part de la nourriture, ce qui rend leur étude très complexe surtout si les animaux sont à jeun depuis trop peu de temps. Ils dépendent aussi de l'équipement caroténoïde de l'hépato-pancréas au moment de l'expérimentation ; celui-ci est déterminé par l'étape physiologique du Crabe et par son mode d'alimentation au cours des cycles précédents. En outre, les enzymes digestives les altèrent et les détruisent rapidement. Les solutions alors étudiées ont des propriétés d'adsorption et d'absorption dont il est difficile de tirer des conclusions définitives.

Les seuls pigments caroténoïdes révélés par les méthodes courantes de chromatographie et de spectrophotométrie et sur la nature desquels il n'y a pas de doute à avoir sont tout d'abord le β carotène puis la xanthophylle et, vraisemblablement, l'astaxanthine, mais en petite quantité, alors que celle du β carotène est proportionnellement très importante.

4. — PIGMENTS CAROTÉNOIDES DES OVAIRES ET DES ŒUFS.

Les travaux effectués sur les pigments des ovaires et des œufs sont très nombreux. De tout temps, on a remarqué les couleurs très vives et très variées de ces organes dans la plupart des espèces animales. Ces teintes sont évidemment dues, au moins en partie, à la présence dans ces cellules, de pigments caroténoïdes.

L'étude de ces pigments a été très approfondie dans tout le règne animal depuis les Coelentérés jusqu'aux Oiseaux, comme on peut le constater à la lecture de GOODWIN (1952 a) en particulier.

Mentionnons chronologiquement quelques recherches concernant les ovaires ou les œufs de Crustacés. VEGEZZI (1916) trouve un mélange de « carotène » et de « vitellorubine » dans les œufs de *Maja squinado*. VERNE (1921) note d'une manière générale la présence de carotinalbumine dans les œufs de Crustacés Décapodes. LWOFF (1925, 1927) étudie le caroténoïde-protéide des œufs du Copépode *Idya furcata* et suit le processus du passage de ce pigment du sang dans les œufs. TEISSIER (1932) observe le caroténoïde-protéide vert des œufs de Daphnie. KUHN et LEDERER (1933) isolent un pigment unique, l'astacine, à partir de l'ovoverdine, chromoprotéide vert des œufs de Homard et KUHN, LEDERER, DEUTSCH (1933) le mettent également en évidence à partir du chromoprotéide rouge des œufs de *Maja squinado*. Cela amène FABRE et LEDERER (1934) à conclure que les œufs de Crustacés contiennent un ester d'astacine hypophasique, soluble dans le méthanol.

Plus récemment, GOODWIN (1950, 1951), analysant le métabolisme des pigments caroténoïdes des œufs du Homard durant leur développement, indique, comme les auteurs précédents, la présence d'astaxanthine sous forme d'un chromoprotéide vert.

Enfin, GREEN (1957) étudie les rapports existant entre le caroténoïde-protéine du sang et celui des œufs de Daphnie où il trouve en outre du β carotène. Tout dernièrement, dans les œufs du Copépode *Cyclops vernalis*, DUPRAW (1958) observe l'action du régime alimentaire sur les variations de la pigmentation liées à la proportion d'astaxanthine et d'un caroténoïde-protéide.

Je n'ai pas trouvé d'indications précises concernant les pigments caroténoïdes des ovaires et des œufs du Crabe *Carcinus maenas*.

La nature des pigments mis en évidence dans les ovaires prélevés après dissection de l'animal est identique à celle des pigments des œufs détachés des pléopodes de la femelle où ils sont fixés après la ponte. Il n'y a donc pas de distinction à faire entre ces deux cas.

La solution de pigments en éther de pétrole est chromatographiée sur Al_2O_3 P.L. 5 %. Il passe immédiatement une solution jaune assez concentrée de β carotène puis, au centre de la colonne, il se forme une bande jaune alors que la partie supérieure présente une zone orange surmontée en surface de l'alumine d'une raie rose. On fractionne la colonne et on reprend d'une part la bande jaune, d'autre part le mélange des deux autres zones avec l'éther de pétrole + 1 % de méthanol. Le pigment jaune totalement épiphase le reste même après la saponification. Ces propriétés, de même que les courbes d'absorption dans l'éther de pétrole ou dans le CS_2 sont celles de la cryptoxanthine.

L'autre solution, après rinçage, est chromatographiée sur Al_2O_3 M. I. Tout le pigment est adsorbé en surface de la colonne sous forme d'une bande orange ; avec l'éther de pétrole + 0,5 % de méthanol, aucun pigment ne descend ; en éluant avec l'éther de pétrole + 1 % de méthanol, il se détache une bande très jaune lente à descendre. Pour accélérer son élution totale, il faut utiliser l'éther de pétrole saturé de méthanol. La solution jaune ainsi recueillie est hypophasique, avant comme après la saponification ; c'est bien entendu de la xanthophylle à courbe d'ab-

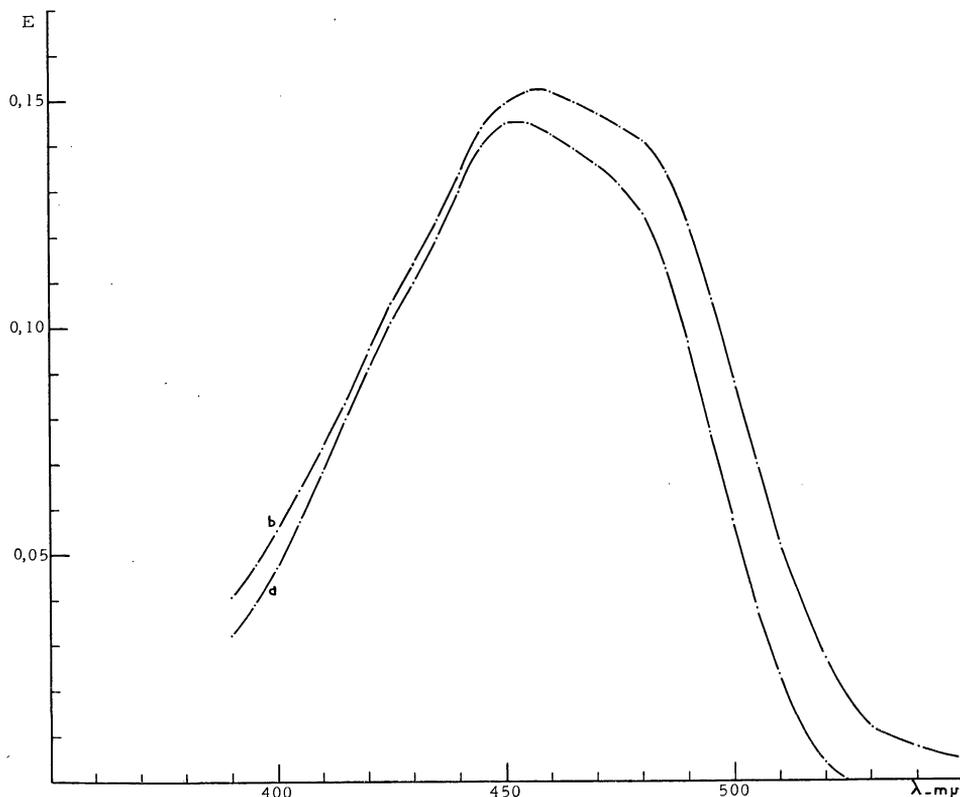


Fig. 18. — Spectres d'absorption de l'hydroxy-céto-caroténoïde extrait d'ovaires, en solution dans l'éther de pétrole :
 a = avant la saponification ;
 b = après la saponification.

sorption en éther de pétrole bien caractéristique. Le départ de la xanthophylle laisse sur la colonne d'adsorbant une bande rose. L'élution par l'éther de pétrole + 10 % d'acide acétique fournit une solution rose orange hypophasique après rinçage. Le maximum d'absorption unique à 470 m μ dans l'éther de pétrole et la forme de la courbe indiquent la nature de ce pigment : c'est de l'astaxanthine libre.

Je dois signaler une observation faite en cours d'analyse d'une solution de pigment, très concentrée car extraite de plusieurs ovaires. Pendant la chromatographie, après le passage du β carotène, il s'est formé sur la colonne une bande rose orange en partie mélangée à celle de la cryptoxanthine. Par fractionnement, j'ai repris ce pigment et j'ai étudié ses propriétés d'absorption (fig. 18 a). Après la saponification, la courbe est pratiquement inchangée (fig. 18 b). J'ai alors chromatographié cette solution saponifiée sur Al₂O₃ P.L. 5 %. Le pigment obtenu sous forme d'une bande rose est élué complètement avec l'éther de pétrole + 1 % de méthanol. Il ne restait rien sur l'adsorbant, ce qui prouve qu'il n'y a pas eu formation d'astacine ; ce pigment n'est donc pas un isomère d'astaxanthine. Après chromatographie, la courbe d'absorption de ce caroténoïde est identique aux deux précédentes. L'aspect des spectres d'absorption avec un maximum unique vers 456 m μ , les propriétés des solutions avant et après la saponification font penser que ce pigment est peut-être un mono-hydroxy-mono-céto-caroténoïde (?). Ce pigment doit exister en très petite quantité ; c'est pourquoi je n'ai pu le détecter que dans un extrait concentré de plusieurs ovaires.

Dans les ovaires ou les œufs de *Carcinus maenas*, on peut donc mettre en évidence : le β carotène en grande quantité, la cryptoxanthine, la xanthophylle libre, l'astaxanthine hypophasique et, vraisemblablement, des traces de mono-hydroxy-céto-caroténoïde (?). Ces différentes sortes de pigments caroténoïdes montrent qu'il existe une différence entre les ovaires de *Carcinus maenas* et ceux d'autres Crustacés Décapodes (Maja ou Homard) où les auteurs n'ont trouvé qu'un seul pigment : l'astaxanthine.

CONCLUSION

Dans ce chapitre, j'ai montré la localisation des pigments caroténoïdes dans les différents tissus ou organes de l'animal en donnant pour chaque cas un exemple typique d'analyse ainsi que les caractéristiques des pigments déterminés.

Le tableau III (p. 126) exprime schématiquement cette répartition. On peut y remarquer que certains caroténoïdes sont fréquents et largement répandus ; c'est le cas par exemple de l'astaxanthine qui existe sous l'une ou l'autre forme dans tous les tissus étudiés. On a d'ailleurs dit que c'était le pigment spécifique des Crustacés. En revanche, d'autres pigments tels que la carcinoxanthine (?) ou les hydroxy-céto-caroténoïdes (?) sont très localisés et mal connus. On remarque encore que le β carotène se situe dans les organes au métabolisme prononcé, mais qu'il est toujours absent de la carapace et que la cryptoxanthine qui l'accompagne toujours semble jouer le rôle d'intermédiaire entre celui-ci et les pigments plus spécifiques de l'animal. Cela est particulièrement net dans les assises tégumentaires où les pigments de l'hypoderme sont les précurseurs histologiques et biochimiques des pigments de la carapace.

A la suite de ces constatations, il y a lieu de définir les raisons et les conséquences de la présence de ces pigments caroténoïdes dans l'animal ; c'est pourquoi la troisième partie de cet ouvrage sera consacrée à l'étude de leur métabolisme.

RÉSUMÉ DE LA DEUXIÈME PARTIE

Dans la deuxième partie consacrée plus particulièrement à l'étude physico-chimique des pigments caroténoïdes :

— j'ai décrit les principes et le processus des diverses méthodes d'extraction, de séparation et de détermination que j'ai essayées et utilisées. Ces manipulations permettent d'obtenir une solution presque toujours pure d'un pigment caroténoïde bien défini par ses propriétés de partage entre solvants, d'adsorption chromatographique et d'absorption dans le spectre visible. La concentration du pigment dans cette solution peut aussi être connue ;

— j'ai rappelé les difficultés rencontrées dans la recherche de leur nature du fait de leur fragilité, de leur sensibilité aux différents agents physiques ou chimiques et de leur faculté d'isomérisation. J'ai pu néanmoins mettre facilement en évidence, sous des formes variables pour certains, le β carotène, la cryptoxanthine, la xanthophylle (lutéine), l'astaxanthine et l'astacine. D'autres pigments aux caractères plus imprécis, qui peuvent être des mono ou poly-hydroxy-caroténoïdes et des mono-hydroxy-mono-céto-caroténoïdes, ne sont pas à négliger car ils pourraient bien avoir une certaine importance biologique ;

— j'ai situé ces pigments dans l'animal en étudiant le stock pigmentaire des différents téguments et des principaux organes ou tissus. La connaissance de leur localisation fournit des données intéressantes et indispensables pour comprendre leur métabolisme.

TROISIÈME PARTIE

MÉTABOLISME DES PIGMENTS CAROTÉNOÏDES DANS L'ANIMAL

Les chapitres précédents ont mis en évidence le nombre relativement important et la diversité des pigments caroténoïdes répartis dans l'animal. Ce lot de pigments, très inégal en quantité et en qualité selon les organes ou tissus, m'a conduit à étudier l'intéressante question de l'origine et de la transformation de ces substances dans le Crabe. Cela doit permettre ensuite de mieux comprendre leur métabolisme, éventuellement leur rôle et, surtout, les influences internes ou externes pouvant intervenir dans leurs réactions biologiques.

CHAPITRE I

ORIGINE DES PIGMENTS CAROTÉNOÏDES
DANS L'ANIMAL

La plupart des auteurs ayant étudié les pigments caroténoïdes de quelque animal que ce soit se sont évidemment posé la question de leur origine. Le but des expériences réalisées est de rechercher si l'animal peut ou non en faire la synthèse. En d'autres termes, les caroténoïdes que l'on rencontre dans un organisme sont-ils exogènes, c'est-à-dire apportés par la nourriture, ou endogènes, donc fabriqués par l'animal lui-même ?

PALMER et ECKLES (1914) affirment que les organismes supérieurs sont incapables de faire la synthèse de pigments caroténoïdes. VERNE (1921) cherche à démontrer l'origine synthétique des pigments des Crustacés Décapodes en se fondant d'ailleurs sur des arguments dont certains, d'une réelle valeur à l'époque, paraissent aujourd'hui bien superficiels. Son hypothèse repose sur le fait que la quantité de pigments de la carapace ne baisse pas lorsque l'animal est privé de nourriture (nous verrons que penser de cette constatation p. 62 et suivantes) ; il faudrait trop de nourriture, pense-t-il également, pour procurer au Crabe tout son pigment et il existe des isomères de « carotène » spécifiques des différentes espèces de Crustacés. Cependant, en 1923 (b), il remarque que la coloration rouge des Daphnies disparaît pendant le jeûne. En 1926 (a), il admet deux processus : certains pigments seraient absorbés avec la nourriture, d'autres seraient élaborés par les cellules pigmentaires. La conclusion d'ABELOOS et FISCHER (1926) est identique après observation des pigments du foie de *Carcinus maenas* ; mais FISCHER (1927 b) rectifie en disant que si l'origine alimentaire des pigments du foie est indiscutable, rien ne permet de leur supposer une origine synthétique.

Viennent ensuite les recherches de LWOFF (1927). Après avoir discuté minutieusement les travaux des auteurs précédents, il constate que les cellules pigmentaires de l'œil du Copépode *Idya furcata* s'appauvrissent en pigments caroténoïdes sans en être jamais totalement dépourvus ; il en déduit qu'il a, lui aussi, démontré les deux origines possibles.

TEISSIER (1932) obtient des œufs rouges du fait de la présence de l'hémoglobine chez des Daphnies nourries sans caroténoïde alors que, d'habitude, ces œufs sont colorés en vert par le carotiprotide ; en plus, il montre que, parmi les caroténoïdes, c'est uniquement la « carotène » de la nourriture qui peut redonner à l'œuf sa teinte normale. D'après lui, les pigments caroténoïdes ont donc une origine exclusivement alimentaire et non synthétique. Un autre avis est donné par LEDERER

(1938 a) qui conçoit l'origine des pigments caroténoïdes spécifiques des animaux inférieurs, soit par une transformation des caroténoïdes de la nourriture, soit par une synthèse à partir de corps incolores ; il précise cependant qu'il n'y a pas d'expérience très concluante en faveur de cette dernière possibilité. Plus tard, FOX (1947) reprend l'hypothèse de SORENSEN selon laquelle les Crustacés ne peuvent pas faire la synthèse des pigments caroténoïdes, en la généralisant à la plupart des Invertébrés ; d'après lui, l'astaxanthine résulte de l'oxydation incomplète de pigments caroténoïdes moins oxydés.

Quant à GOODWIN et SRISUKH (1949 c), ils discutent de la bio-synthèse de l'astaxanthine chez les Sauterelles *Locusta migratoria migratorioides* et *Schistocerca gregaria*. Ils révèlent par la suite (1951) que le β carotène et l'astaxanthine des téguments de ces animaux paraissent y être synthétisés puisqu'on ne les rencontre pas dans l'hémolymph. Pourtant, GOODWIN (1952 b) précise ultérieurement la question en déclarant : « aucune synthèse « de novo » de caroténoïde par « un animal n'a été démontrée. Tous les caroténoïdes animaux doivent, jusqu'à « preuve rigoureuse du contraire, être considérés comme une altération des caroténoïdes végétaux ingérés ».

Il n'est pas inutile de citer encore les recherches de MANUNTA (1952) qui, dans les larves de Doryphore, admet l'existence d'un pigment endogène puisque n'existant pas dans la nourriture de ces Insectes ; celles de GOLDMAN (1953) qui croit pouvoir démontrer la synthèse d'un caroténoïde dans les parties régénérées de l'hydrozoaire *Tubularia sp.* et celles d'OKAY (1954) étudiant le rôle joué par le régime alimentaire chez les Sauterelles. Enfin, revenons une fois encore à la Daphnie pour mentionner que GREEN (1957) prête à ce Crustacé la faculté de transformer les pigments caroténoïdes, car on retrouve du γ carotène et de l'astaxanthine dans l'animal quand il y a seulement du β carotène et de la lutéine dans la nourriture.

Les Vertébrés ont également fait l'objet d'observations sur ce sujet puisque STEVEN (1947) signale chez la Truite la concordance existant entre la présence ou l'absence de pigments dans les aliments et dans l'animal. FOX (1955) observe, chez le Flamand rose, une répartition spécifique de pigments caroténoïdes, en partie différents de ceux de la nourriture dans les divers organes de l'Oiseau. L'étude des pigments des Vertébrés m'éloigne de mon sujet ; c'est pourquoi je m'en tiendrai à ces deux exemples bien caractéristiques.

Une telle densité de travaux et d'hypothèses montre l'intérêt qui s'attache à cette question et la difficulté évidente qu'il y a pour la résoudre de façon satisfaisante. C'est pourquoi j'ai pensé qu'il était utile de reprendre ce sujet et que l'étude des modifications de la pigmentation des tissus du Crabe en relation avec la nature des caroténoïdes ingérés, avec le cycle d'intermue, la vitellogenèse, me permettrait de dégager des conclusions bien charpentées sur le métabolisme des caroténoïdes dans l'animal.

Jusqu'à présent, les auteurs ont décrit en partie les variations de la pigmentation des organes, en particulier chez divers Crabes, mais sans faire de rapprochements entre les observations. J'ai essayé ici d'en établir un schéma d'ensemble, tenant compte des influences réciproques sous l'action d'une nourriture bien déterminée et contrôlée.

ACTION DE LA NOURRITURE.

Les éléments principaux des expériences ont été réalisés à la Station biologique de Roscoff (Finistère) durant les mois de septembre et octobre 1952, et de juin, juillet, août, septembre des années 1953 et 1954.

Certains individus intéressants ont pu être ramenés et élevés dans les mêmes conditions à l'Institut de Biologie de Nancy jusqu'au mois de décembre. Pour démontrer la qualité de ces élevages, je signalerai par exemple qu'un des Crabes a été suivi pendant 240 jours (du 23 juin 1953 au 20 mars 1954). La durée moyenne d'observation fut de trois mois, ce qui est un laps de temps bien suffisant pour observer le comportement de l'animal pendant les diverses étapes physiologiques.

Il est nécessaire de disposer de témoins et d'animaux en expérience en nombre important, car il faut tenir compte des facteurs individuels ou des incidents pouvant survenir en cours d'étude et susceptibles de modifier les conditions d'observation (apparition de parasites, ponte, mue, évaison, mort). Cela permet en outre de sacrifier les individus à différents moments jugés opportuns et intéressants.

1. — MÉTHODE D'OBSERVATION.

Les élevages individuels, possibles durant de longues périodes, se sont révélés particulièrement bien adaptés à ce genre de recherches. Il faut évidemment prendre soin de soumettre les animaux d'une même rangée de boîtes à un régime identique pour ne pas fausser les résultats de l'expérience par un passage d'aliments différents d'une boîte à l'autre.

Une fiche avec numéro d'ordre se rapporte à chaque individu. En plus de la description de l'animal : sexe, stade d'intermue, pigmentation des faces dorsale et ventrale et des membranes articulaires, etc..., elle comporte l'indication du régime, les remarques particulières au Crabe considéré, les modifications et manifestations de son état physiologique.

Des prises de « sang » limitées mais quelquefois répétées sont pratiquées à l'aide d'une seringue à l'endroit de l'articulation d'une patte marcheuse avec le thorax. Elles permettent de connaître et de suivre l'évolution du milieu intérieur. Cependant, ce traitement ne peut se prolonger sans dommage pour l'animal, et particulièrement pour l'équilibre de son métabolisme. Les exuvies et les œufs sont récoltés et étudiés dès leur prélèvement. A la mort de l'animal, les observations et analyses portent sur la couleur générale, sur l'aspect des téguments, l'état et la couleur de l'hépatopancréas, des gonades et de l'hémolymph.

Quand cela est possible et intéressant, l'analyse qualitative et quantitative des pigments caroténoïdes est effectuée, soit sur l'animal entier, soit sur les organes en particulier.

2. — TÉMOINS.

Les résultats exposés ici portent sur l'observation de 457 femelles et 357 mâles, tous normaux et étudiés dans les conditions naturelles (1). Pour tous, j'ai noté et comparé les relations et influences réciproques existant entre la pigmentation de l'hémolymph et de l'hépatopancréas en tenant compte des stades du cycle d'intermue et, pour les femelles, de la maturité des ovaires. Ces données sont consignées dans les tableaux IV et V, p. 127, 128.

Parmi les animaux étudiés, 66 se répartissant en 34 femelles et 32 mâles, avaient été élevés séparément et nourris d'aliments variés : cadavres de Crustacés divers, Mollusques (Patelles, Moules, Seiches) et Poissons. La plupart d'entre eux ont été choisis aussi identiques que possible aux animaux en expérience à tout point de vue.

(1) Je remercie très vivement Monsieur FRENZ, Chef de travaux à l'Institut de Biologie de Nancy, qui m'a aimablement transmis ses observations personnelles très abondantes.

Les autres Crabes, prélevés directement à la grève, avaient été immédiatement disséqués et étudiés. Les résultats, analogues dans les deux cas, montrent la valeur des conditions d'élevage, au moins en ce qui concerne la pigmentation ; ils ont pu être réunis dans cette étude.

En faisant une synthèse des travaux des chercheurs précédents et de mes propres observations, on constate qu'il est difficile de décrire fidèlement et de façon générale la pigmentation des différentes parties des animaux normaux dans leurs conditions naturelles. Il y a en effet de très nombreux facteurs individuels externes et internes, pas toujours connus, qui modifient les réactions attendues et compromettent l'établissement de règles définitives.

a) *Pigmentation de la carapace.*

La pigmentation de la carapace est très variable selon les individus. Elle dépend non seulement du stade du cycle d'intermue, mais aussi de l'âge, du sexe et, semble-t-il, de facteurs particuliers. La plupart du temps, elle est vert foncé sur la face dorsale, la région frontale étant elle-même souvent noirâtre ; la face ventrale est moins colorée ; le plastron est le plus souvent ivoire, l'abdomen plus ou moins verdâtre. Les animaux, de couleur assez claire après la mue, se colorent par la suite de plus en plus. Une pigmentation rouge diffuse imprègne la couche principale, se superpose à la précédente et apparaît plus nettement aux endroits primitivement incolores et aux membres articulaires. Les femelles sont souvent plus brunâtres que les mâles. On ne peut toutefois définir une coloration spécifique de *Carcinus maenas* ; certains sont bleutés, d'autres sont gris tachetés de noir et de rose, etc... C'est donc en observant après chaque mue les variations de la teinte de chaque animal considéré que l'on peut mieux se rendre compte des résultats obtenus.

Rappelons que ces différences de pigmentation ne sont pas dues à des différences dans la nature des pigments caroténoïdes de la carapace. Elles sont causées par des variations dans les quantités respectives de ces substances, et vraisemblablement comme NICOLA (1956) le suggère à propos des carapaces d'Etoiles de mer, à des formes différentes dans l'association du caroténoïde et des protéines en chromoprotéïdes.

Il n'est pas possible de fournir une donnée quantitative générale se rapportant à ces téguments et pouvant servir de chiffre témoin puisque les valeurs intrinsèques varient beaucoup d'un animal à l'autre. Cependant, nous verrons par la suite qu'il sera intéressant, pour un même animal, de suivre les variations de la teneur en pigment dans les exuvies ou les carapaces en fonction, par exemple, de la nourriture administrée au Crabe.

b) *Pigmentation de l'hypoderme.*

On sait que la plus grande partie des pigments de l'hypoderme se trouvent dans les cellules pigmentaires ou chromatophores qui, chez *Carcinus maenas*, sont monochromatiques et ne contiennent donc chacune qu'une seule sorte de pigment. Sous l'action de divers facteurs hormonaux (BROWN, 1948 ; KNOWLES et CARLISLE, 1956), ces pigments peuvent s'étaler ou se concentrer, ce qui modifie leur répartition dans la cellule et, par conséquent, entraîne des variations dans la teinte de l'animal (FINGERMAN, 1959).

On distingue, chez le Crabe, les chromatophores blancs qui semblent les plus internes, les chromatophores noirs ou mélanophores contenant la mélanine, puis les chromatophores renfermant les pigments caroténoïdes, certains étant jaune-orangé d'autres très rouge vif. Ces derniers sont situés en surface de l'hypoderme et ils adhèrent à certains moments à la couche membraneuse interne (caractéristique de l'étape C₄ dans la définition des stades du cycle d'intermue). On constate alors

quelquefois que la face interne de la carapace est rouge quand la couche membraneuse y reste collée ; il faudra donc l'éliminer dans l'étude des pigments de la carapace.

Les chromatophores sont diversement répartis dans l'hypoderme et lui donnent une couleur qu'il est difficile de définir dans le détail mais dont l'ensemble apparaît jaune verdâtre taché de plaques rougeâtres ou noirâtres. C'est la superposition des pigmentations de l'hypoderme et de la carapace qui, malgré l'épaisseur de cette dernière donne la teinte externe de l'animal.

Il faut savoir que BROWN (1949), à propos des phénomènes de changement de coloration, a mis en évidence la possibilité, soit d'une synthèse, soit d'une destruction des pigments dans les chromatophores ; il montre qu'il ne s'agit pas d'un simple transport des pigments dans une autre région du corps de l'animal, mais d'une altération chimique de ces substances, altération démontrée par l'analyse. CHASSARD (1957) a constaté un cas semblable chez *Hippolyte varians* où, suivant les circonstances de l'adaptation chromatique, il y a disparition des chromatophores ou apparition de « minuscules points colorés qui sont autant de chromatophores en « formation ».

Enfin, je pense, d'après des observations que j'exposerai plus loin (p. 86) que les chromatophores à caroténoïdes, orange ou rouges forment les éléments d'une même série et que, par transformation chimique dans la cellule, il doit y avoir passage de la forme orange à la forme rouge.

c) Pigmentation de l'hémolymph.

Elle a été observée par de nombreux auteurs déjà cités lors de l'étude de la nature des pigments (p. 44). J'emprunterai à DRILHON (1935) l'essentiel de leurs conclusions : le sang peut être incolore ou coloré en bleu par l'hémocyanine au moment de la mue et immédiatement après ; rose saumon lorsque la tétraérythrine masque l'hémocyanine, ce qui est caractéristique des animaux approchant de la mue ; enfin, jaune lorsque la lutéine est très abondante chez les femelles proches de la maturité génitale.

Ces constatations très générales sont sans aucun doute trop superficielles et, surtout, très schématiques. Une étude étendue et détaillée montre en effet une complexité d'aspects qui ne permet pas l'établissement de lois immuables. De plus, nous savons maintenant que le pigment rose est l'astaxanthine et que les pigments jaunes comprennent non seulement la lutéine, mais aussi le β carotène et la cryptoxanthine. Les proportions variables de ces différents pigments expliquent la diversité des couleurs de l'hémolymph. En outre, j'ai pu constater que l'hémolymph des animaux, quel que soit leur sexe, est presque toujours exempt de pigments caroténoïdes, donc incolore ou bleue après la mue. Cependant, chez un mâle au stade A_2 et chez trois mâles et deux femelles au stade B, elle était nettement rose. La pigmentation plus ou moins prononcée réapparaît en C_1 C_2 à la reprise de l'alimentation. Le tableau IV (p. 127) montre que chez les mâles l'hémolymph est alors rose (11 cas sur 13). Chez les femelles, les 9 animaux observés à ce stade avaient tous l'hémolymph jaune ou jaune orangé. Il faut noter que la proportion des hémolymphe colorées est inversée chez les animaux au stade C_3 . Dans ce cas, 26 mâles sur 36 étudiés ont le milieu intérieur incolore. On peut alors supposer que les réserves de l'hépatopancréas en pigment étant à peu près totalement épuisées (voir paragraphe suivant), la reprise récente de l'alimentation n'a pas encore permis la reconstitution d'un stock suffisant de pigment utilisable par l'organisme.

A partir de C_4 , il faut obligatoirement dissocier le cas des mâles de celui des femelles en raison des ovaires dont la présence influence le métabolisme de la pigmentation.

— Chez les mâles, la coloration est variable, allant de l'incolore (ou bleu) au rose vif en passant par la gamme des jaunes et orange. Les chiffres des tableaux IV et VI (p. 127, 129) établis pour 256 individus montrent que 50,8 % (130 exemplaires) ont l'hémolymphe incolore et que 49,2 % (126 exemplaires) ont l'hémolymphe nettement colorée ; parmi ces derniers c'est surtout l'hémolymphe jaune à carotène et xanthophylle qui est la plus fréquente. Ces résultats diffèrent sensiblement de ceux trouvés par SCHEER (1959) dans une étude peu approfondie des lipochromes du « sang » de 29 *Carcinus maenas* ♂ au stade C₄ dont 7 seulement étaient colorés de façon appréciable.

A l'approche de la mue, au stade D, à la formation des nouveaux téguments, la proportion des hémolymphe colorées augmente nettement : 38 contre 14 incolores (73,1 % contre 26,9 %) et c'est la pigmentation rose due à l'astaxanthine qui est alors dominante, surtout à la fin de la période D (20 roses sur 32 colorés en D₃ D₄) comme les auteurs précédents l'avaient déjà montré.

Ces différentes remarques sont corroborées par les tableaux IV et VI (p. 127, 129) et par l'étude de prélèvements successifs sur un même animal. Dans 6 cas, j'ai pu faire 8 prises espacées chacune de plusieurs jours avant la mort du sujet, la première faisant suite à la mue ; l'hémolymphe était d'abord incolore (stades A et B) avant de devenir rose (début des stades C) et passer ensuite du jaune au jaune orangé (C₄). Malheureusement, ces expériences n'ont pu être poursuivies jusqu'à la mue suivante à cause de la mort du Crabe provoquée par les ponctions peu importantes mais répétées.

— Chez les femelles en C₄ il existe deux possibilités : la vitellogenèse ne se produit pas et l'animal prépare une nouvelle mue ; ou bien il y a maturation des ovules ; l'animal reste alors en C₄ durant toute la vitellogenèse et l'ovogenèse jusqu'à l'éclosion des larves.

Le premier cas peut être assimilé à celui des mâles au même stade, les hémolymphe incolores et colorées (en majorité jaunes) étant à peu près en nombre égal.

L'examen du tableau V (p. 128) permet d'analyser facilement le deuxième cas. Au début de la vitellogenèse, l'hémolymphe, d'abord incolore, devient jaune ; elle est toujours jaune, puis jaune orangé au début de la maturation des oocytes. Ces faits sont d'ailleurs démontrés par le tableau VII (p. 130) où l'on peut suivre en partie cette évolution de la pigmentation grâce à des prélèvements répétés effectués sur 5 femelles. Ensuite, la sélection des différents cas est moins facile car il y a plus de variations. Sur 177 femelles étudiées à ce stade de développement, 142 avaient une hémolymphe pigmentée, le plus souvent en jaune, quelquefois en orange ou rose. Chez les 35 autres, elle était incolore ou bleue.

A l'approche de la ponte, on voit que l'hémolymphe devient moins vivement pigmentée. Ainsi, durant l'ovogenèse, la proportion se modifie et, à la fin de cette période, le nombre des hémolymphe incolores est plus élevé, ce qui est d'ailleurs lié au déficit de l'hépatopancréas en pigment. Cette observation est encore valable pour la fin du stade C₄ où certaines femelles n'ont pas encore reconstitué entièrement leur réserve de caroténoïdes.

Comme chez les mâles, la préparation de la mue marque presque toujours un retour de la pigmentation de l'hémolymphe durant les stades D. L'augmentation de la teneur en astaxanthine est signalée par une teinte rose orangé chez un plus grand nombre de sujets.

L'absorption plus ou moins grande de pigments avec la nourriture au cours de certains stades peut se superposer aux manifestations du métabolisme de ces substances dans l'animal. Il est alors intéressant de constater deux choses : d'une part l'hémolymphe est plus particulièrement jaune ou jaune orangé pendant les

périodes d'alimentation active (stades C₃ et C₄) où l'on peut supposer qu'elle transporte des pigments exogènes et endogènes jaunes, orange et roses en plus ou moins grande quantité ; d'autre part, les pigments endogènes roses — surtout l'astaxanthine — se trouvent seuls ou presque pendant les périodes de jeûne de l'animal, aux stades D, C₁ et C₂ et, dans certains cas, en fin de vitellogenèse. En fait, il n'y a pas obligatoirement action immédiate et directe de la nourriture puisque j'ai pu observer des hémolymphes totalement incolores chez des animaux se nourrissant pourtant abondamment d'aliments très riches en pigments caroténoïdes rejetés alors avec les excréments.

Je ne retrouve donc qu'approximativement les conclusions des chercheurs précédents et j'ai tenu à démontrer par un grand nombre d'observations qu'elles ne sauraient être tenues pour infaillibles. Cela est d'ailleurs normal si on considère que le milieu intérieur est commun à tous les organes et qu'il véhicule les pigments absorbés et transformés suivant les besoins.

La quantité dosable de pigment dans ce milieu intérieur est, de ce fait, très variable. Les chiffres trouvés vont de zéro, pour les hémolymphes incolores ou bleues, à 0,912 µg par ml pour une hémolymphes très colorée en rose ; on trouve, dans ce cas, 0,304 µg de β carotène par ml, ce qui représente le tiers du pigment total.

d) Pigmentation de l'hépto-pancréas.

Plusieurs facteurs interviennent dans la pigmentation de l'hépto-pancréas puisque c'est un organe digestif plus encore qu'un organe de réserve (FISHER, KON, THOMPSON, 1954). Les modifications de sa coloration et de son aspect sont non seulement liées à l'alimentation, aux stades du cycle d'intermue ou de la vitellogenèse, mais elles sont aussi le résultat de la composante des pigmentations des grandes vacuoles des cellules à ferments et des cellules à enclaves graisseuses. La présence de caroténoïdes de nature différente explique la diversité et la variabilité des teintes observées.

DRACH (1939, p. 249) a décrit l'aspect de l'hépto-pancréas de *Cancer pagurus* à toutes les étapes du cycle d'intermue. Il a noté que les différences tenaient surtout à la pigmentation. Ses observations se vérifient dans leurs grandes lignes chez *Carcinus maenas*. On peut dire approximativement que l'hépto-pancréas est jaune sale aux stades A, que les tubes hépatiques deviennent plus transparents, d'un jaune plus vif au stade B résultat de l'utilisation des réserves. Vers la fin de B, début de C, le pigment étant réutilisé en grande partie ou rejeté dans les excréments, l'organe est brun ou bistre, quelquefois même noir ou violacé. Malgré la reprise de l'alimentation, la coloration bistre ou blanche est la plus fréquente en C₃ comme le montrent les tableaux IV et V (p. 127, 128). Chez les mâles en particulier, on peut voir que, sur 36 sujets, 32 ont l'hépto-pancréas blanc bistre ou kaki.

Cela ne saurait surprendre si on considère, avec RENAUD (1949), que, pendant cette période, l'animal utilise directement les aliments qu'il absorbe sans qu'il y ait formation de réserves.

Pour les stades suivants, il faut étudier les deux sexes séparément.

En C₄, chez les mâles, l'aspect de l'organe varie selon la qualité et la quantité de la nourriture. Il y a prédominance des teintes jaunes ou jaune-orange ; on remarque cependant une proportion notable de teintes bistre. Il est vraisemblable que les hépto-pancréas peu ou pas colorés appartiennent à des animaux au début du stade ; puis l'organe se colore de plus en plus par accumulation de caroténoïdes ; à la fin de cette étape, il peut être intensément pigmenté. D'ailleurs, au début des stades D, 8 organes sur 10 sont fortement colorés. L'animal ne s'alimente

plus et, pourtant, l'hépatopancréas est encore pigmenté à la fin de D où le jaune et le jaune-brun prédominent dans 32 cas sur 42. Il est intéressant de signaler que je n'ai pas trouvé d'hépatopancréas orange aux stades D₃ et D₄. Cela peut s'expliquer par la réutilisation des pigments roses et orange — astaxanthine et xanthophylle — que nous avons retrouvés à ce stade dans l'hémolymphe afin d'être transportés vers les nouveaux téguments.

Le cas des femelles doit être envisagé en fonction de la vitellogenèse. Grâce au développement plus ou moins avancé des ovaires, il est possible d'imaginer une division du stade C₄. Sur le tableau V (p. 128) on peut suivre les modifications de l'aspect de l'organe en rapport avec ce découpage théorique. Au début, l'hépatopancréas n'a pas encore constitué toutes ses réserves ; il est souvent pauvre en pigment caroténoïde. Par la suite, la concentration s'accroît jusqu'à devenir importante dans les hépatopancréas jaune d'or et très jaunes. Les ovaires étant alors en plein développement, la demande en pigment dépasse les possibilités d'approvisionnement. L'hépatopancréas se décolore au point d'être quelquefois entièrement dépourvu de caroténoïdes au moment de la ponte. ABELOOS et FISCHER (1926) avaient déjà observé ce phénomène. Les relations avec la pigmentation de l'hémolymphe sont, là aussi, facilement observables.

Au cours de l'ovogenèse, l'hépatopancréas continue donc à se décolorer jusqu'à devenir le plus souvent blanc, blanc-crème, puis brun. Ensuite, les réserves se reforment grâce à la nourriture ; l'organe retrouve une coloration jaunâtre d'abord, puis nettement jaune (17 cas sur 20 en D₃ D₄). Cependant, cette mobilisation de pigments vers les ovaires peut se répercuter dans l'aspect de l'hépatopancréas avant la mue. Celui-ci n'est pas toujours aussi intensément coloré aux stades D que celui des mâles. Quelquefois même, certaines femelles qui n'ont pu reconstituer leurs réserves ont encore l'hépatopancréas blanchâtre au moment de l'exuviation (3 sur 20 en D₃ D₄).

Pour les femelles impubères ou celles qui muent plusieurs fois sans ponte intermédiaire, la pigmentation de l'organe peut être comparée à celle des mâles aux mêmes stades ; elle est très jaune en D.

Il y a donc deux périodes bien délimitées et bien nettes de décoloration maximum de l'hépatopancréas chez les femelles pubères : elles se situent légèrement après la mue et peu après la ponte.

Les résultats quantitatifs viennent confirmer ces observations. Seules les quantités de β carotène, faciles à doser, peuvent être prises en considération ; elles représentent des valeurs exactes et réelles. J'ai trouvé uniquement des traces de ce pigment dans les hépatopancréas décolorés par la ponte. Par contre, il en subsiste encore une quantité appréciable : 22,23 $\mu\text{g/g}$ dans l'organe d'un Crabe au stade A₁, donc venant de muer. J'en ai dosé 83,86 $\mu\text{g/g}$ dans celui d'une femelle au début de la vitellogenèse, 36,83 $\mu\text{g/g}$ et 29,16 $\mu\text{g/g}$ dans ceux d'autres femelles en cours de vitellogenèse. Des mâles pris au stade C₄ en contenaient au maximum 82,85 $\mu\text{g/g}$ et 29,10 $\mu\text{g/g}$ au minimum (voir tableau IX, p. 133).

Selon une remarque déjà mentionnée précédemment (p. 59) et en accord avec FISCHER (1927 a), je pense que l'hépatopancréas est capable d'absorber ou d'excréter certaines substances, dont les pigments caroténoïdes, suivant qu'elles sont ou non en excès.

C'est pourquoi un animal pourra rejeter des excréments très colorés même si la nourriture ne contient pas de caroténoïdes et, inversement, nous verrons que des aliments très riches en pigments ne fournissent pas toujours des excréments très pigmentés.

e) *Pigmentation des ovaires.*

La pigmentation des ovaires est plus facile à interpréter, les exceptions et les cas litigieux étant pratiquement inexistantes, surtout si l'animal dispose d'une réserve suffisante de caroténoïdes.

J'ai mentionné brièvement au paragraphe précédent les relations existant entre la pigmentation de l'hépto-pancréas et celle des ovaires. Il est très facile d'observer l'évolution du phénomène par l'étude comparée de ces organes dont le détail figure au tableau V (p. 128).

N. DEMEUSY (1958, p. 304) avait déjà indiqué les différentes teintes des gonades en fonction de leur maturité.

Dans des conditions normales, les femelles pondent des œufs toujours très colorés en rouge orangé. Après la ponte, les ovaires sont alors blancs, transparents, à oocytes invisibles. Un certain temps après la ponte, lorsque les œufs fixés aux pléopodes sont brunâtres, les ovaires sont toujours apigmentés, mais on commence à y distinguer les oocytes très petits. Cet aspect subsiste au cours des stades préparant et suivant immédiatement la mue. Ensuite, les oocytes grossissent et se colorent en jaune, puis en jaune orangé. Il y a donc transport de pigment et, effectivement, on constate que l'hémolymph est toujours colorée à ce stade. Au cours de leur maturation, les éléments sexuels sont successivement orange, puis orange vif et, en fin de vitellogenèse, l'ovaire bien développé présente de gros oocytes rouge-orangé. Parmi tous les cas observés, un seul paraît extraordinaire. Il s'agit d'une femelle pubère aux ovaires très développés, à oocytes gros mais blancs ; l'hémolymph est incolore mais l'hépto-pancréas est cependant légèrement jaune.

Les conditions de dosage quantitatif sont identiques à celles des tissus précédents. J'indiquerai donc seulement quelques données concernant le β carotène. Il est inexistant ou à l'état de traces dans les ovaires blancs, mais se trouve déjà en quantité non négligeable : 40,81 $\mu\text{g/g}$ dans des gonades pourtant peu développées, à oocytes petits et jaunes. Dans un ovaire à maturité et très orangé, il en existe beaucoup plus : 110,6 $\mu\text{g/g}$. Cela montre que le β carotène, entre autres pigments, s'accumule dans les gonades au cours de la vitellogenèse. Nous verrons plus loin (p. 91) ce qu'il faut penser de l'évolution de ces pigments au cours de l'ovogenèse.

Résumé. — Dans ces précédents paragraphes, j'ai tenté de décrire le plus fidèlement possible la pigmentation caractéristique des principaux tissus des Crabes témoins en fonction de leur sexe et des différentes étapes physiologiques. J'ai montré les difficultés rencontrées dans l'établissement de caractères constants applicables à tous les cas, en raison de nombreux facteurs individuels très variables.

L'analyse des tableaux IV, V, VI, VII (p. 127, 128, 129, 130) permet cependant de dégager un cadre approximatif où la plupart des spécimens observés trouvent leur place. On peut conclure que, pour des conditions identiques, la pigmentation des ovaires se présente toujours sous le même aspect pour le même degré de développement. Celle de l'hépto-pancréas est plus variable dans le détail, quoique assez bien établie dans l'ensemble. En revanche, la pigmentation de l'hémolymph, plus directement tributaire de facteurs individuels et de modifications du métabolisme, ne correspond pas toujours aux données généralement admises.

3. — *ANIMAUX EN RÉGIME TOTALEMENT CARENCÉ EN CAROTÉNOÏDES.*

Un lot de 45 animaux a été élevé sous ces conditions mais, seuls les résultats portant sur 18 femelles et 18 mâles ont pu être retenus. Ces chiffres sont suffisants puisque dans ces expériences ce sont généralement les réactions de chaque

Crabe pris individuellement qui sont étudiées. Les conclusions ne se dégagent pas ici de considérations statistiques comme c'est nécessairement le cas pour les témoins.

La nourriture était composée de chair de Seiche et de Poisson dont on avait pris soin d'éliminer les téguments et les viscères pigmentés. Des extractions préalables avaient d'ailleurs permis de vérifier l'absence totale de pigments caroténoïdes dans les aliments ainsi préparés. Les animaux se sont très bien accommodés de ce régime et ont vécu aussi longtemps que les témoins. Les modifications qualitatives et quantitatives dues à cette nourriture ne se sont pas manifestées immédiatement, l'état du sujet au départ de l'expérience étant la cause de ce retard plus ou moins accentué. Les observations enregistrées ont été en majeure partie groupées dans le tableau VIII (p. 131, 132).

a) Action sur les pigments des téguments.

Les résultats du traitement y sont particulièrement flagrants et faciles à constater, mais aussi plus longs à se manifester. Dans plusieurs cas, j'ai pu suivre chez un même individu la décoloration progressive de l'ensemble de l'animal au fur et à mesure des mues successives. Les animaux en expérience, très colorés au départ, sont devenus de plus en plus clairs — verts ou brunâtres — pour être finalement pratiquement apigmentés — blancs bleutés ou gris — à la quatrième mue.

L'étude quantitative de ce phénomène portant sur la totalité des pigments de l'exuvie illustre parfaitement les constatations visuelles.

Exemple de deux animaux ♂ et ♀ étudiés individuellement sur plusieurs mues :

	♀ (B 2 b)	♂ (B 5 b)
	µg/g	µg/g
— Quantité de pigment dans l'exuvie avant le début du régime	30,0	32,72
— — — — la 1 ^{re} exuvie après le début du régime	19,7	25,7
— Quantité de pigment dans la 2 ^e exuvie après le début du régime	4,16	5,3
— Quantité de pigment dans la 3 ^e exuvie après le début du régime	2,38	2,98
— Quantité de pigment dans la 4 ^e exuvie après le début du régime	traces	traces
— Quantité de pigment dans la carapace à la mort de l'animal	traces	traces

Le déficit en pigment de la 1^{re} exuvie rejetée après le début du régime — carapace pourtant non carencée au moment de sa formation — montre qu'il n'y avait plus d'excès de pigment dans l'hépatopancréas. Il n'y a pas eu fixation de caroténoïdes sur la carapace durant l'intermue comme ce fut le cas pour l'exuvie précédente de ces mêmes animaux, pour les Crabes qui n'ont pas mué (B 5 a, D 2 a, D 6 b) ou qui ont mué juste avant le début du régime (A 6 a, A 5 a) et chez qui la modification de couleur a révélé une utilisation des pigments en réserve dans l'hépatopancréas. ABELOOS et FISCHER (1927) avaient observé le même phénomène. C'est aussi le cas des témoins qui continuent à se pigmenter entre deux mues.

C'est à la deuxième mue après le début du traitement que la perte est la plus forte ; cette carapace s'est édifiée alors que l'hépatopancréas était définitivement et totalement privé de pigment. Les exuvies suivantes ne rejettent plus que les pigments restant dans l'hypoderme puisque les organes internes sont pratiquement apigmentés. On assiste donc à une véritable excrétion des caroténoïdes, excrétion qui sera extrêmement lente puisque réalisable seulement, et très partiellement, à chaque exuviation. Ainsi, l'observation de l'hypoderme à la loupe montre la

présence de chromatophores orange ou rouges, même après la 4^e mue. On peut en déduire que, contrairement à ce que pensaient VERNE (1921) et DAMBOVICEANU (1932), les pigments tégumentaires ne sont pas réutilisés pour d'autres organes puisque, même après 165 jours d'expérience, on les retrouve toujours et uniquement dans les cellules pigmentaires, à l'exclusion de toute autre partie de l'animal. Il faut remarquer que les chromatophores jaunes ou orange deviennent alors très rares et que leur nombre est en nette régression par rapport à celui des rouges. Je donnerai plus loin (p. 87) une explication de ce phénomène que je juge satisfaisante.

J'indique ici les moyennes des résultats obtenus en ce qui concerne les exuvies des 36 animaux déjà signalés. Tous n'ont pas mué 4 fois et toutes les analyses n'ont pu être systématiquement réalisées. Ces moyennes ne font que confirmer les observations précédentes. Elles s'établissent comme suit :

— Exuvie précédant le début du traitement ..	31,12	µg/g
— 1 ^{re} exuvie après le début du traitement ...	26,50	µg/g
— 2 ^e — — — — ...	4,00	µg/g
— 3 ^e — — — — ...	2,60	µg/g
— 4 ^e — — — — ...	traces de pigment	

L'excrétion du pigment par la carapace est donc pratiquement terminée à la 5^e mue. Si on considère que seules les ramifications des chromatophores sous-jacents fournissent les caroténoïdes à la couche pigmentaire de la carapace, il est normal de supposer qu'une faible quantité de pigments caroténoïdes subsistera très longtemps, sinon toujours, dans l'hypoderme ; c'est ce que démontre l'analyse de cette assise chez B 5 b et B 2 b.

Il faut encore remarquer que cette excrétion par la carapace doit être moins importante chez les femelles en vitellogenèse, le pigment de l'hépatopancréas étant transporté dans les gonades et très peu dans les téguments. C'est ce que l'on constate entre autres chez D 4 a, A 3 b et surtout A 2 a où le peu de pigment disponible dans l'hépatopancréas est retrouvé dans les ovaires. Dans ce cas, la pigmentation de la carapace ne s'intensifie pas durant le premier intermue.

Je signalerai aussi l'intérêt de certains sujets qui, au cours d'une mue, ont régénéré des membres manquants. C'est le cas de A 4 a et d'un autre animal non signalé au tableau VIII, qui ont mué au début du régime et régénéré une patte à la mue suivante, et de D 1 c qui en a régénéré deux à la 2^e mue. Tous ces appendices sont complètement blancs alors que la carapace des autres pattes est encore verdâtre à ce moment. L'observation de l'hypoderme montre des chromatophores noirs et d'autres blancs, mais aucun chromatophore rouge ni orange n'apparaît. Les animaux n'ont pu trouver dans l'organisme ni dans la nourriture les substances nécessaires à la pigmentation de ces chromatophores. C'est un argument supplémentaire qui démontre que les pigments de l'hypoderme ne peuvent être réutilisés et, surtout, que l'animal ne peut pas faire la synthèse des pigments caroténoïdes.

b) Action sur les pigments de l'hémolymph.

En ce qui concerne l'hémolymph, ces conditions d'élevage permettent de réaliser des observations intéressantes sur le mécanisme interne du métabolisme des caroténoïdes sans perturbation imputable au facteur nourriture. On peut ainsi affirmer pour la femelle D 2 b que la pigmentation, d'abord jaune puis orange de l'hémolymph, observée sur 8 prélèvements successifs, est due exclusivement au transport du pigment de l'hépatopancréas qui s'appauvrit en caroténoïdes — il est beige clair à la mort de l'animal — vers les ovaires qui sont eux-mêmes déjà très orangés. Le cas de A 3 b est théoriquement identique. La coloration jaune de

l'hémolymph et beige des oocytes s'explique par le peu de caroténoïdes disponibles dans l'animal qui avait mué au début du régime.

Les deux exemples suivants illustrent bien les réactions pigmentaires à la mue.

Chez A 2 a, l'hémolymph jaune 5 jours après l'exuviation témoigne d'une utilisation des pigments par l'organisme jusqu'à l'épuisement des réserves ; après quoi elle est toujours incolore. La mue n'avait donc pas provoqué la perte totale des pigments. Il n'en est pas de même pour D 1 a où, avant l'exuviation, malgré le régime carencé en pigment, l'hémolymph est orange-clair, puis orange, puis orange-rose ; l'animal, préparant les nouveaux téguments, prélève les caroténoïdes de l'hépto-pancréas. La quantité en est cependant insuffisante ; l'hémolymph devient alors incolore. Elle le restera, dans ce cas, après la mue et durant l'intermue jusqu'à la mort du Crabe dont l'hépto-pancréas, évidemment, mais aussi les ovaires totalement blancs, bien que développés, n'ont plus trouvé trace de caroténoïde dans l'organisme. Cette dernière constatation explique aussi l'absence constante de pigment dans l'hémolymph de D 4 d vraiment « purgé » en caroténoïdes internes après la mue.

c) Action sur les pigments de l'hépto-pancréas.

Nous avons déjà entrevu cette action au paragraphe précédent. On assiste à une décoloration constante pour aboutir de toute façon à un organe blanc après un certain nombre de jours. Cette décoloration est plus rapide quand il s'agit de femelles en vitellogenèse ou d'animaux se préparant à muer. Ainsi, le mâle D 3 a et la femelle impubère D 4 b avaient encore l'hépto-pancréas jaune au bout de 13 et 20 jours d'expérience, alors que celui des femelles en vitellogenèse D 2 b et D 4 a était déjà presque apigmenté après 14 et 22 jours. Si l'animal ne mue pas, il y a malgré tout élimination du pigment qui se fixe lentement sur la couche principale et sur les membranes articulaires.

Finalement, et dans tous les cas, au bout d'un temps plus ou moins long ou après une mue, l'hépto-pancréas est blanc tout en restant bien développé ; cela ne correspond donc pas à une dégénérescence de l'organe et les aliments avaient été bien absorbés, comme l'avaient déjà remarqué ABELOOS et FISCHER (1926, dans des cas identiques.

d) Action sur les pigments des ovaires.

Esquissée elle aussi au paragraphe b), elle est simple et évidente. Les ovaires en maturation prélèvent dans l'hépto-pancréas tout le pigment disponible jusqu'à épuisement complet. La pigmentation plus ou moins intense des oocytes est alors fonction de l'importance des réserves, c'est-à-dire, nous l'avons vu précédemment, de la proximité du début de l'expérience ou de la mue. C'est pourquoi j'ai observé des ovaires orange (D 2 b), jaunes (D 4 a) ou beiges (A 3 b, A 2 a) chez des femelles en vitellogenèse au début du régime. Cela explique aussi que j'aie obtenu, dans un cas (B 4 a), une ponte jaune-orange, donc légèrement déficitaire en caroténoïdes. Les autres pontes observées étaient blanches, à oocytes de taille normale (A 4 a, B 2 a). L'une d'elles (B 2 a), étudiée quantitativement, n'a montré, à l'analyse, aucune trace de pigment. De toute façon, après une mue, toutes les gonades observées étaient parfaitement blanches et à oocytes normaux. Les œufs pondus par la femelle A 4 a se sont développés jusqu'au stade morula avant de se désagréger. Etant donné la quantité importante de ces pigments présente dans les ovaires, on peut se demander si les caroténoïdes ne jouent pas un rôle dans la reproduction (GOODWIN

1952 a, p. 173 ; FISHER, KON, THOMPSON, 1956, p. 56) ; cette observation permet de dire qu'ils ne sont pas utiles à la fécondation ni au développement pour au moins les premiers stades.

e) Remarques.

La femelle A 3 b, absorbant des aliments apigmentés 5 jours après la mue, rejette des excréments rouges les deux jours suivants ; ils sont encore de couleur rouille 5 jours après la reprise de l'alimentation et ne deviennent blancs qu'après 17 jours de régime. De même, la femelle A 2 a rejette des excréments jaunes 5 jours après la mue, malgré la nourriture blanche ingérée. Ce n'est qu'après 17 jours que les excréments sont blancs.

Ces faits confirment l'hypothèse de FISCHER (1926) selon laquelle les aliments sont d'abord absorbés par les « coecums hépatiques » avant de passer dans l'organisme, les seuls pigments utilisables se trouvant en effet dans ces tissus. Dans le cas présent, les caroténoïdes subsistant dans l'hépto-pancréas ont été entraînés dans l'organisme avec les produits de la digestion.

Il est encore intéressant de noter que le rejet de pigments dans les excréments ne correspond pas obligatoirement à une saturation de ceux-ci dans l'animal. Ce phénomène correspond pour le Crabe à un rejet de substances inassimilables ou dégradées puisque, dans le cas précédent, les pigments disponibles transportés par l'hémolymphe jaune doivent se fixer tous dans les cellules sexuelles.

Je dois relever encore les quelques analyses quantitatives effectuées à sa mort sur l'animal entier. L'observation la plus importante qui en découle est la disparition totale du β carotène dans l'organisme alors que sa quantité moyenne est voisine de 5,5 $\mu\text{g/g}$ chez les témoins. Son absence signifie qu'il a été transformé en pigments tégumentaires ou, comme chez B 5 a par exemple, en pigments imprégnant la couche principale de la carapace si l'animal n'a pas mué. La petite quantité de β carotène trouvé dans l'analyse de D 6 a a pour origine le liquide digestif jaune kaki dont l'existence dans ces conditions est difficilement explicable. On se trouve peut-être en présence des dernières traces de caroténoïdes issus de l'hépto-pancréas. FISCHER (1927 a) avait remarqué aussi que le liquide digestif restait coloré, même après absorption de nourriture blanche. ABELOOS et FISCHER (1928) pensent que la sécrétion des « tubes hépatiques » est à l'origine du liquide stomacal.

L'interprétation des autres résultats permet seulement de constater la diminution constante de tous les pigments de l'organisme qui sont les seuls pigments tégumentaires. Le fait que leur quantité diminue très lentement après la première mue et qu'il en reste encore après la quatrième mue, confirme les observations mentionnées plus haut sur la subsistance de caroténoïdes dans les chromatophores de l'hypoderme.

4. - ANIMAUX CARENCÉS REPLACÉS EN ALIMENTATION NORMALE.

Parmi les 36 animaux retenus dans l'expérience précédente, 3 d'entre eux ont réabsorbé une nourriture riche en pigments après un certain temps de régime carencé.

Premier cas. — C'est une femelle impubère de couleur verte tachée de brun qui a mué 20 jours après le début de l'alimentation apigmentée. L'exuvie contenant 27,81 $\mu\text{g/g}$ de pigment est, à ce stade, semblable à toutes celles qui ont été recueillies après le début du traitement, la couche pigmentée s'étant formée dans des conditions normales. La nouvelle carapace est toutefois vert très clair. 26 jours après cette mue, l'animal est nourri de cadavres de Crabes à hépto-pancréas jaune et le

sera durant toute la fin de l'expérience. Le lendemain, il rejette déjà des excréments bruns et d'autre orange. Malheureusement, la destruction rapide de leurs pigments n'a pas permis d'en faire le dosage. Il est cependant intéressant de constater cette excrétion importante et rapide de caroténoïdes malgré leur carence totale dans l'organisme. Cela complète les observations mentionnées dans les remarques précédentes et confirme le rejet de pigments altérés ou non assimilables et l'imperméabilité du tube digestif à certaines substances.

Une deuxième mue se produit 46 jours après la précédente. L'exuvie est peu colorée et contient 5,6 $\mu\text{g/g}$ de caroténoïdes. Elle correspond à la carapace formée pendant le régime carencé et l'ingestion de pigments par le Crabe déjà déficitaire en pigments n'a pas modifié, en 20 jours, sa teneur en caroténoïdes. On remarque alors une teinte verte presque normale de l'animal, les nouveaux téguments s'étant formés à partir d'un hypoderme en grande partie repigmenté. Cela se vérifie 67 jours après à l'occasion d'une nouvelle mue. L'analyse révèle la présence de 14,2 $\mu\text{g/g}$ de caroténoïdes dans l'exuvie, l'animal étant alors bien vert. L'observation de l'hypoderme à la loupe montre de très nombreux chromatophores orange. Les pigments ont donc bien été réabsorbés par l'organisme. On démontre ainsi l'action exclusive de la nourriture sur les pigments tégumentaires du Crabe.

Deuxième cas. — Ce cas a permis de vérifier la fixation des pigments de l'alimentation dans l'hépto-pancréas déjà montrée par ABELOOS et FISCHER (1926). Un animal carencé pendant 7 mois a reçu en nourriture de l'hépto-pancréas concentré artificiellement en β carotène. Il a été sacrifié 5 jours après ce traitement. A la dissection, on constate que l'hépto-pancréas est jaune d'or dans sa partie médiane, mais encore blanc dans les parties latérales. L'analyse qualitative y met en évidence une grande quantité de β carotène non transformé. L'ingestion de ce pigment ne modifie donc pas sa nature et sa transformation n'est pas immédiate. Elle ne sera d'ailleurs jamais totale puisqu'on le retrouvera dans le sang et les ovaires. En outre, c'est une fois de plus la preuve que les pigments de l'hépto-pancréas sont d'origine uniquement alimentaire.

Troisième cas. — Après un régime carencé de 92 jours au cours desquels l'animal mâle a mué 3 fois, j'ai modifié les conditions d'élevage en donnant en nourriture des aliments riches en pigments. Le Crabe est alors resté 73 jours sans manger, n'absorbant aucun des aliments mis à sa disposition. Il est mort d'inanition ; la dissection a mis en évidence un hépto-pancréas très réduit et complètement blanc. Les enseignements que l'on peut tirer de cet exemple vérifient ce que l'on connaissait déjà. L'animal ne peut réutiliser les pigments tégumentaires se trouvant encore, même dans ce cas, dans les chromatophores de l'hypoderme ; il est d'autre part incapable de réaliser la synthèse de caroténoïdes à partir de la nourriture carencée ou pendant le jeûne au cours duquel il a cependant utilisé les réserves de l'hépto-pancréas.

5. — ANIMAUX EN RÉGIME TRÈS RICHE EN CAROTÉNOÏDES.

En comparaison avec les expériences précédentes, l'étude de l'action d'un régime continuellement très riche en pigments caroténoïdes a permis de vérifier les renseignements déjà obtenus. Cette manipulation, qui se voulait uniquement complémentaire des précédentes, a été réalisée et analysée de façon plus superficielle.

L'analyse qualitative des différents tissus n'a pas révélé l'existence de pigments caroténoïdes de nature différente de celle déjà reconnue chez les Crabes normaux témoins. La saturation en pigments n'induit donc pas la formation de caroténoïdes nouveaux dans l'organisme.

J'ai élevé 25 animaux — 8 mâles et 17 femelles — en les nourrissant exclusivement de tissus de Crabe très coloré : hépato-pancréas et ovaires orange, téguments très pigmentés.

a) Action sur les pigments des téguments.

Tous les animaux ayant vécu dans ces conditions au moins pendant une quarantaine de jours ont présenté une modification très nette de leur pigmentation. Avant la mue, 15 Crabes de l'élevage étaient devenus très rouge-orange sur tout le corps, cette couleur étant particulièrement visible sur le plastron ventral et sur les membranes articulaires. Parmi ceux-ci, 2 femelles en vitellogenèse avaient l'hémolymph et les ovaires eux-mêmes très orange ; il y avait donc assimilation d'une très grande quantité de pigment et, après sélection — les excréments étant aussi très colorés — distribution suffisamment importante aux différents organes.

8 individus ont mué une fois. Il fut ainsi aisé de constater la teinte très vert foncé des nouveaux téguments, teinte due à un accroissement de la quantité du

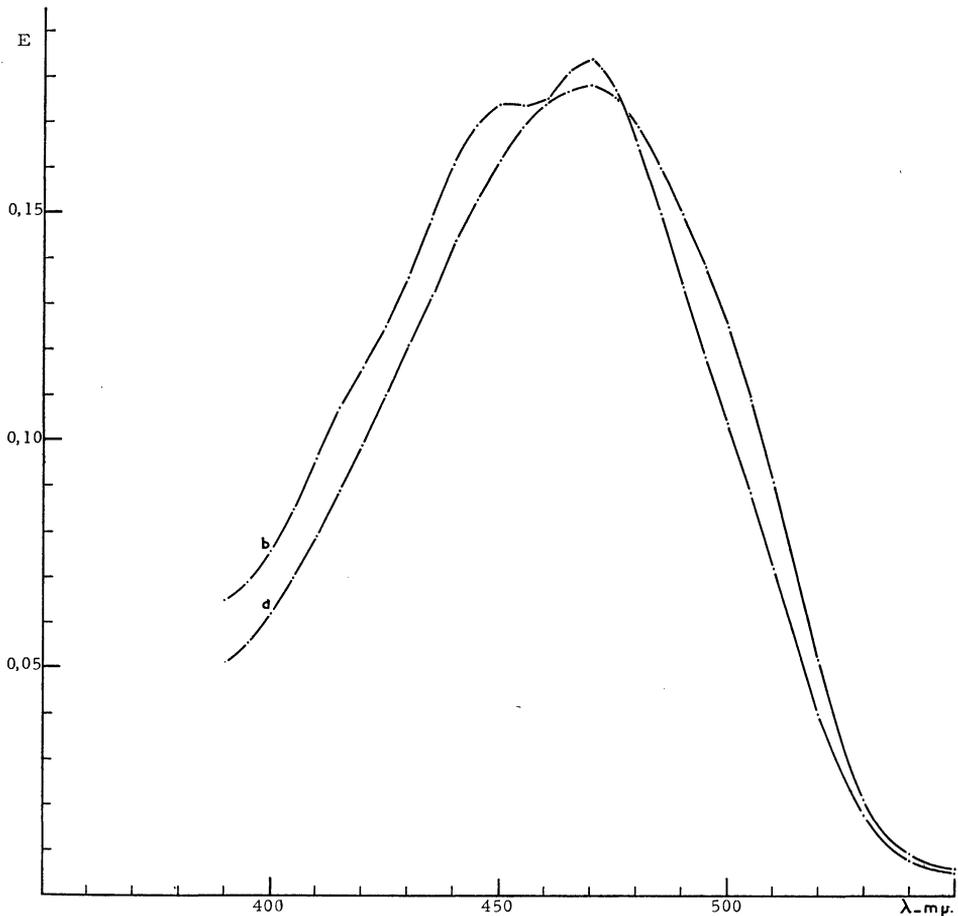


Fig. 19. — Action d'une nourriture riche en caroténoïdes sur les pigments tégumentaires :
 a = spectre d'absorption de l'extrait de la nouvelle carapace, en solution dans l'éther de pétrole ;
 b = spectre d'absorption de l'extrait de l'ancienne carapace, en solution dans l'éther de pétrole.

chromoprotéide. L'analyse de trois des nouvelles carapaces au stade A a montré, d'après la forme de la courbe et l'aspect du chromatogramme, la présence d'une quantité très élevée d'astaxanthine.

Pour l'une d'elles, j'ai trouvé 48,9 $\mu\text{g/g}$ de pigments totaux, et cela avant le dépôt de pigment sur la nouvelle carapace au cours de l'intermue, tandis qu'il n'y en avait que 32,9 $\mu\text{g/g}$ dans l'exuvie. La comparaison des courbes d'absorption est intéressante (fig. 19 a, b) : le spectre de l'extrait de la nouvelle carapace (a) montre l'importance accrue du maximum situé à 470 $\text{m}\mu$ par rapport à celui de l'exuvie correspondante (b) où le maximum à 450 $\text{m}\mu$ est encore bien visible. C'est donc bien l'astaxanthine qui est présente alors, en plus grande quantité. D'autres dosages montrent d'ailleurs que la xanthophylle n'a pas augmenté de façon aussi appréciable.

Deux autres Crabes ont mué deux fois mais je n'ai pu en faire l'analyse. Cependant, la seule observation visuelle révèle aussitôt après la deuxième mue la grande quantité de pigments présents dans les assises tégumentaires ; à ce stade en effet, la couleur générale des animaux était nettement plus rouille et la face ventrale était orange, ce qui n'est jamais le cas chez les témoins. L'étude des hypodermes à la loupe a montré la présence de très nombreux chromatophores rouges, le nombre des jaunes ne paraissant guère plus élevé. Pourtant, la chromatographie de fragments de cette assise tégumentaire a révélé l'existence d'une quantité de « carcinoxanthine » (?) bien plus grande que dans l'hypoderme des témoins.

Je citerai encore le cas d'une femelle qui a régénéré une patte entièrement rose après la mue intervenant 36 jours après le début du régime, le reste du corps étant vert-brunâtre assez intense.

b) Action sur les pigments de l'hémolymphe.

J'ai déjà signalé page 59 qu'il n'y avait pas toujours une répercussion immédiate et très marquée du régime sur la teneur de l'hémolymphe en pigments. Il faut en effet tenir compte de l'état physiologique et du sexe de l'animal. J'ai observé 9 hémolymphe de femelles au stade C_4 ; 4 d'entre elles étaient encore totalement incolores, les sujets étant en dehors de la période de vitellogenèse et rejetant des excréments bien colorés. Les 5 autres femelles présentaient des hémolymphe très colorés en orange, de même que 6 mâles observés au même stade.

L'intensité de ces colorations était nettement plus prononcée que celle des hémolymphe témoins les plus pigmentées. La proportion des hémolymphe fortement colorées est ici plus élevée que chez les Crabes nourris normalement. En D_4 , le milieu intérieur de 10 animaux étudiés (2 δ , 8 φ) était toujours pigmenté de jaune à orange, ce qui augmente aussi la proportion par rapport aux témoins (tableau IV, p. 127). Dans tous les cas, c'est la teinte orange qui est la plus fréquente, résultat de l'oxydation d'une plus grande quantité de pigments initiaux.

c) Action sur les pigments de l'hépto-pancréas.

C'est dans cet organe, lieu de l'accumulation initiale des caroténoïdes que les variations de pigmentation dues à ce régime sont le plus facilement identifiables.

Tous les 17 hépto-pancréas observés lors de la dissection des animaux morts au stade C_4 étaient colorés en jaune, jaune d'or ou jaune rose, ce qui est entièrement différent de ce que nous avons trouvé chez les témoins (tableaux IV et V, p. 127, 128). Parmi ces 17 individus se trouvaient 4 femelles en fin de vitellogenèse à oocytes très gros et très orange. Le tableau V nous avait appris que, dans ce cas, l'hépto-pancréas des témoins était déjà assez décoloré. Ce dernier point démon-

tre nettement l'accumulation excédentaire de pigment que le transport, pourtant très important aux ovaires, n'épuise toutefois pas complètement.

La mue semble avoir une action plus grande car à la réutilisation des pigments s'ajoute un jeûne relativement prolongé.

L'étude des quelques cas observés montre qu'on retrouve approximativement les caractères des Crabes témoins. Les trois animaux étudiés au stade A avaient l'hépto-pancréas encore jaune et il est logique de penser qu'ils étaient dans le même état aux stades D. Les cinq derniers Crabes de cette expérience, examinés au début du stade C présentaient un hépto-pancréas bistre ou jaune kaki, donc en grande partie décoloré. Dans ce cas, le phénomène de la mue redonne donc à l'hépto-pancréas un état voisin de celui des animaux témoins.

d) Action sur les pigments des ovaires.

Ces observations sont à comparer avec les données du tableau V (p. 128). Quand les ovaires ne sont pas du tout développés — début du stade C₄ par exemple — ils sont apigmentés. Mais, dès le début de la vitellogenèse, la pigmentation plus rapide à apparaître devient très vite importante et nettement plus accentuée que celle des gonades des témoins au même degré de maturation. C'est ainsi que j'ai pu observer dans six cas des ovaires peu développés, à oocytes encore petits mais visibles et déjà assez vivement colorés en orange.

Cette accumulation du pigment se poursuit pour aboutir en fin de vitellogenèse à des oocytes gros et intensément colorés. Les œufs pondus sont alors bien plus riches en caroténoïdes que dans le cas normal.

Une comparaison des quantités de pigment présent dans ces tissus avec celles des témoins n'est pas possible. En effet, on ne peut être certain, au départ, de la concordance parfaite entre l'état des gonades de l'animal en expérience et celui des gonades du témoin. Il faudrait disposer d'un grand nombre de sujets dans les deux lots, ce qui ne fut pas le cas ici.

e) Remarques.

L'aspect des excréments émis pendant ce régime ne révèle pas toujours une plus grande élimination des pigments par cette voie. Au contraire, dans quelques cas, les matières rejetées étaient très peu colorées, même pendant les périodes où l'organisme n'a pas à utiliser une quantité élevée de caroténoïdes : chez les mâles en C₄ par exemple. On peut supposer que la majeure partie des caroténoïdes est alors assimilable par les tissus de l'animal puisque nous venons de voir que ces derniers étaient effectivement plus colorés.

On peut aussi admettre que pendant les étapes de repos métabolique les pigments disponibles dans l'hépto-pancréas y sont en grande partie bloqués et ne sont pas encore remaniés à l'exception de ceux qui, insensiblement, se fixent sur la couche principale de la carapace et sur les membranes articulaires. C'est ce qui expliquerait qu'à certains stades les excréments soient au contraire très fortement colorés en rose-rouge, ce qui est le cas, entre autre, pour les femelles en vitellogenèse. Il y a alors utilisation et, vraisemblablement, transformation des caroténoïdes puisés dans les réserves de l'hépto-pancréas avec élimination de déchets non assimilés et de pigments excédentaires.

D'une analyse quantitative du β carotène total dans l'animal, il ressort que, contrairement à ce qu'on pourrait attendre du régime, il n'y a pas un accroissement très appréciable de la quantité de ce pigment par rapport aux témoins. La moyenne est en effet d'environ 5,9 $\mu\text{g/g}$ contre 5,5 $\mu\text{g/g}$ pour ces derniers. Ce phénomène s'explique par la grande facilité qu'a l'organisme du Crabe à transformer le β carotène en pigments caroténoïdes spécifiques.

6. — CAS PARTICULIER.

Pour des raisons d'approvisionnement, j'ai, dans certains cas, nourri quelques-uns de mes animaux avec des Moules. J'ai constaté alors qu'au bout d'une ou deux mues les Crabes ainsi alimentés ne conservaient pas leur pigmentation caractéristique, mais prenaient une teinte bleu-violet de plus en plus étendue et intense. Cette couleur apparaît d'abord sur les arêtes du céphalothorax et sur les pattes, puis se développe sur tout l'animal. Je n'ai pas étudié en détail les causes et les effets de ce phénomène. Néanmoins, j'ai effectué 6 dosages qualitatifs sur des carapaces ainsi pigmentées ; ils m'ont tous donné le même résultat.

La chromatographie sur Al_2O_3 M. I ne semble pas différente de celle d'une carapace normale de Crabe pris à la grève. On y décèle deux pigments caroténoïdes ; un jaune hypophasique dont la courbe d'absorption confirme bien la nature ; c'est la xanthophylle. L'autre pigment qui l'accompagne, lui aussi hypophasique, a

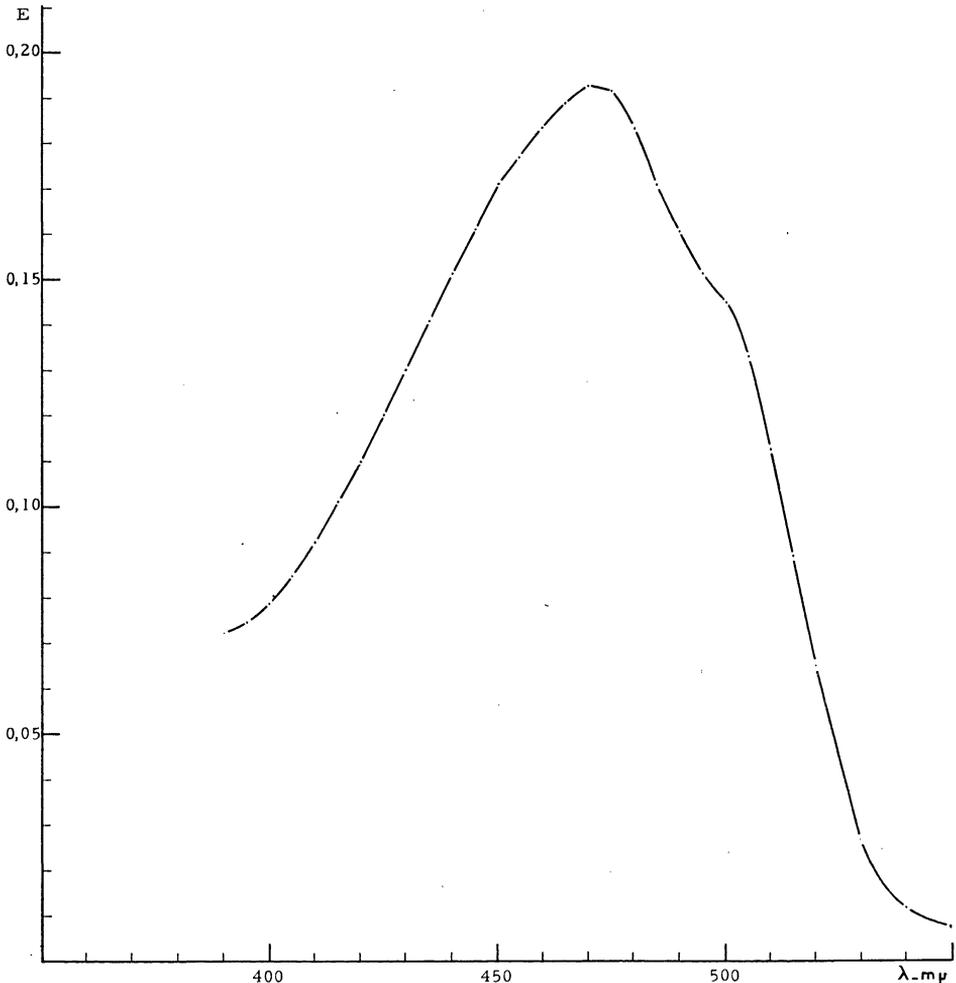


Fig. 20. — Spectre d'absorption de l'astaxanthine en solution dans l'éther de pétrole, extraite d'une carapace d'animal nourri avec des Moules.

les propriétés de l'astaxanthine et se transforme en astacine sous l'action du méthanol à 15 % KOH. Pourtant, son spectre d'absorption à maximum unique à 472 m μ dans l'éther de pétrole présente cependant une particularité : il montre un inflexion légère mais nette à 500 m μ (fig. 20). Je me contente d'enregistrer ce fait sans pouvoir l'interpréter.

Cela est peut-être dû à la nature des pigments présents dans *Mytilus edulis* composant la nourriture de ces Crabes. Pourtant, FISHER, KON, THOMPSON (1956), qui ont analysé les caroténoïdes de ce Mollusque, y signalent seulement l'existence du β carotène, de xanthophylles et vraisemblablement pas d'astaxanthine.

CONCLUSION

Avant d'établir des hypothèses sur le métabolisme des pigments dans l'organisme du Crabe, il était nécessaire et indispensable, comme l'ont fait tous les chercheurs s'intéressant aux caroténoïdes, de montrer l'origine de ces substances.

Les différentes expériences que je viens de mentionner montrent clairement que l'organisme de *Carcinus maenas* n'est pas capable de réaliser la synthèse des caroténoïdes à partir de corps chimiques différents. Une partie des pigments mis en évidence dans les tissus de l'animal a donc une origine exogène uniquement alimentaire. Cependant, chaque individu a la faculté de reprendre et de transformer les caroténoïdes ingérés en caroténoïdes spécifiques de l'animal qui sont donc d'origine endogène.

CHAPITRE II

INFLUENCE DE L'ABLATION DES PÉDONCULES OCULAIRES

Les travaux concernant les éléments neuro-sécréteurs se trouvant dans les pédoncules oculaires des Crustacés Décapodes sont très nombreux. Une description et une étude générale de la question ont été faites par BROWN (1948), puis par KNOWLES et CARLISLE (1956), qui ont résumé le sujet de façon intéressante et complète.

Rappelons donc seulement qu'il existe dans les pédoncules oculaires un complexe neuro-sécréteur : l'organe X et la glande du sinus. Cette dernière serait formée par le prolongement de fibres nerveuses ; elle apparaît comme un organe d'accumulation de substances hormonales élaborées par divers éléments dont l'organe X et transportées à la glande par les nerfs (BLISS et WELSH, 1952). Ajoutons qu'après ablation élective de la glande du sinus, on a mis en évidence la régénération d'une glande plus petite et anormalement située (PASSANO, 1953 ; BLISS, DURAND, WELSH, 1954).

Ces éléments ont une action plus ou moins prononcée sur de multiples fonctions de l'animal et toutes les modifications observées après leur ablation semblent liées à une intensification des processus biochimiques, c'est-à-dire à un accroissement du métabolisme général du sujet (DRACH, 1947). Il était alors indispensable de rechercher si l'action de ces tissus glandulaires s'étendait aussi aux pigments caroténoïdes de l'animal.

Cependant, cette étude ne concernera pas les modifications chromatiques de l'individu provoquées par le mouvement des chromatophores de l'hypoderme. Cette question, qui sortirait du cadre de ce travail, a été traitée par de nombreux chercheurs à propos de Crustacés divers, et en particulier par BROWN et par KNOWLES dont les travaux sont mentionnés dans les ouvrages cités au début de ce chapitre, par PANOUSE (1946) sur les chromatophores de la Crevette *Leander serratus*, par FLOREY (1952) qui recherchait la nature de l'hormone responsable de ces changements de couleur, par FINGERMAN et Coll. (1959) s'intéressant entre autres à la réponse des chromatophores rouges de la Crevette *Palaemonetes vulgaris*, à l'hormone de la glande du sinus, etc...

Les résultats que j'exposerai ici ont été obtenus par l'étude de 75 animaux, 36 mâles et 39 femelles, ayant subi l'ablation des pédoncules oculaires et maintenus dans mes élevages dans les mêmes conditions que les témoins.

1. — ACTION SUR LES PIGMENTS TÉGUMENTAIRES.

Indépendamment des mouvements des chromatophores qui provoquent un changement rapide de la couleur des animaux opérés, l'ablation des pédoncules

oculaires entraîne une modification lente et progressive de la pigmentation ayant pour origine une variation dans la biochimie des caroténoïdes.

R.-K. ABRAMOWITZ et A.-A. ABRAMOWITZ (1940) avaient déjà remarqué que le Crabe *Uca pugilator* opéré perdait sa coloration, et GUYSELMAN (1953), a propos du même animal, avait montré que l'ablation des pédoncules oculaires empêchait le changement de couleur qui précède normalement la mue.

Dès 1951, avec VEILLET nous avons signalé l'apparition d'une pigmentation d'abord rouge — plus ou moins marquée suivant le stade d'intermue auquel se fait l'opération (DEMEUSY, 1958) — puis mauve ou violette de plus en plus accentuée au fur et à mesure des mues successives.

Ces observations furent confirmées plus tard par KNOWLES et CARLISLE (1956).

Cet aspect particulier de la pigmentation est encore plus net pour les membres régénérés qui sont alors presque entièrement violets.

J'ai entrepris de déterminer les causes de ce phénomène.

a) Action sur les pigments de la carapace.

Puisque c'est la carapace elle-même qui présente les teintes indiquées, c'est dans la couche pigmentaire que doivent se trouver les facteurs de ces transformations. L'analyse de cette assise étant relativement facile, les résultats qualitatifs sont nets et précis. La chromatographie et l'étude du spectre d'absorption des solutions obtenues n'ont pas révélé la présence de pigment nouveau ou différent de ceux existant dans les carapaces normales. J'ai trouvé de la xanthophylle libre et de l'astaxanthine libre, et cela quelle que soit la proximité de la date de l'ablation des pédoncules oculaires. Ainsi, ce n'est donc pas une modification ni une altération de la nature des pigments qui est la cause de ces variations pigmentaires. Je pense qu'il faut plutôt admettre la formation de complexes chromoprotéïdes différents, non pas par le groupement prosthétiques qui reste toujours le même, mais par la nature de ses liaisons avec la protéine et, peut-être, par la protéine elle-même.

Les recherches quantitatives que j'ai entreprises dans ce cas ne m'ont pas fourni de résultats intéressants et devront être reprises par la suite. Je crois pourtant pouvoir signaler un accroissement assez important de la quantité d'astaxanthine par rapport à la xanthophylle. Cela est d'ailleurs facile à admettre puisque je montrerai avec certitude au prochain paragraphe que l'origine de cet accroissement se situe dans l'hypoderme.

L'augmentation de la proportion d'astaxanthine s'accroît encore au cours du cycle d'intermue par fixation de ce pigment sur la couche principale, comme je l'ai déjà fait ressortir pour les témoins. Cependant, elle est beaucoup plus rapide ici ; il fut facile de le constater par exemple chez un mâle nourri normalement dont l'assise tégumentaire était déjà intensément rose 20 jours après l'opération. La figure 21 a, b, illustre ce cas. La courbe a représente le spectre d'absorption dans l'éther de pétrole des caroténoïdes totaux d'un fragment du bouclier dorsal de la carapace prélevé au-dessus des cavités branchiales à l'aide d'une fraise de dentiste avant l'opération ; la courbe b est fournie par l'analyse de la solution extraite d'un morceau de carapace exactement symétrique du précédent recueilli dans les mêmes conditions 20 jours après l'ablation des pédoncules.

La comparaison de ces deux courbes révèle une différence dans l'importance du maximum situé à 470 m μ ; il est plus prononcé dans le spectre de b. On sait que c'est l'astaxanthine présent dans la solution qui provoque ce maximum. Ce caroténoïde est donc plus abondant dans la solution b dont la courbe ne présente

qu'un maximum, que dans la solution a où les maxima dus à la xanthophylle sont encore apparents. Ce dernier pigment n'est pourtant pas absent de la solution b, l'analyse l'a prouvé, mais il est totalement masqué par une plus grande quantité d'astaxanthine.

b) Action sur les pigments de l'hypoderme.

La pigmentation de la carapace étant en majeure partie le décalque des chromatophores sous-jacents, c'est à l'hypoderme que j'ai consacré la suite de cette étude. J'ai déjà publié une partie des résultats (LENEL, 1957) qui seront repris et développés ici.

Une simple observation de l'hypoderme chez un Crabe opéré de longue date montre une quantité d'innombrables minuscules taches rouges recouvrant la face externe de cette assise. Elles sont collées contre la couche membraneuse de la carapace qui apparaît alors elle-même très rouge à la dissection en raison des pigments

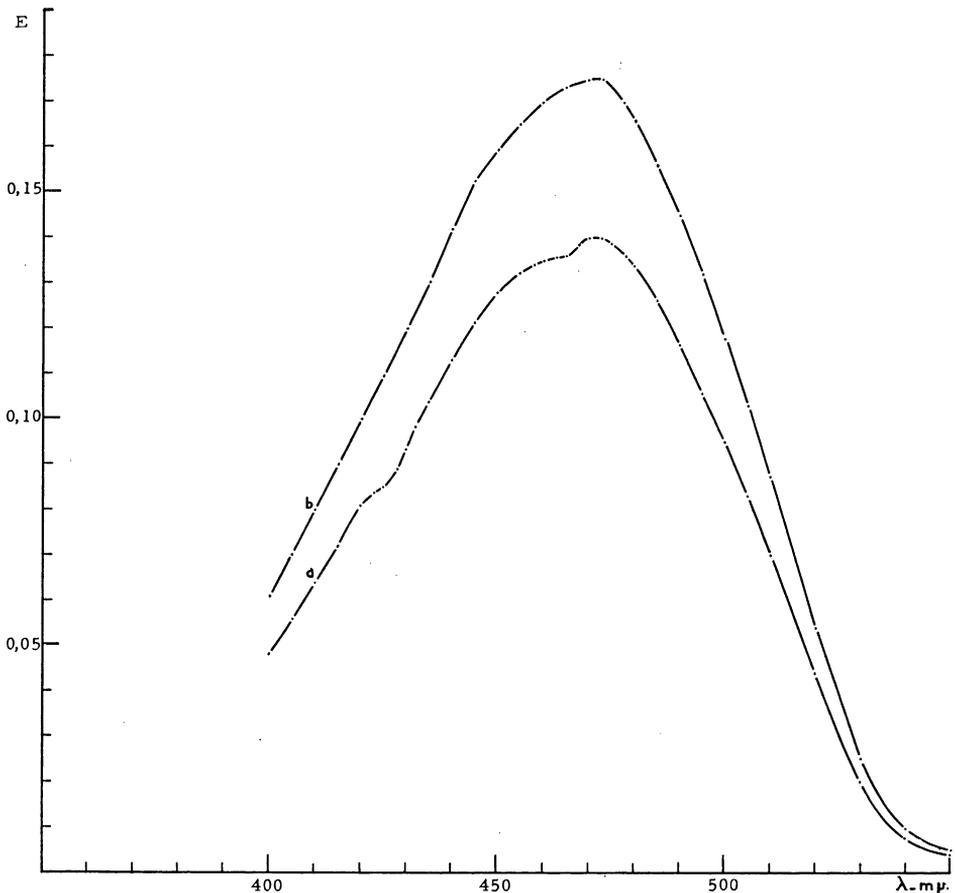


Fig. 21. — Action de l'ablation des pédoncules oculaires sur les pigments tégumentaires :
 a = spectre d'absorption d'un extrait de carapace, en solution dans l'éther de pétrole, avant l'ablation ;
 b = spectre d'absorption d'un extrait de la même carapace, en solution dans l'éther de pétrole, 20 jours après l'ablation.

qui y adhèrent. Ces taches sont autant de chromatophores rouges qui sont totalement rétractés sous l'effet de l'ablation des pédoncules oculaires, comme chez le Crabe *Uca pugilator* (BROWN, SANDEEN, WEBB, 1949) et dont le nombre s'est considérablement accru, comme cela peut se produire chez d'autres Crustacés en certaines occasions (CHASSARD, 1957). En outre, il semble que cet accroissement se fasse pour une part aux dépens des chromatophores jaune-orangé qui deviennent alors peu nombreux et dispersés. Les preuves biochimiques déjà exposées et qui seront reprises plus loin ne sont pas du tout incompatibles avec cette hypothèse.

Ces faits sont d'ailleurs confirmés de façon assez probante par l'analyse. Pour cela, j'ai prélevé sur les Crabes en expérience un large fragment d'hypoderme au-dessus de la cavité branchiale. Cette intervention, qui ne lèse aucun organe, n'empêche pas l'animal de survivre. L'ablation des pédoncules oculaires est ensuite effectuée, puis les animaux sont replacés dans les élevages pour un temps déterminé. De la sorte, il sera possible d'enregistrer sur le même animal les transformations éventuelles provoquées dans le tégument par l'absence des sécrétions de l'organe X et de la glande du sinus.

Les pigments du fragment prélevé sont extraits par la méthode habituelle. La recherche de la nature des pigments présents dans l'hypoderme nous avait mon-

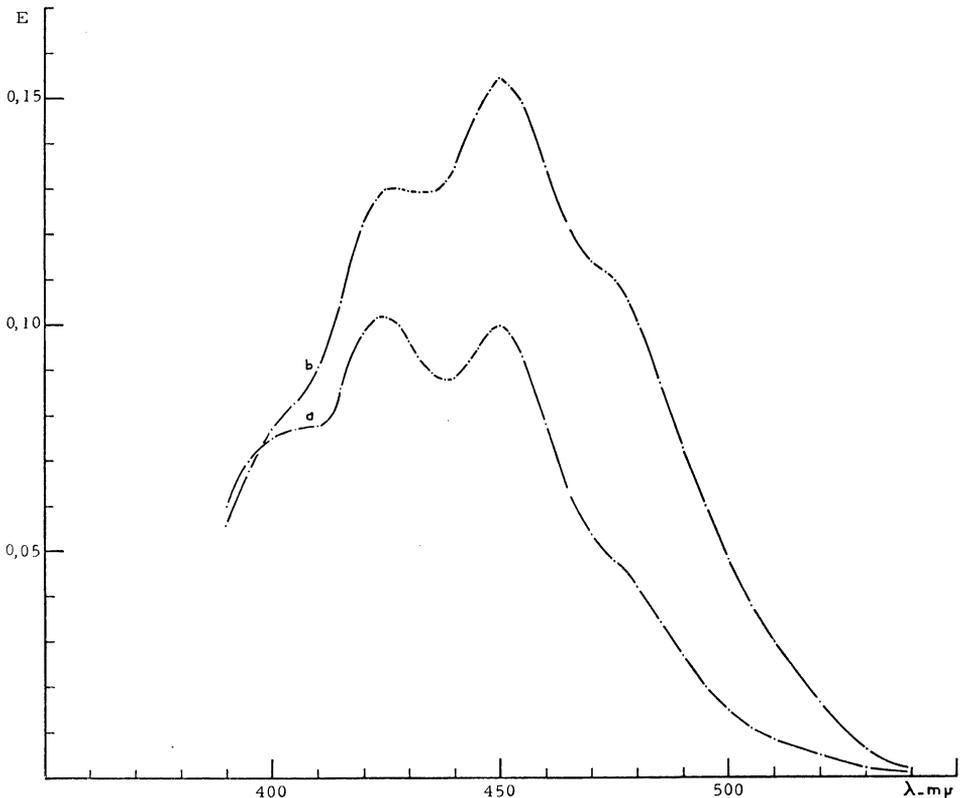


Fig. 22. — Action de l'ablation des pédoncules oculaires sur les pigments tégumentaires :
 a = spectre d'absorption d'un extrait d'hypoderme, en solution dans l'éther de pétrole, avant l'opération ;
 b = spectre d'absorption d'un extrait du même hypoderme, en solution dans l'éther de pétrole, 21 jours après l'opération.

tré, outre la difficulté de leur séparation, la diversité et la complexité des caroténoïdes qui s'y trouvent. Pour ces raisons, je n'ai pas tenté une analyse particulière à chacun, mais j'ai établi directement le spectre du mélange en solution ; sa forme caractéristique indique la proportion des pigments se trouvant dans l'hypoderme du Crabe considéré.

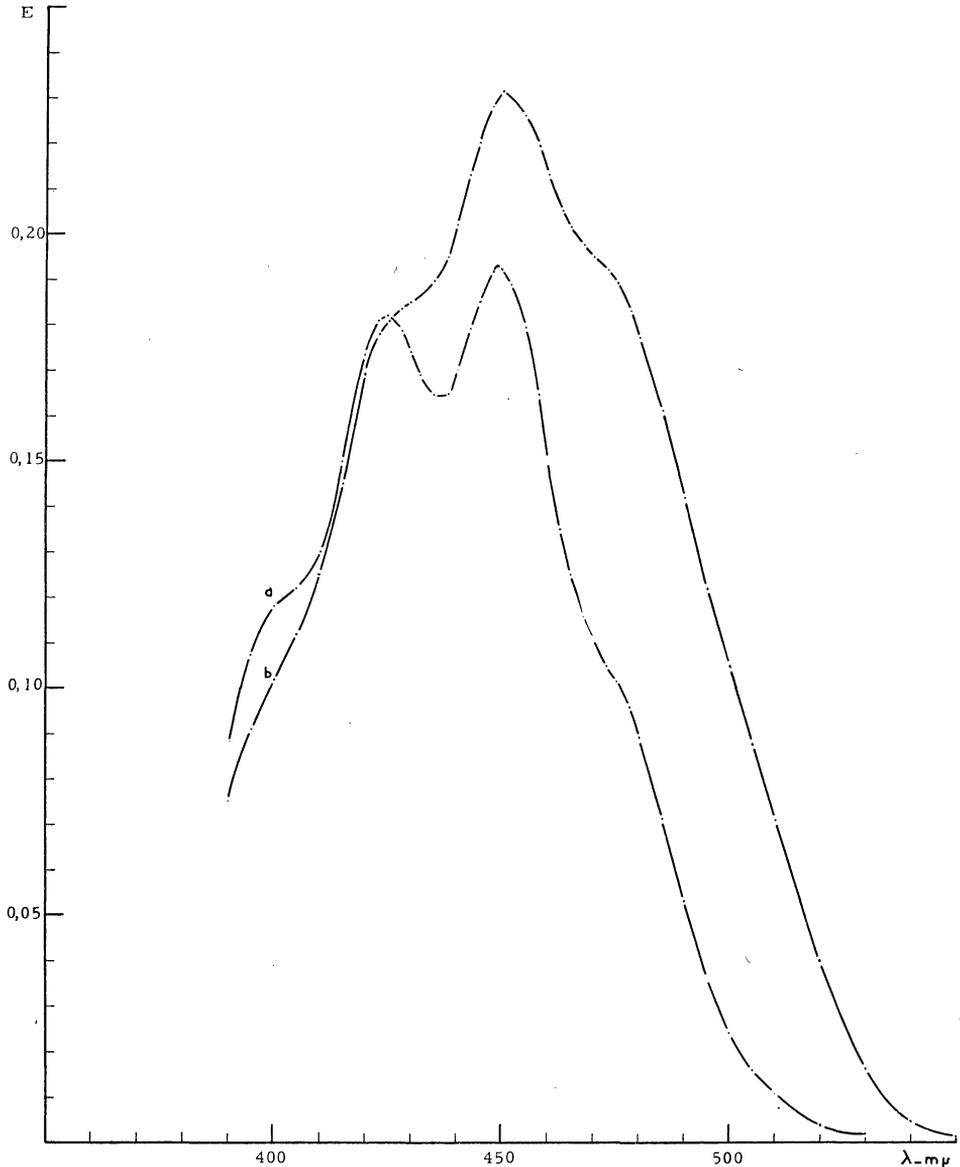


Fig. 23. — Action de l'ablation des pédoncules oculaires sur les pigments tégumentaires :
 a = spectre d'absorption d'un extrait d'hypoderme, en solution dans l'éther de pétrole, avant l'opération ;
 b = spectre d'absorption d'un extrait du même hypoderme, en solution dans l'éther de pétrole, 21 jours après l'opération.

Trois semaines plus tard, après un régime normal, les animaux ont une teinte générale beaucoup plus rouge, l'hypoderme étant couvert superficiellement de petits chromatophores rouge vermillon. On prélève à nouveau une autre partie de ce tissu symétrique de la précédente. L'étude des pigments se fait selon la même technique et dans les mêmes conditions que pour le premier fragment et l'on compare les courbes d'absorption obtenues de l'extrait d'hypoderme avant et après l'opération pour un même Crabe.

Les courbes de deux exemples particulièrement caractéristiques sont reproduites figure 22 a, b et figure 23 a, b. On constate entre elles, pour le même individu, une très grande différence quant à la forme ; on note en effet des variations très marquées dans l'importance des divers maxima.

Avant l'opération, la proportion des différents pigments en solution donne au spectre d'absorption du mélange deux maxima nettement définis à 425 et 450 μ dans l'éther de pétrole, avec une dépression bien accentuée entre eux. On y distingue en plus deux légères inflexions à 400 et 475 μ .

L'aspect du spectre de la solution obtenue après l'opération a des caractéristiques très différentes et bien particulières. Il n'y a plus qu'un seul maximum bien marqué à 450 μ qui semble couvrir en partie les autres maxima. La dépression qui existait à 437 μ est disparue, de même que le maximum situé à 425 μ ; à la place, il subsiste seulement un palier pour un cas et une simple inflexion pour l'autre cas. L'inflexion observée à 400 μ semble plus estompée ; par contre, celle qui se place à 475 μ paraît un peu plus accentuée. Or, nous avons vu précédemment que si tous les caroténoïdes susceptibles de se trouver dans l'hypoderme avaient une courbe d'absorption dont un des maxima était situé autour de 450 μ , seul l'ester d'isomère d'astaxanthine a un maximum unique qui se place dans cette région du spectre. C'est donc l'apparition d'une quantité plus importante de ce pigment rouge dans l'hypoderme qui provoque les modifications intervenant dans la forme du spectre d'absorption : élévation du maximum principal (450 μ) sans élévation correspondante des autres maxima. Pour ce même motif, le léger relèvement de l'inflexion à 475 μ démontre lui aussi un accroissement de la quantité d'astaxanthine par une formation plus importante de produits d'oxydation spontanée, tels que l'astacine. Enfin, la chromatographie des solutions sur CO_3Ca ou sur Al_2O_3 témoigne encore de ce fait car la zone rouge-orangée correspondant sur les colonnes à la position de ce pigment caroténoïde est bien plus longue et plus concentrée pour les extraits d'hypoderme d'animaux opérés.

Ainsi, on retrouve plusieurs preuves analytiques de l'augmentation du nombre des chromatophores rouges comme conséquence à l'ablation des pédoncules oculaires. Une autre démonstration en est aussi fournie page 79 à propos de l'action de l'opération sur les pigments de l'hépatopancréas : l'analyse fait ressortir une augmentation de la concentration de la partie épiphysique, donc de la quantité des caroténoïdes hypodermiques.

Tout cela met bien en évidence une action hormonale sur l'évolution des pigments caroténoïdes des téguments. D'ailleurs, l'influence d'hormones variées sur les caroténoïdes tégumentaires a été également démontrée chez d'autres Invertébrés. GOLDMAN et WELLS (1954) constatent qu'un extrait de cortico-surrénale de Vertébré produit un rougissement de la carapace de l'Écrevisse *Orconectes virilis* par destruction d'un pigment noir qui laisse apparaître les chromatophores rouges. Cependant, en injectant de l'A.C.T.H. ou d'autres hormones à *Carcinus maenas*, FRENTZ (1960) ne constate aucune réaction de ce genre. En 1959, OHNISHI met en lumière l'existence, dans les ganglions prothoraciques, d'un mécanisme endocrinien déjà signalé par HIDAKA (1956) déterminant la nature des pigments

caroténoïdes et, par conséquent, la couleur verte ou brune de la cuticule des pupes de Papillons *Papilio xuthus* et *Papilio protenor*.

2. — ACTION SUR LES PIGMENTS INTERNES.

a) Action sur les pigments de l'hémolymph.

Je n'ai malheureusement pas eu l'occasion d'examiner en détail un grand nombre d'individus pour étudier cette action. Cette question sera à reprendre par la suite, mais je vais exposer ici les quelques données entrevues susceptibles de constituer plus tard un résultat positif quand elles seront un peu plus étayées.

Des prises de « sang » ont été effectuées sur 13 femelles pubères au stade C₄, au minimum 15 jours après l'opération. Pour toutes sans exception, le milieu intérieur était coloré en jaune-orangé ou en orange assez prononcé. Malgré le petit nombre d'animaux observés, cette proportion est tout de même étonnante si on se réfère au cas des femelles normales. L'explication est facile à concevoir si on admet que toutes ces femelles sont en vitellogenèse accélérée et presque continue. On sait en effet que chez de nombreux Crustacés l'ablation des pédoncules oculaires provoque une accélération de la croissance ovarienne (PANOUSE, 1946 ; BROWN et JONES, 1947, 1949 ; DEMEUSY, 1948) et même, chez *Carcinus maenas*, des pontes successives et rapprochées sans mue intermédiaire (DEMEUSY et LENEL, 1954). Dans la mesure où le Crabe dispose de réserves de pigments suffisantes ou d'une alimentation assez riche en caroténoïdes, il est normal de trouver les pigments véhiculés par l'hémolymph vers les ovaires en même temps que les éléments nécessaires à l'édification des produits génitaux.

Sur 11 hémolymphes de Crabes ♂ opérés que j'ai pu observer au stade C₄, 9 étaient nettement colorées, les 2 autres étant incolores. Le tableau VI (p. 129) nous avait appris qu'au même stade les proportions des hémolymphes colorées et incolores des Crabes normaux étaient à peu près égales.

Certes, les conclusions qui peuvent ressortir de ces faibles chiffres sont peu évidentes et bien fragiles. Néanmoins, elles infirment celles de SCHEER (1959) qui, en comparant la quantité de lipochrome dosé dans le sang de 6 Crabes ♂ opérés et de 6 Crabes normaux, au stade C₄, pense pouvoir dire que l'ablation des pédoncules oculaires n'a pas d'effet sur l'utilisation des lipochromes. Et puisque dans ce chapitre je démontre l'influence de sécrétions hormonales sur le métabolisme pigmentaire de différents tissus, je crois, pour ma part, qu'on doit en trouver une manifestation dans les caroténoïdes du milieu intérieur qui est un intermédiaire entre ces tissus.

b) Action sur les pigments de l'hépto-pancréas.

C'est sur les pigments de l'hépto-pancréas que j'ai eu l'occasion d'étudier le plus en détail l'action des éléments neuro-sécréteurs. L'essentiel de ce travail a d'ailleurs été déjà publié (LENEL, 1958) ; j'en reprends l'exposé en le rectifiant et en le complétant.

Au cours de mes recherches sur la nature des caroténoïdes, la chromatographie des extraits d'hépto-pancréas m'avait montré que la solution jaune qui traversait la colonne d'Al₂O₃ P.L. 5 % sans être adsorbée était toujours moins colorée dans le cas des Crabes opérés que dans le cas des Crabes normaux. J'ai alors précisé cette constatation en refaisant les expériences en détail, en particulier pour en tirer des résultats quantitatifs.

L'observation de la teinte de l'hépto-pancréas, après dissection de 56 animaux (33 ♀ et 23 ♂) en C₄ parmi les opérés de plus de 20 jours, a révélé un affaiblissement notable de la pigmentation par rapport aux témoins. Jamais l'hépto-

pancréas n'a été trouvé de couleur jaune d'or ou jaune orange. C'est la teinte jaune pâle ou brunâtre qui était la plus courante ; quelquefois même l'organe était à peine coloré ou blanc et, cela, quel que soit le sexe ou le degré de maturation des ovaires pour les femelles. D'ailleurs, 11 de ces dernières avaient déjà l'hépatopancréas blanc avant la fin de la vitellogénèse. Un regard sur le tableau V (p. 128) nous montrera quelle différence il y a ainsi avec les femelles témoins. En outre, on sait que chez les femelles normales, à ce stade de mue, seules celles qui viennent de pondre ont l'hépatopancréas décoloré (ABELOOS et FISCHER, 1926).

Pendant plusieurs jours j'ai nourri avec un excès de pigments (hépatopancréas de Crabes frais) 6 animaux ♂ de même taille et au même stade d'intermue. J'ai ensuite pratiqué l'ablation des pédoncules oculaires sur 3 d'entre eux, les 3 autres étant gardés indemnes pour servir de témoins. A partir de ce moment et pendant 30 jours, je les ai tous alimentés avec de la chair de Seiche exempte de pigment. Au bout de ce temps, tous les sujets étant sacrifiés, on constate que les 3 opérés ont leur hépatopancréas blanc, sans pigment caroténoïde, celui des témoins étant encore jaune paille malgré la longue durée du régime carencé. L'analyse quantitative m'a permis de doser 13,1 μg de pigments totaux dont 8,2 μg de β carotène par gramme d'organe chez les témoins. Cela prouve que le pigment diminue et disparaît plus rapidement de l'hépatopancréas des opérés, même après sa fixation dans l'organe. Nous voyons ci-dessous que cela se fait, entre autres, au profit de l'hypoderme.

Tout ceci est encore une manifestation de l'augmentation du métabolisme général de l'animal après extirpation de l'organe X et de la glande du sinus.

Je me suis servi de ces individus pour faire un dosage quantitatif total. Malheureusement, les longues manipulations nécessaires pour ces analyses ne m'ont permis de le faire que pour un opéré et son témoin. Il en résulte, comme on pouvait le prévoir d'après les considérations précédentes, que la quantité totale de pigment est bien plus élevée chez l'opéré : 70 $\mu\text{g}/\text{g}$ pour 23,3 $\mu\text{g}/\text{g}$ chez le témoin dont les pédoncules oculaires avaient été enlevés juste avant l'extraction. C'est surtout la fraction épiphase avant la saponification qui est en net accroissement dans l'organisme de l'opéré : 37,5 $\mu\text{g}/\text{g}$ contre 7,6 $\mu\text{g}/\text{g}$ pour le témoin. Puisque l'hépatopancréas est blanc et que l'animal n'a pas mué, cela démontre une fois de plus, dans ce cas, qu'il y a augmentation de la quantité de pigment dans l'hypoderme.

Enfin, il restait à démontrer quantitativement l'appauvrissement de l'hépatopancréas en certains caroténoïdes.

Le β carotène est le pigment le plus abondant dans l'organe d'un Crabe normal ; c'est celui dont l'extraction facile sans trop de manipulations permet un dosage précis et vraiment significatif. En outre, par la constitution de sa molécule, on peut penser qu'il représente un des éléments initiaux dans le processus de transformation des pigments et qu'il sera donc le premier à manifester les réactions consécutives à l'ablation des pédoncules oculaires. Pour toutes ces raisons, c'est à ce caroténoïde que j'ai consacré cette étude quantitative. Elle a été réalisée uniquement sur des mâles, pour ne pas avoir à tenir compte, chez les femelles, du besoin des gonades en pigment, variable selon leur développement aussi bien chez les adultes que chez les impubères opérées.

Les hépatopancréas de 14 Crabes opérés et de 12 témoins ont été étudiés séparément. RENAUD (1949) a bien exposé les précautions à prendre pour éviter des erreurs dans la détermination du poids d'organe frais prélevé. Il faut bien rincer le tissu dont la disposition en « tubes ramifiés » retient une assez grande quantité de liquide cavitairé, puis le sécher sur du papier filtre avant de le peser. Il est important de réaliser les prélèvements toujours de la même façon pour que les résultats soient comparables. Ensuite, les extractions se font suivant la méthode

habituelle à l'acétone et à l'éther de pétrole. La solution est alors saponifiée, puis le β carotène facilement séparé par chromatographie sur colonne d' Al_2O_3 P.L. 5 %. Le pigment est remis en solution dans une quantité standard d'éther de pétrole et la concentration étudiée au spectrophotomètre à 450 m μ . Dans quelques cas, tous les autres pigments restant sur la colonne sont élués ensemble par le méthanol 5 % potassique puis repris par l'éther de pétrole et dosés aussi quantitativement.

Les résultats reportés au tableau IX (p. 133) sont assez éloquents en ce qui concerne le β carotène. Les quantités de ce pigment dans les hépto-pancréas des 12 témoins, bien que très variables entre elles, sont toujours très supérieures à celles des 14 hépto-pancréas des opérés. La concentration la plus faible pour les animaux normaux, celle de d_5 , est de 29,10 $\mu\text{g/g}$ alors que la concentration la plus élevée pour les opérés, celle de C_3 , est seulement de 19 $\mu\text{g/g}$.

Je n'ai pas jugé opportun de comparer individuellement témoins et opérés. Il aurait fallu en effet constater sans erreur la similitude complète des hépto-pancréas de l'un et de l'autre au début de l'expérience ; or, cela n'est pas possible. En outre, les réactions individuelles imprévisibles de chaque organisme au cours du traitement auraient empêché tout rapprochement et toute comparaison. Je me suis donc contenté de grouper les données obtenues et de les comparer d'une colonne à l'autre. La conclusion n'en est pas moins très évidente ; il y a une très forte diminution de la teneur en β carotène dans l'hépto-pancréas après l'ablation des pédoncules oculaires.

Si on fait les moyennes des chiffres obtenus, celles-ci ne peuvent avoir de valeur très significative, les écarts étant trop grands dans une même catégorie. Par leur grande différence entre elles, 48,62 $\mu\text{g/g}$ chez les animaux normaux et 8,32 $\mu\text{g/g}$ chez les opérés, elles peuvent cependant illustrer schématiquement le résultat de l'effet de l'opération sur le métabolisme du β carotène.

Il ne faut pas imputer cet appauvrissement à une alimentation moins abondante car les auteurs s'accordent pour constater que les opérés mangent en général plus que les témoins. Je suggère plutôt une explication tenant compte des modifications d'autres fonctions et en liaison avec elles.

D'une part, de nombreux auteurs ont signalé une augmentation de la consommation d'oxygène chez les Crustacés qui ont subi l'ablation des pédoncules oculaires. Ce sont en particulier SCUDAMORE (1947) chez l'Ecrevisse *Cambarus*, BAUCHAU (1948) chez le Crabe *Eriocheir sinensis*, EDWARDS (1950) chez le Crabe *Uca sp.*, FROST, SALOUM et KLEINHOLZ (1951) chez l'Ecrevisse *Astacus sp.*, BLISS (1953) chez le Crabe *Gecarcinus sp.* Enfin, tout récemment (1959) ALTMANN montre, chez *Carcinus maenas*, que la quantité d' O_2 consommée est plus élevée après ablation de ces organes et que, inversement, des injections d'extraits de pédoncule diminuent le besoin d' O_2 .

D'autre part, nous savons que la molécule de caroténoïde est très sensible aux réactions d'oxydation. En rapprochant ces deux faits, on peut déduire que l'ablation des pédoncules oculaires provoque une oxydation plus rapide du β carotène de l'hépto-pancréas pour former des pigments caroténoïdes plus oxydés, donc plus rouges, tels que l'astaxanthine.

L'examen du tableau IX (p. 133) révèle que ces caroténoïdes ainsi formés ne sont pas retrouvés dans l'hépto-pancréas puisque la quantité des pigments autres que le β carotène est, elle aussi, en légère régression. Nous avons vu plus haut que cet accroissement de la quantité d'astaxanthine se manifeste entre autres dans l'hypoderme très coloré des animaux avant de se répercuter dans la carapace.

Je me réserve de rechercher plus tard si cette action très marquée sur le métabolisme du β carotène existe de façon aussi importante sur celui des autres pigments. D'après les données inscrites au tableau IX (p. 133) il semble qu'elle

soit bien plus faible, mais les résultats sont trop peu nombreux pour pouvoir l'affirmer.

c) Action sur les pigments des ovaires.

La dissection des 33 femelles réalisée pour l'étude précédente sur les hépatopancréas m'a fourni l'occasion de me rendre compte de l'état des gonades dans ces conditions. J'ai éliminé 4 femelles opérées depuis moins de 15 jours, temps qui, à mon avis, serait peut-être insuffisant pour que l'effet de l'opération se manifeste. Chez 4 autres, les gonades peu développées à oocytes non visibles étaient incolores. De l'observation des 25 spécimens restants, il semble qu'on puisse admettre une augmentation de la pigmentation des ovaires, donc une élévation de la concentration de certains caroténoïdes. C'est surtout dans les stades de maturité peu avancée ou chez les femelles prépubères que le phénomène est le plus sensible. Ainsi, 8 femelles possédaient des ovaires à oocytes petits mais déjà nettement pigmentés en rose ou orange. DEMEUSY (1958, p. 391) signale, elle aussi, la teinte rouge de certains ovaires d'animaux prépubères opérés. Les témoins, à ce stade, ont des gonades seulement jaunâtres (tableau V, p. 128). Quant aux oocytes très développés, ils sont toujours très orange-rouge mais la différence avec les normaux, eux aussi très colorés, ne s'exprime pas de façon aussi évidente. On peut cependant tirer parti du fait que certains opérés ont pondu plusieurs fois de suite pour constater une modification de la teinte des pontes successives.

Chez 3 femelles, la première ponte était très orangée mais la ponte suivante, environ un mois et demi après (DEMEUSY, LENEL, 1954) paraissait alors bien plus rouge. A la mort qui survient entre 30 et 40 jours après cette deuxième ponte, les ovaires, assez bien développés, étaient déjà pigmentés en rouge orangé.

Il semble donc, comme c'est le cas pour l'hypoderme et, dans une certaine mesure, pour l'hépatopancréas, que la modification de la pigmentation résulte de la diminution de la quantité des caroténoïdes jaunes faisant place à des pigments plus rouges. Un dosage réalisé sur un de ces ovaires à oocytes encore petits mais orange a confirmé ce point de vue. Il y avait 27 $\mu\text{g/g}$ de pigments caroténoïdes totaux dont 8,5 $\mu\text{g/g}$ seulement de β carotène ; il y a donc 18,5 $\mu\text{g/g}$ d'autres pigments, soit plus du double. Chez les témoins, quelle que soit la maturité de la gonade, il y a toujours beaucoup plus de β carotène que de pigments oxydés : 110,6 $\mu\text{g/g}$ de β carotène dans un ovaire près de la ponte, 40,8 $\mu\text{g/g}$ dans un ovaire moyennement développé pour 81,8 $\mu\text{g/g}$ et 17,6 $\mu\text{g/g}$ de pigments oxydés.

L'étude des propriétés d'adsorption témoigne aussi de ce phénomène. Si la chromatographie de 4 extraits d'ovaires d'opérées ne révèle pas de différences dans la nature des pigments par rapport aux témoins, elle montre bien des différences dans l'importance des bandes et dans la concentration des solutions recueillies. Celle qui traverse la colonne d' Al_2O_3 , P.L. 5 % sans être retenue est très diluée : c'est le β carotène ; les zones orange-rouge adsorbées sont, par contre, bien nettes, larges et très colorées.

3. — REMARQUE.

Parmi ce lot de Crabes en expérience, 9 individus avaient subi l'ablation élective bilatérale de la glande du sinus. Cette opération, qui conserve les facultés visuelles de l'animal, a été décrite par BROWN (1942) puis reprise et détaillée par KLEINHOLZ (1947). Les nombreux auteurs qui ont pratiqué cette intervention ont remarqué une différence dans les effets produits sur diverses fonctions par rapport à l'ablation des pédoncules. Ceci est normal puisque les substances hormonales responsables ne sont pas sécrétées par la glande du sinus elle-même.

Pourtant, sur les 9 Crabes en expérience, j'ai observé une action bien nette

sur le métabolisme pigmentaire des téguments, de l'hémolymphe et de l'hépatopancréas, en partie comparable à l'action de l'opération totale. KNOWLES, dans l'ouvrage qu'il publie avec CARLISLE (1956) fait la même remarque. En fait, l'élimination de la glande entraîne une diminution au moins temporaire de la quantité des produits sécrétés et le résultat de cet appauvrissement se fait rapidement sentir. En outre, il n'est pas certain que la glande du sinus ne soit qu'un organe de stockage ; elle pourrait aussi être le siège de transformation d'hormones produites par l'organe X, ou bien encore elle pourrait sécréter elle-même des substances hormonales (GABE, 1954).

CONCLUSION

L'exposé de ce chapitre a mis en évidence le rôle joué par les éléments neuro-sécréteurs des pédoncules oculaires du Crabe sur le métabolisme des pigments caroténoïdes dans les différents tissus de l'animal.

L'ablation des pédoncules, ou même des seules glandes du sinus, accentue les réactions d'oxydation de ces pigments. Il en résulte la formation de caroténoïdes plus orange ou plus rouges aux dépens de pigments plus jaunes comme le β carotène. J'ai en effet montré que ce dernier était en quantité très faible dans l'organisme des opérés alors que l'astaxanthine, en particulier, était plus abondante. En plus des modifications dans l'aspect des chromatophores, ce phénomène explique pourquoi les animaux changent alors progressivement de couleur et deviennent d'abord plus rouges puis mauves ou violets après les mues. Dans ce cas, on peut envisager la formation, dans la carapace, de chromoprotéides nouveaux par les liaisons pigment-protéine ou par la protéine elle-même.

Ces résultats sont à ajouter aux multiples travaux qui ont montré l'influence des tissus à sécrétion hormonale sur de nombreuses fonctions de l'organisme des Crustacés.

CHAPITRE III

SUR LES TRANSFORMATIONS ET LE RÔLE
DES PIGMENTS CAROTÉNOÏDES DANS L'ORGANISME DU CRABE

Dans les chapitres précédents, j'ai eu souvent l'occasion de mettre au point quelques aspects du métabolisme des caroténoïdes dans l'animal. J'ai montré les modifications de leur concentration et de leur nature sous l'influence de facteurs divers, contrôlés naturellement par le sujet ou provoqués artificiellement par l'expérimentateur.

Une synthèse des observations réalisées grâce aux expériences déjà relatées et les conclusions ainsi obtenues permettent de broser un tableau théorique et approximatif des réactions des pigments dans l'organisme en fonction des stades physiologiques de l'animal, depuis leur absorption jusqu'à leur excrétion sous différentes formes.

La présence constante de ces substances quelquefois très abondantes soulève la question encore très discutée de leur rôle et de leur fonction. Je l'aborderai à mon tour sans pouvoir y répondre de façon absolue et définitive.

1. — *ABSORPTION ET EXCRÉTION DES PIGMENTS.*

Du fait de sa nourriture variée et abondante, le Crabe absorbe de nombreux caroténoïdes de nature et de concentration très différentes, les plus largement répandus étant le β carotène et la xanthophylle.

On est en droit de supposer que le tube digestif de l'animal possède la propriété de filtrer et de sélectionner ces pigments de l'alimentation. En effet, après un long régime carencé en caroténoïdes, à l'administration de nourriture pigmentée, correspond souvent une coloration des excréments. Les tissus du Crabe étant à ce moment déficitaires en pigments, on pouvait penser que tous les caroténoïdes seraient immédiatement utilisés ; or, certains sont immédiatement excrétés. Il est vraisemblable que leur nature, dégradée peut-être par les enzymes digestives, n'a pas permis leur assimilation par l'organisme. On peut aussi considérer que les pigments n'ont pas séjourné assez longtemps dans le tube digestif pour que celui-ci ait le temps de les absorber tous ; le fait que du β carotène existe dans ces excréments milite en faveur de cette hypothèse. Les matières rejetées étant, d'autre fois, totalement privées de pigments caroténoïdes, il faut admettre la possibilité de l'intervention des deux phénomènes auxquels s'ajoute, dans une certaine mesure, la faculté qu'a l'hépatopancréas d'excréter ou d'absorber certaines substances selon qu'elles

sont ou non en excès. C'est pourquoi, au stade C₃, par exemple, alors que l'alimentation est très importante, l'hépto-pancréas décoloré ne se repigmente pas encore. Toutes les substances ingérées sont immédiatement utilisées sans être fixées dans les cellules « hépatiques », ce qui n'empêche pas, par ailleurs, que des pigments soient éliminés par les excréments. De même, la réutilisation des réserves de l'hépto-pancréas lors du jeûne ou de l'administration de nourriture carenée en caroténoïdes provoque, pendant un temps plus ou moins long, la formation d'excréments colorés, phénomène auquel il faut rattacher la présence de pigments caroténoïdes dans le liquide digestif des animaux ainsi traités (FISCHER, 1927 a). C'est aussi ce qui explique les variations de l'excrétion tantôt très colorée, tantôt apigmentée durant le régime très riche en pigments.

L'hépto-pancréas qui est, rappelons-le, non seulement un lieu de stockage des réserves, mais aussi un organe digestif, siège de réactions importantes (FISHER, KON, THOMPSON, 1954) constitue donc une sorte de régulateur du métabolisme pigmentaire réglant la proportion et la nature des caroténoïdes dans les autres tissus. Ainsi, nous avons vu que toutes les réactions physiologiques de l'animal telles que la mue, la vitellogenèse, l'effet de l'ablation d'éléments neuro-sécréteurs, s'inscrivent dans l'aspect de cet organe. L'observation des variations de sa pigmentation contribue donc, de ce fait, à la connaissance et à l'interprétation des étapes de la vie de l'animal. Cela concrétise la pensée de VERNE (1926 a) citée dans l'introduction du présent ouvrage : « Les pigments représentent un stade naturellement « coloré du métabolisme de la substance vivante ».

L'excrétion de pigments par expulsion de l'exuvie à la mue et des oocytes à la ponte est assujettie à moins de variations brusques. Elle illustre l'absorption de pigment et traduit le métabolisme général de façon moins instantanée, mais avec un effet plus profond et plus durable.

Son étude permet de montrer en particulier que l'animal peut rejeter, après les avoir transformés, une quantité très grande de caroténoïdes, quand il en a absorbés beaucoup ; que, contrairement à ce que disait VERNE (1921) les pigments des téguments et des ovaires ne peuvent pas être repris et réutilisés ailleurs ni passer de l'un à l'autre ; que chez les femelles ils sont fixés en priorité dans les cellules sexuelles avant les téguments, ceux-ci ne devenant plus colorés que si l'approvisionnement aux ovaires est suffisant ; enfin et surtout, que le Crabe ne peut, en aucun cas, en faire la synthèse.

On ne peut pas se reporter à l'observation de la couleur de l'hémolymphe pour formuler des règles concernant l'absorption et l'excrétion des caroténoïdes. J'ai montré qu'il n'y avait pas toujours répercussion immédiate et très marquée du régime sur la pigmentation du milieu intérieur, ni entre celle-ci et la pigmentation des matières excrétées. En revanche, on y trouvera le témoignage de la transformation des caroténoïdes et celui de leur transport aux tissus où ils se fixent avant d'être rejetés avec eux. C'est seulement en considérant cet aspect de la question qu'on peut dire que la pigmentation de l'hémolymphe fournit des renseignements sur la capacité d'absorption et d'assimilation des caroténoïdes par l'organisme du Crabe.

2. — TRANSFORMATIONS DES PIGMENTS.

Les pigments caroténoïdes de nature différente que j'ai mis en évidence chez *Carcinus maenas* sont relativement peu nombreux par rapport à ceux que l'animal est susceptible d'absorber. En outre, ces pigments sont toujours les mêmes quels que soient les individus et le traitement que ces derniers subissent ; il y a donc une sorte d'orientation permanente dans le métabolisme pigmentaire. J'ai déjà dit (p. 31, 32) que les principaux étaient le β carotène, la xanthophylle et l'astaxanthine

sous des formes diverses. A côté de ceux-ci, j'ai montré la présence d'autres caroténoïdes moins bien définis : la cryptoxanthine, la « carcinoxanthine » (?) et un hydroxy-céto-caroténoïde (?).

Comme NICOLA et GOODWIN (1954 a), je les qualifie de « mineurs », non pas à cause de leur importance biologique qui doit, au contraire, être très grande, mais en comparaison de leur quantité par rapport aux précédents et parce que, jusqu'à présent, ils étaient passés inaperçus à cause des faibles moyens d'investigation disposés par les chercheurs. Devant la spécificité, la fréquence et la localisation de ces pigments, je pense pouvoir démontrer maintenant qu'ils représentent des composés intermédiaires ou définitifs dans le processus de leurs transformations.

Ces transformations peuvent se produire par des voies différentes dans divers tissus de l'animal car les cellules vivantes capables de transformer les caroténoïdes sont variées. Il n'y a donc que l'hémolymphe et la carapace à pouvoir être considérées comme des milieux passifs de ce point de vue, encore que des modifications dues à des réactions purement chimiques y sont peut-être possibles.

J'ai déjà déclaré ci-dessus que je considérais l'hémolymphe comme un simple véhicule transportant les caroténoïdes d'un lieu à un autre ; les variations fréquentes et très marquées de sa pigmentation sont uniquement et en partie l'expression des transformations subies ailleurs.

La carapace, formation cuticulaire amétabolique, stratifiée et calcifiée, ne peut, elle non plus, participer à l'évolution biologique des pigments. Elle forme d'abord un substratum organique par sa couche pigmentaire préexuviale où les caroténoïdes des chromatophores de l'hypoderme se combinent aux protéines et sont définitivement fixés sous forme de chromoprotéïdes, puis un substratum minéral par sa couche principale calcifiée où l'astaxanthine, formée par l'hépatopancréas à partir des pigments de l'alimentation et transportée par l'hémolymphe, se trouve adsorbée petit à petit au cours du cycle d'intermue. Les changements de pigmentation de la carapace entre deux mues n'ont donc pas d'autres causes.

Il ne semble pas que le tube digestif, estomac et intestin, participe à la transformation des pigments au cours de leur assimilation ; je ne parle pas ici des pigments qui pourraient être transformés par les sécrétions digestives avant leur excrétion. Pour le démontrer, je rappellerai l'expérience consistant à redonner à un animal d'abord carencé en pigments une nourriture enrichie en β carotène. Au bout de quelques jours, l'hépatopancréas, qui avait d'abord été purgé de tout pigment pendant le régime carencé, montre à l'analyse une quantité importante de ce dernier caroténoïde qui n'a donc pas été transformé au préalable au cours de son absorption.

Quant à l'hépatopancréas, on sait qu'il est le siège de réactions importantes ; c'est dans cet organe qu'il faut avant tout chercher les preuves de la modification, par certains tissus du Crabe, de la nature des pigments ingérés.

J'ai tenté de démontrer « in vitro » l'action des « éléments hépatiques » dans le processus de transformation. L'expérience n'ayant pas été couronnée de succès, je la résumerai rapidement.

J'ai nourri un mâle d'aliments apigmentés pendant deux mois ; au bout de ce temps, j'ai prélevé l'hépatopancréas qui était alors complètement blanc. Dans un bécher stérile, j'ai mêlé doucement 1,600 g de ce tissu avec un extrait huileux contenant 15 μ g de β carotène provenant de l'hépatopancréas de Crabes pris à la grève et j'ai recouvert le tout d'eau de mer bouillie. J'ai dosé immédiatement un mélange préparé de la même façon avec les mêmes quantités de constituants, cela pour connaître la proportion de pigments susceptibles d'être perdus en cours d'analyse et pour m'assurer que l'hépatopancréas est bien complètement exempt de pigment. Après la chromatographie où aucune zone adsorbée ne fut décelée, j'ai retrouvé

14,4 μg de β carotène ; la perte est donc minime et il n'existe pas d'autres caroténoïdes dans le mélange. Un autre béccher témoin contenait la même quantité de pigment mélangé à de l'huile de palme dévitaminée.

Les deux bécchers en expérience sont laissés à l'obscurité, à température ambiante pendant 8 jours. Au bout de ce temps, le β carotène témoin dans l'huile de palme est complètement décoloré ; il y a destruction du pigment, vraisemblablement par oxydation. Dans l'autre béccher où le tissu n'est plus très bien conservé, l'extraction et la chromatographie révèlent 10 μg de β carotène ; sur la colonne d' Al_2O_3 , il reste une très légère zone jaune ; la solution trop diluée ne permet pas l'établissement de son spectre d'absorption.

On ne peut tirer aucune conclusion de ces résultats, sinon que les tissus de l'hépto-pancréas dégénèrent trop rapidement, qu'il est difficile d'obtenir un milieu aseptique et que la molécule de caroténoïde est trop fragile pour les conditions de l'expérience. La zone jaune observée sur la colonne est peut-être due à un produit de dégradation du β carotène ; la diminution de la concentration de ce dernier est sans aucun doute, là aussi, le résultat d'une destruction et non pas d'une transformation.

Il faut donc s'en tenir pour le moment aux observations *in vivo*. Nous avons vu que l'hépto-pancréas renferme les pigments suivants : β carotène, cryptoxanthine, xanthophylle, esters d'isomères d'astaxanthine et astaxanthine libre. C'est un mélange complexe et les variations des proportions de ces différents caroténoïdes peuvent être le reflet des transformations produites.

Le β carotène des animaux nourris sans pigments disparaît assez rapidement quand les pigments les plus oxydés subsistent encore. Il en est de même pour les animaux privés de leurs pédoncules oculaires. On sait qu'il se produit en même temps une augmentation très importante, surtout chez les opérés, de la quantité d'astaxanthine imprégnant la carapace et les membranes articulaires. Or, dans l'hypoderme de certaines régions où ce dépôt a lieu, il n'y a pas de chromatophores à caroténoïdes. Ce n'est donc pas à ces cellules pigmentaires qu'on doit attribuer la production de ce pigment rouge.

Rappelons aussi qu'une nourriture riche en caroténoïdes ne provoque pas un accroissement très marqué du taux de β carotène. L'organisme arrive peut-être à maintenir un équilibre dans l'absorption de ce pigment. Cependant, le fait que la quantité des autres caroténoïdes est plus élevée dans l'animal tend aussi à démontrer que, si le β carotène n'est pas plus abondant, c'est qu'il se transforme rapidement en pigments spécifiques.

L'interprétation biologique de ces manifestations sera facilitée par un rappel des observations relevées à propos de l'hypoderme.

On distingue dans cette assise des chromatophores rouges et d'autres jaune-orange. Dans certains cas, ces derniers deviennent très peu nombreux ou bien même extrêmement rares. Il en est ainsi dans l'hypoderme des animaux carencés en pigments, tandis que les chromatophores rouges sont encore présents en nombre important, au moins dans les premiers temps du régime et y subsistent très longtemps, même après plusieurs mues. C'est aussi ce que l'on constate chez les Crabes opérés où la face externe de l'hypoderme est criblée de petits chromatophores rouges, sans aucun autre d'une couleur différente.

Il semble donc qu'on assiste à une modification des proportions de ces deux sortes de cellules avec disparition des jaunes au profit des rouges. Ces différences morphologiques se retrouvent quantitativement dans les constituants caroténoïdes du tégument. Ceux-ci sont, je le rappelle, le β carotène, la cryptoxanthine et un hydroxy-céto-caroténoïde, en quantité minime, puis la « carcinoxanthine » (?), la xanthophylle et des esters d'isomères de l'astaxanthine en quantité nettement plus

importante. Etant donné le nombre de pigments de nature différente, chaque chromatophore est susceptible d'en renfermer plusieurs. D'autre part, le dosage quantitatif a prouvé que l'astaxanthine était plus abondante dans les hypodermes de Crabe en régime riche en pigment (p. 67) ou dans celui des Crabes sans pédoncule (p. 77).

Il y a ainsi une nette relation entre l'élévation du nombre des chromatophores rouges et l'accroissement de la concentration en astaxanthine.

En rapprochant toutes ces constatations et puisque l'hypoderme est un tissu hautement métabolique, il faut admettre que les chromatophores ont la propriété de transformer les pigments, les cellules jaune-orange évoluant vers la forme rouge par passage d'un pigment à un autre à l'intérieur même du chromatophore.

On peut justifier ce point de vue en se référant à la nature chimique des pigments de ces tissus. Il ne fait pas de doute qu'il existe des rapports certains entre eux ; leur constitution le montre. Le point de départ pourrait être un hydrocarbure : le β carotène, pour aboutir en fin de transformation à l'astaxanthine par exemple.

La voie de ces transformations se ferait par « oxydation partielle sans ouverture des cycles de β ionone » (GRANGAUD, 1951, p. 28) et apparition de groupements OH et CO en nombre variable et croissant à ces deux extrémités de la chaîne polyénique. On peut passer éventuellement par des formes époxydes responsables de la formation de la « carcinoxanthine » (?), puisque ces composés jouent un rôle dans le métabolisme des caroténoïdes (HEILBRON et COOK, 1951). D'ailleurs, BODEA, NICOARA et MECEA (1957) ont montré in vitro le processus chimique de ces réactions. Le récent ouvrage de KARRER (1959) sur le développement de la chimie des caroténoïdes justifie ces hypothèses dans leur théorie. Enfin, la structure de la molécule de ces corps permet d'imaginer la formation possible de plusieurs isomères.

On sait d'ailleurs depuis longtemps que le β carotène peut se transformer en vitamine A, mais il y a ici coupure de la molécule, ce qui n'est pas le cas lors de sa transformation en caroténoïdes différents (sauf exceptions : la crocétine par exemple).

Dès le début de l'étude des pigments, les chercheurs se sont préoccupés de cette intéressante question. En ce qui concerne les Invertébrés, VERNE (1921) pense déjà que les différents pigments représentent des stades plus ou moins avancés d'oxydation ; FOX, en 1947, déclare que l'astaxanthine résulte de l'oxydation incomplète de caroténoïdes moins oxydés. GOODWIN et SRISUKH (1951), puis GOODWIN (1952 a, p. 222), remarquant que l'astaxanthine existe dans les téguments des Sauterelles *Locusta migratoria* et *Schistocera gregaria* mais ne se trouve pas dans le sang où existe, par contre, le β carotène, concluent à la transformation de ce dernier en astaxanthine. Le même auteur (GOODWIN, 1952 b) pense que des transformations identiques dans les œufs de ces Insectes sont provoquées par une enzyme oxydante. Un avis semblable est donné par MANUNTA (1952) pour expliquer la formation de pigments endogènes à partir du β carotène chez le Doryphore.

Cependant, aucun de ces auteurs n'envisage la nature même des formes intermédiaires ; c'est alors que je publie mes remarques personnelles sur la structure possible de ces derniers dans divers tissus du Crabe (LENEL, 1953 b). Les réactions et propriétés des différents pigments que j'avais réussi à isoler, en particulier l'un d'eux ayant même spectre que le β carotène et que j'ai identifié ensuite comme étant la cryptoxanthine, me faisaient suggérer l'existence de dérivés à un ou deux groupements hydroxyles (OH) et à un ou deux groupements cétones (CO). J'en concluais avoir mis en évidence la présence de constituants intermédiaires plus

ou moins oxydés entre le β carotène et l'astaxanthine. A l'appui de cette hypothèse, j'évoquais déjà la concordance existant entre la disparition rapide et presque complète du β carotène, liée à la formation d'une plus grande quantité de pigments plus oxydés, chez les animaux opérés des pédoncules oculaires et le fort accroissement de leur métabolisme de l'oxygène.

L'année suivante, d'autres auteurs utilisent le même raisonnement sur les modalités des transformations et aboutissent à des conclusions identiques. FISHER, KON, THOMPSON (1954) déclarent ma démonstration intéressante et en accord avec leurs observations. NICOLA et GOODWIN (1954 a) écrivent que certains pigments trouvés dans l'Etoile de mer *Echinaster sepositus*, dont on ignore la signification, pourraient être un « pas » important dans la biosynthèse de pigments prédominants comme l'astaxanthine. Une démonstration similaire et très intéressante est fournie par NICOLA (1954 a). De la carapace de l'Echinoderme *Ophidiaster ophidianus*, il extrait le β carotène, la cryptoxanthine, deux hydroxy-céto-caroténoïdes et l'astaxanthine. Il montre que l'introduction de groupes OH et CO dans la molécule de β carotène provoque la formation successive de la cryptoxanthine d'abord, puis du monohydroxy-monocéto- β carotène, ensuite du dihydroxy-monocéto- β carotène avant celle de l'astaxanthine (dihydroxy-dicéto- β carotène). L'introduction de ces groupes expliquerait exactement le déplacement des maxima dans les spectres des substances ainsi isolées.

Plus tard, (NICOLA, 1956), il rapproche ce phénomène de ce qui se produit dans le test de l'Etoile de Mer *Asterina panceri* et fait ressortir que la flavoxanthine (à laquelle je compare la « carcinoxanthine ») dérivant de l' α carotène a, de ce fait, un seul oxygène sur le seul cycle β ionone. C'est pourquoi elle serait un produit final au métabolisme peu actif.

C'est ensuite VEVERS et MILLOTT (1957) qui isolent aussi deux céto-caroténoïdes qui, d'après eux, peuvent intervenir dans la synthèse de l'astaxanthine chez l'Etoile de mer *Marthasterias glacialis* (L.). Pour GREEN (1957), la transformation des pigments ne fait pas de doute chez la Daphnie car, lorsqu'il y a du β carotène et de la lutéine dans la nourriture, on retrouve du γ carotène et de l'astaxanthine dans l'animal. Enfin, OHNISHI (1959) trouve des pigments nouveaux, les « papilioerythrines » dans les pupes de certains Papillons ; il y voit, lui aussi, des produits de passage entre le β carotène, ou même la lutéine, et l'astaxanthine.

Pour terminer, je citerai encore le travail de GILCHRIST et GREEN (1960) sur les caroténoïdes d'*Artemia salina* ; les auteurs considèrent aussi que le céto-caroténoïde trouvé dans cet animal pourrait être un intermédiaire dans la formation de l'astaxanthine.

Après cette revue bibliographique, je reprendrai le cas du Crabe pour dire avec plus de certitude que, dans les chromatophores de l'hypoderme, l'évolution du β carotène, et peut-être de la xanthophylle, en astaxanthine se fait en passant par l'intermédiaire de la cryptoxanthine et d'un hydroxy-céto- β carotène. Le cas de la « carcinoxanthine » (?) reste obscur ; elle peut être, dans ce processus, aussi bien un époxyde au rôle primordial parmi les intermédiaires, qu'un produit de dégradation de la xanthophylle, peu actif puisqu'estérifié. Cela expliquerait cependant difficilement pourquoi on ne retrouve que de la xanthophylle et de l'astaxanthine dans la carapace. Il faudrait alors admettre qu'elle reste indéfiniment sous cet état dans le chromatophore, ce que démentent plusieurs expériences citées, ou qu'elle se détruit complètement sur place. L'augmentation de sa quantité chez les animaux gavés de pigments peut être un argument en faveur de l'une ou l'autre des hypothèses : produit actif ou produit final.

Remarquons que les chromatophores sont seuls capables de produire la « carcinoxanthine » (?), que tous les pigments y sont estérifiés (tous épiphasiques)

et que le processus de transformation aboutit à des isomères de l'astaxanthine. Les formes libres (hypophasiques) normales et définitives seront retrouvées seulement dans l'assise pigmentaire de la carapace, siège de dépôt des produits terminaux de la transformation avant l'excrétion par la mue.

Le schéma du phénomène semble le même dans l'hépto-pancréas où la cryptoxanthine est présente. Pourtant, je n'y ai pas trouvé d'hydroxy-céto-caroténoïdes. Ils existent peut-être, mais en très petite quantité, ou bien leur évolution est très rapide. Il sera bon d'approfondir cet aspect de la question. Il faut signaler que ce tissu poursuit la transformation des pigments jusqu'à la forme astaxanthine libre normale.

Nous verrons ci-après que les ovaires sont aussi vraisemblablement capables d'effectuer les mêmes réactions.

Aucun auteur n'a jusqu'à présent démontré réellement que la xanthophylle, dérivée de l' α carotène par la structure de sa molécule, était elle-même un des pigments intermédiaires dans la formation de l'astaxanthine dérivée du β carotène. Il n'est donc pas impensable qu'il y ait deux processus biochimiques différents aboutissant finalement à ces deux pigments.

3. — MUE ET MÉTABOLISME DES PIGMENTS.

Le phénomène de la mue consiste en particulier, pour l'animal, en un rejet de l'ancienne carapace après édification des nouveaux téguments par l'hypoderme. Les pigments, pourtant quelquefois très différents, de ces diverses assises tégumentaires sont donc tous issus des mêmes cellules, les chromatophores. Ainsi, une partie des caroténoïdes de l'hypoderme se retrouvent dans la carapace à la mue suivante ; sachant qu'ils sont toujours différents les uns des autres, il est intéressant d'essayer de situer dans le temps et dans le lieu le passage d'une forme à l'autre.

La sécrétion de la couche pigmentaire préexuviale débute au stade D_2 (DRACH, 1939, p. 187). A partir de ce moment, on doit pouvoir distinguer un remaniement des pigments dans tout l'animal dû à un besoin de caroténoïdes pour cette nouvelle assise.

Les tableaux IV, V et VI (p. 127, 128, 129) ont permis de constater qu'à partir du stade D_2 , l'hémolymphe était la plupart du temps colorée, le plus fréquemment en rose ; il y a transport de pigments, astaxanthine surtout, vers les chromatophores. Cela est net chez les animaux carencés en caroténoïdes où cet aspect du liquide cavitaire ne peut être imputé à l'action de la nourriture. Ces pigments sont bien issus des réserves de l'hépto-pancréas qui reste pourtant encore coloré durant ces stades. Il est jaune mais jamais orange à la fin de D car il n'y reste plus beaucoup d'astaxanthine. A ce moment, l'hémolymphe est devenue pratiquement toujours incolore. La couche pigmentaire est formée et le stock de caroténoïdes en grande partie reconstitué dans tous les téguments.

Les modifications dans l'aspect de l'hémolymphe et de l'hépto-pancréas n'ont plus beaucoup d'intérêt aux stades suivants. On sait que le jeûne obligatoire de l'animal à cette période accentue encore la disparition des pigments ; ils seront presque complètement absents de l'hépto-pancréas au début des stades C et même jusqu'en C_3 . Il y a eu consommation des réserves avec départ et excrétion des pigments jaunes restants. C'est à ce moment que l'hépto-pancréas est le plus décoloré ; cela se produit rapidement chez des animaux en régime carencé mais de façon très nette aussi chez ceux gavés de pigments.

L'analyse des différentes assises tégumentaires montre que les modifications dans la nature des caroténoïdes qui s'y trouvent ne sont pas instantanées et ne semblent pas se réaliser exactement au même stade pour tous les individus.

J'ai mentionné précédemment (p. 43) les résultats obtenus dans l'étude de la nature des pigments présents dans les nouveaux téguments au cours de leur formation ; nous avons vu qu'ils pouvaient y être variés.

Le tableau X (p. 134) résume et compare les résultats des recherches sur 10 animaux à des stades précédant et suivant immédiatement la mue. Son examen permet de dire qu'au début du stade D_2 les pigments sont encore les mêmes que ceux de l'hypoderme. Puis en fin de D_2 et pendant les stades D_3 - D_4 , en plus de ces pigments, on peut saisir l'apparition des caroténoïdes spécifiques de la carapace. Dans les quelques heures qui suivent l'exuviation, au stade A_1 , la nouvelle carapace comprend encore des pigments caractéristiques des deux assises mais les caroténoïdes de nature hypodermique semblent avoir tendance à disparaître. Cela est confirmé aux stades A_2 , B, et la suite, où les pigments sont absolument identiques à ceux des carapaces.

On remarquera qu'il n'y a jamais de β carotène dans les nouveaux téguments ; sa transformation s'effectue donc dans l'hypoderme même. En outre, puisque la modification des pigments se poursuit dans les strates nouvellement formés, sécrétés par les cellules hypodermiques, on peut supposer que les réactions sont amorcées par les chromatophores (sécrétion d'enzymes par exemple) et qu'elles se continuent ensuite. D'ailleurs, en A_1 , il n'y a pas encore présence d'éléments calcaires sur la nouvelle assise pigmentaire, ce qui favorise peut-être l'action des chromatophores ou d'autres éléments. Ensuite commence le dépôt de sels calcaires dans les strates de la chitine ; la délimitation avec le stade précédent n'est pas bien marquée ; toutefois, on peut dire qu'en A_2 les réactions sont terminées, les pigments étant entièrement transformés. Ils seront adsorbés sur le substratum minéral alors en édification.

Je signalerai que DRACH (1939, p. 292) indique lui-même que des modifications chimiques importantes ont encore lieu au stade A_2 dans la couche préexuviale. Les difficultés d'appréciation des stades mises à part, il semble que ces modifications se terminent ici un peu avant.

Je rappellerai encore que le stade C_4 voit l'astaxanthine, résultant de la transformation par l'hépatopancréas des pigments alimentaires, se fixer sur la couche principale ; notons aussi que les affirmations de VERNE (1921) et de DAMBOVICEANU (1932) sont inexactes : les pigments de la vieille carapace ne sont pas repris pour être réutilisés ni par la nouvelle, ni par d'autres organes.

Enfin, il doit y avoir un processus particulier chez les animaux opérés des pédoncules oculaires car, en plus de l'accroissement de quantité d'astaxanthine, la mue se traduit par la formation de chromoprotéïdes de couleurs différentes de la normale.

4. — VITELLOGENÈSE, OVOGENÈSE ET MÉTABOLISME DES PIGMENTS.

Nous avons vu dans les chapitres précédents que les oocytes de *Carcinus maenas* étaient de plus en plus colorés, jaunes puis orange et enfin orange-rouge en cours de maturation. Nous savons que les pigments responsables de ces colorations sont : le β carotène en grande quantité, la cryptoxanthine ester, vraisemblablement des traces de monohydroxy-monocéto- β carotène, la xanthophylle et l'astaxanthine.

Les tableaux V, VII et VIII (p. 128, 130, 131, 132) et la relation des expériences sur la nourriture nous ont appris, comme certains auteurs l'avaient déjà signalé, que l'hémolymphe était d'abord jaune puis jaune-orange lors de la formation des gamètes ♀ pour redevenir moins pigmentée à l'approche de la ponte. Cela paraît normal puisque à ce moment la réserve des oocytes en pigments semble être cons-

tituée, tandis que celle de l'hépto-pancréas est presque totalement épuisée, sauf chez les sujets gavés de caroténoïdes où il reste encore un peu coloré. Après la ponte, ce dernier organe et l'hémolymph sont en général complètement apigmentés.

Chez les femelles nourries sans pigments, il est aisé de montrer que les caroténoïdes ovariens sont issus de l'hépto-pancréas. La décoloration de celui-ci est en effet bien plus rapide en cours de vitellogenèse que chez les mâles placés dans les mêmes conditions ; l'importance de la pigmentation de la gonade est nettement fonction de la quantité de caroténoïdes disponibles dans cet organe digestif (les ovaires des Crabes en régime riche en pigments sont, dès le départ, très pigmentés). Le fait que les femelles ne mangent plus quelque temps avant de pondre accentue encore ces phénomènes.

Il reste à définir le métabolisme des caroténoïdes dans la cellule sexuelle elle-même. Ce problème a souvent intéressé divers chercheurs à propos d'animaux variés.

En 1948 et 1949, STEVEN publie qu'il n'y a pas utilisation des pigments caroténoïdes, lutéine et astaxanthine, dans les œufs de la Truite au cours de leur développement. La même constatation est faite par GOODWIN (1951) à propos des œufs du Homard où l'auteur démontre quantitativement qu'il n'y a pas non plus utilisation de l'astaxanthine durant l'ovogenèse. D'après MONROY, MONROY-ODDO et NICOLA (1951) le contraire se produit chez l'Oursin *Paracentrotus lividus* où la quantité de pigments diminue entre la fécondation et la gastrulation de l'œuf en même temps qu'un pigment nouveau apparaît. Cela serait identique à ce qui se passe dans les œufs de Sauterelles *Schistocerca gregaria* et *Locusta migratoria* où le β carotène se transforme en astaxanthine en même temps que l'œuf se développe. (GOODWIN, 1952 b). On relève ensuite quelques avis d'apparence contradictoire dans certaines conclusions. En 1954 (b), NICOLA reprend l'hypothèse de l'évolution des pigments durant les premiers stades du développement des Echinodermes *Psammechinus microtuberculatum*, *Sphaerechinus granularis* et *Asterias glacialis*, alors que le même auteur et GOODWIN, la même année (1954 b) font savoir qu'il n'y a pas de modifications significatives dans les quantités relatives des pigments au cours du développement de l'œuf de l'Oursin *Paracentrotus lividus*. Il faut admettre alors que le processus peut être différent suivant les genres d'Echinodermes.

D'après la complexité du contenu pigmentaire des ovaires de *Carcinus maenas*, le sujet semble encore plus obscur chez ce Crabe. Cette diversité des pigments, en particulier la présence de cryptoxanthine et, sans doute, d'un hydroxy-céto-caroténoïde, plaide en faveur d'une évolution de ceux-ci à l'intérieur de la cellule. En outre, j'ai montré page 61 que la quantité de β carotène augmente dans les ovaires pendant la vitellogenèse. On peut toutefois objecter que tous ces caroténoïdes différents peuvent être apportés par l'hémolymph toujours colorée durant la vitellogenèse. C'est incontestablement ce qui se produit pour le β carotène et pour d'autres pigments. Il faudra alors préciser exactement par la suite si l'hydroxy-céto-caroténoïde existe bien dans l'ovaire et n'existe pas dans l'hémolymph. C'est en cela que la preuve d'une transformation des pigments dans les oocytes sera bien évidente.

J'ai encore essayé de savoir si l'ovogenèse était accompagnée de modifications des caroténoïdes.

Dans la nature, les œufs, une fois pondus, restent fixés sur les soies des endopodites des pléopodes durant leur développement et jusqu'à l'éclosion au stade zoé. Il n'en est pas de même dans les élevages où ils se répandent dans le fond de la boîte sitôt qu'ils sont émis. Cela ne favorise pas leur développement normal et, plusieurs fois, des œufs que j'avais entrepris d'étudier ont dégénéré sans que je puisse faire plusieurs analyses successives.

Une autre fois, j'ai prélevé une certaine quantité d'œufs nouvellement pondus et fixés sur une femelle prise directement à la grève. Le dosage effectué a révélé tous les pigments caractéristiques des ovaires sauf l'hydroxy-céto-caroténoïde qui s'y trouvait peut-être mais en trop faible quantité. J'ai suivi le développement jusqu'au stade morula puis j'ai refait un prélèvement et un dosage ; la nature des caroténoïdes était encore exactement la même. Il n'y avait donc ni disparition de pigments existants, ni apparition d'autres pigments. L'étude quantitative, très difficile sur de petites concentrations du fait des pertes en cours d'analyse, a perdu toute signification car les œufs restants se sont tous détachés de la femelle et sont morts à ce stade. Il faudrait donc reprendre cette expérience sur une plus grande échelle.

5. — *ROLE DES PIGMENTS CAROTÉNOÏDES DANS L'ANIMAL.*

Le rôle des pigments caroténoïdes dans les organismes vivants a préoccupé de tous temps les nombreux chercheurs s'intéressant à ces substances ; il a donc été très discuté mais aucune conclusion définitive n'a pu encore être acceptée sans restriction.

Chez les Végétaux, on leur attribue en particulier une fonction dans le système d'oxydo-réduction, le transport de l'oxygène, la photosynthèse, le phototropisme et la reproduction. Ces différents aspects de la question sont énumérés et commentés entre autres par WALD (1943), KARRER et JUCKER (1948, pp. 10-11), GOODWIN (1952 a, pp. 83-91 ; 1955, p. 517) et, plus récemment, par GALSTON (1959, pp. 501-510), et, en ce qui concerne les microorganismes dépourvus de chlorophylle, par VILLOUTREIX (1960, pp. 33-36) et KAYSER et VILLOUTREIX (1960).

Dans le règne animal, dès 1881 MEREJKOWSKY prête aux caroténoïdes un rôle dans la respiration, puis FUCHS (1913) pense que les pigments des Crustacés des grands fonds servent à capter l'énergie solaire pauvre dans ces régions. Une théorie très fantaisiste de protection d'ordre mécanique est alors émise par SPOTTEL (1914). C'est ensuite une fonction d'excrétion qui a les faveurs de TEISSIER (1925) imité en cela par d'autres auteurs, cependant que la signification du terme même d'excrétion est contestée en même temps par COTTE (1925). Tous ces anciens travaux sont résumés et analysés dans les ouvrages de VERNE (1926 a) et de LWOFF (1927) ; ce dernier propose un rôle possible dans la perception de la lumière en évoquant à l'appui de son point de vue le stigma rouge des Eugléniens.

Par la suite, les recherches sur ce sujet deviennent encore plus nombreuses mais elles sont trop spécialisées pour être toutes rapportées ici ; je citerai seulement une publication plus générale de WALD (1943) sur le rôle des pigments dans la photo-réception. On trouvera une bibliographie complète des autres publications toujours chez GOODWIN (1952 a).

Plus récemment, SOIN (1956) prétend démontrer le rôle respiratoire des caroténoïdes dans les œufs de certains Poissons ; puis, pour VEVERS et MILLOTT (1957) il n'est pas évident que la présence de pigment dans la peau et les taches oculaires des Etoiles de mer soit la cause de la perception de la lumière par ces animaux ; d'autre part, les relations pouvant exister entre les caroténoïdes et divers aspects des phénomènes de la reproduction sont envisagées par MASSONET (1958) chez le Rat en même temps que l'effet sur la croissance, puis par DUTRIEU (1959) chez le Crustacé *Artemia salina* et LINDER (1959) chez un autre Crustacé *Chirophalopsis bundyi*.

Enfin, je rappellerai que tous les travaux de GRANGAUD et de ses Collaborateurs ont eu pour but de prouver l'activité anti-xérophtalmique de l'astaxanthine

et que la transformation de certains caroténoïdes en vitamine A est bien évidente et n'est plus à démontrer.

Parallèlement à ces travaux, d'autres recherches étaient consacrées aux réactions in-vitro des pigments caroténoïdes. HERISSET (1948, 1954) leur trouve des propriétés anti-oxygène, CHEVALIER, BURG, MANUEL (1949) définissent le rôle anti- ou pro-oxygène selon les cas, du carotène, HIGH, SMITH, TAYLOR, WILSON (1954) étudient le processus oxydatif de la transformation du carotène et BODEA, NICOARA, FLORESCU, GROSS (1957) démontrent eux aussi que le carotène agit comme donneur ou accepteur d'oxygène. Cependant, la transposition de ces propriétés dans la fonction des pigments chez l'animal n'est ni évidente, ni réalisée, jusqu'à présent.

Après cette revue bibliographiques, on peut donc dire qu'on a tenté d'attribuer aux pigments caroténoïdes divers rôles ou fonctions dans les organismes. Ils auraient une action dans la sensibilité aux différents rayonnements, dans la reproduction, la respiration des œufs et des embryons, la croissance, et aussi, d'après certains auteurs, dans la régénération de certains tissus, le mimétisme et la protection de l'individu.

Il faut convenir, malgré ces essais d'interprétation, que le rôle des caroténoïdes demeure très énigmatique et tous les auteurs font remarquer que bien peu de choses sont connues de leurs fonctions biologiques. Seules les qualités de pro-vitamines A et l'action de certains d'entre eux ou de leurs dérivés dans le processus de la vision sont actuellement bien précisées.

Les travaux que j'ai réalisés et exposés dans cet ouvrage ne me permettent pas de mieux définir le rôle des pigments dans le métabolisme du Crabe. En effet, aucune des expériences ou des observations que j'ai faites ne peut conduire à une explication nette et précise sur ce sujet.

Tous les animaux ont vécu normalement et n'ont pas présenté de modifications sensibles de leurs fonctions en dépit des différents traitements modifiant la qualité et la quantité des pigments caroténoïdes de leur organisme. Cela est net, en particulier pour les sujets carencés en pigments et devenus totalement apigmentés après plusieurs mues. Ces individus ont mué, régénéré des appendices, pondu et réagi en tous points comme les témoins. Je rappellerai aussi le cas des œufs apigmentés qui ont été fécondés et se sont développés jusqu'au stade morula. Les caroténoïdes, ici, ne sont donc pas nécessaires à la fécondation ni au début de l'ovogenèse.

Restent les phénomènes de la vision. Je n'ai pu effectuer d'observations ayant une valeur à ce propos car, même en muant, les pigments subsistent dans les yeux des animaux et je n'ai pu obtenir de variations nettes de ce côté. Il faudrait réaliser de nombreux dosages qualitatifs et quantitatifs, ce qui ne m'a pas été possible ; l'obtention d'individus à partir des œufs complètement apigmentés serait particulièrement indiquée pour cette étude mais, à ma connaissance, personne encore n'a réussi à obtenir en élevage des individus adultes à partir d'œufs.

Chez le Crabe, le problème de la vitamine A rejoint celui de la vision car le peu de cette substance trouvée chez *Carcinus* (1,5 U.I. par spécimen) se localise uniquement dans les yeux (BATHAM, FISHER, HENRY, KON, THOMPSON, 1951 ; FISHER, KON, THOMPSON, 1952). Il n'est pas impossible que la quantité de cette vitamine qui ne se trouve donc dans aucun autre organe soit directement influencée par la teneur en caroténoïdes présents dans l'animal puisqu'elle s'y forme sans doute à partir de ces pigments. J'ai momentanément écarté cet aspect de la question qui, nécessitant l'utilisation d'autres techniques, m'aurait entraîné trop loin ; son intérêt évident me ramènera à lui par la suite.

Pour l'instant, je dois donc conclure ce paragraphe en constatant avec l'ensemble des auteurs que l'importante question de la fonction des pigments caroténoïdes n'est pas plus élucidée dans ce cas particulier du Crabe que dans celui d'autres animaux. Je me bornerai ici à considérer ces composés comme des produits d'excrétion, ce qui revient à dire avec H.-M. FOX (1955) qu'ils ne sont peut-être d'aucune utilité pour l'individu lui-même.

RÉSUMÉ DE LA TROISIÈME PARTIE

La troisième partie de ce travail comporte l'étude des différents aspects du métabolisme des pigments caroténoïdes de *Carcinus maenas*.

— J'ai d'abord recherché l'origine des pigments trouvés dans l'animal. Pour cela, après avoir décrit dans le détail la pigmentation caractéristique et théorique des tissus des Crabes témoins, j'ai observé les modifications intervenant dans celle-ci à la suite de régimes variés, en particulier totalement carencés ou, au contraire, très riches en pigments. J'ai ainsi clairement démontré que les caroténoïdes de quelque organe ou tissu que ce soit ont tous pour point de départ uniquement des pigments d'origine exogène. Il apparaît nettement que des transformations se produisant dans l'organisme amènent ensuite la formation de pigments spécifiques endogènes aux dépens des pigments ingérés, cela ne constituant pas une vraie synthèse de caroténoïdes puisque aucun organisme animal ne peut la réaliser.

— Avant d'aborder l'explication théorique de ces phénomènes et leurs rapports avec la biologie du sujet, j'ai mis en évidence l'action des éléments neuro-sécréteurs situés dans les pédoncules oculaires, sur la nature et les proportions des caroténoïdes tégumentaires et des caroténoïdes internes. Chez les animaux ayant subi l'ablation de ces éléments, la disparition rapide et presque totale du β carotène est remarquable et l'on peut penser que l'accroissement de toutes les réactions métaboliques provoqué par l'opération se traduit ici par la formation à partir de lui d'une plus grande quantité de pigments très oxydés.

— Toutes les observations ainsi obtenues et mentionnées aux chapitres précédents m'ont permis de traiter la question de l'absorption, de l'excrétion des pigments et, surtout, celle de leurs transformations en me référant à des faits précis. Je crois pouvoir affirmer que les composés de plus en plus oxydés que j'ai mis en évidence dans divers tissus sont des intermédiaires possibles entre le β carotène et l'astaxanthine. Les exemples des pigments de l'hypoderme et de l'hépto-pancréas sont particulièrement typiques de cette transformation et la constitution chimique des différents pigments considérés, de même que leurs propriétés respectives, justifient cette hypothèse.

— J'ai alors essayé d'établir l'existence de relations possibles entre les phénomènes de la mue, de la vitellogenèse et de l'ovogenèse d'une part et l'évolution de la nature et de la quantité des caroténoïdes d'autre part. Ce qui se produit lors de l'édification des nouveaux téguments avant et après l'exuviation a été le mieux étudié et expliqué. Cette question est en effet intéressante puisqu'il y a à ce moment passage de la nature caractéristique des pigments de l'hypoderme à celle des pigments de la carapace qui sont nettement différents.

— Enfin, j'ai dû constater que mes recherches ne me permettaient pas de définir de façon précise un rôle quelconque des pigments caroténoïdes dans le métabolisme de l'animal. Les problèmes de la vitamine A et de la vision ne seront pas à négliger, ils démontreront peut-être dans ce cas une fonction possible des pigments.

— Ces recherches et leurs conclusions constituent en partie une réponse aux différentes questions et suggestions proposées récemment par GOODWIN (1960, pp. 126-127) sur l'action de la nourriture dans la synthèse de l'astaxanthine, l'existence d'intermédiaires dans ce processus et l'action d'un contrôle hormonal dans la biochimie des caroténoïdes chez les Crustacés.

QUATRIÈME PARTIE

PIGMENTS CAROTÉNOIDES
ET SACCULINE, PARASITE DU CRABE

Sacculina carcini Thompson, communément appelée Sacculine, est un Crustacé Cirripède Rhizocéphale parasitant assez fréquemment le Crabe *Carcinus maenas*.

Ce parasite est d'abord totalement interne, mais au bout d'un certain temps il forme à l'extérieur, sous l'abdomen de l'hôte un sac viscéral qui grossit assez rapidement et se présente finalement sous l'aspect d'une masse ovoïde de couleur variant du jaune au violet brun et débordant les limites latérales de l'abdomen du Crabe. A ce stade, la Sacculine comprend donc schématiquement deux parties, une partie interne formée par des « racines » plus ou moins nombreuses qui se ramifient le plus souvent dans tout le corps à l'intérieur du *Carcinus* et une partie externe formée par le sac viscéral renfermant entre autres organes deux ovaires et deux testicules puisque le parasite est hermaphrodite. Ces deux parties sont reliées entre elles par un petit pédoncule qui traverse la face ventrale des téguments de l'abdomen de l'hôte. La cavité incubatrice ou palléale, assez grande, communique à l'extérieur par un orifice par lequel s'échapperont les larves nauplii après leur éclosion. Dans l'eau de mer, celles-ci nagent librement et se transforment en larves cypris qui, se fixant à la base des poils d'autres Crabes, pénétreront à l'intérieur des individus qui seront eux-mêmes alors parasités.

Le développement et ses rapports avec l'hôte ont été étudiés par plusieurs chercheurs et en particulier par VEILLET (1945) dont l'ouvrage mentionne tous les travaux intéressants publiés jusqu'à cette époque.

La Sacculine ayant une action très prononcée sur diverses fonctions du Crabe, on a mis en évidence de nombreuses modifications de la physiologie, du métabolisme et des constantes biochimiques de l'animal parasité. Une revue générale des différents aspects de ce sujet, la référence de nombreux auteurs les ayant étudiés, de même que des observations personnelles sont rapportées dans le récent travail de FRENTZ (1960).

Retenons, pour ce qui peut intéresser nos recherches, que le parasite vit aux dépens de son hôte par l'intermédiaire de ses racines internes qui puisent dans le milieu intérieur la substance nécessaire à sa nourriture et à son développement. Sachons aussi que, pour des raisons encore mal déterminées, les Crabes ayant une Sacculine externe ne muent plus, quelle que soit leur taille, et, enfin, que la Sacculine agit fortement sur la sexualité des Crabes parasités chez lesquels, en particulier, les gonades des deux sexes subissent une nette réduction, la vitellogenèse étant en outre d'abord ralentie puis stoppée.

En rapport avec ces phénomènes, je traiterai dans cette partie le résultat de mes travaux en deux chapitres. En premier lieu, je définirai la nature des pigments caroténoïdes dans la Sacculine et, ensuite, l'action de cette dernière sur les pigments caroténoïdes de l'hôte.

CHAPITRE I

PIGMENTS CAROTÉNOÏDES DE LA SACCULINE

Le parasite étant tributaire des substances présentes dans le Crabe à l'exclusion de toute autre, on devait avant tout y rechercher la présence éventuelle de pigments caroténoïdes.

A ma connaissance, aucun travail n'avait encore été consacré à cette question. Seul, H.-M. FOX (1953) recherchant la présence d'hémoglobine et de biliverdine chez divers Crustacés Cirripèdes parasites signale la couleur orange de la partie externe de *Peltogaster curvatus* parasitant *Eupagurus prideauxi* et *Eupagurus excavatus* ; le pigment étant soluble dans l'acétone, l'auteur pense qu'il s'agit probablement d'un caroténoïde.

J'ai analysé séparément les caroténoïdes du sac viscéral, des racines de la Sacculine et des larves nauplii à l'éclosion, afin de déterminer une évolution éventuelle des constituants pigmentaires entre ces différents tissus. Je donne ci-dessous le détail des résultats que j'avais préalablement publiés sous une forme plus condensée (LENEL, 1954).

1. — PIGMENTS CAROTÉNOÏDES DES SACS VISCÉRAUX.

Le sac viscéral externe du parasite est récolté par section du pédoncule qui le rattache aux téguments de l'abdomen de son hôte. Il est ensuite rincé pour éliminer le plus de sel et d'impuretés possible puis laissé quelque temps à ressuyer sur du papier filtre. L'extraction des pigments se fait alors par simple broyage à l'acétone, la suite des opérations étant identique aux manipulations déjà expliquées au début du présent travail. On obtient finalement une solution en éther de pétrole de couleur jaune. La chromatographie des dix analyses effectuées sur des Sacculines de tailles variées et plus ou moins développées m'a toujours donné exactement les mêmes résultats. Sur colonne d' Al_2O_3 P.L. 5 %, il passe de suite avec l'éther de pétrole une solution jaune qui n'est donc pas adsorbée. Sur la colonne, il reste seulement en haut une très légère bande verdâtre qu'aucun des éluants utilisés n'a réussi à décrocher ; ce n'est donc pas un caroténoïde. La courbe d'absorption de la solution précédemment recueillie montre dans l'éther de pétrole deux maxima à 477 et 450 $\text{m}\mu$ plus une inflexion à 425 $\text{m}\mu$; dans le CS_2 , les deux maxima sont à 520 et 485 $\text{m}\mu$ et l'inflexion à 450 $\text{m}\mu$. La solution semble formée d'un seul pig-

ment, ceci étant confirmé par chromatographie sur Al_2O_3 M. I. et sur CO_2Ca . Le pigment est épiphase et la saponification de ces solutions ne modifie en rien ses propriétés. Il ne peut alors subsister aucun doute sur la nature de ce pigment puisque toutes ses propriétés sont celles du β carotène. Il est donc le seul caroténoïde existant dans le sac viscéral des Sacculines.

L'action de HCl sur le tissu avant l'extraction ne fournit aucune modification à ces résultats et les parasites fixés sur les Crabes nourris avec excès de pigments caroténoïdes ne recèlent eux non plus aucun autre pigment.

L'analyse quantitative sur des organes de poids aussi faible ne peut être qu'approchée, les causes d'erreur étant ici semblables à celles déjà mentionnées lors de l'examen des hépato-pancréas ; la difficulté réside dans le séchage qui ne peut avoir exactement le même degré dans tous les cas ; il peut rester plus ou moins de traces d'eau dans la cavité palléale ou dans les tissus.

Les chiffres trouvés donnent cependant une approximation suffisante et intéressante sur la quantité de pigments présents dans les parasites externes.

Les résultats sont les suivants :

<u>Aspect du parasite</u>	<u>Quantité de β carotène</u>		
Jaune et flasque	1,59	μ g/gramme	de parasite
Jaune	2,85	—	—
Brun	6,03	—	—
Brun, assez gonflé	7,13	—	—
Brun violacé	7,41	—	—
Brun violet foncé, proche de l'émission des larves	9,07	—	—

On constate, d'après ces données, que le taux de β carotène semble lié à la maturité des gonades du parasite et, ce qui est normal, au développement des embryons. Il y aurait donc, dans l'organisme de la Sacculine, accumulation progressive et continue du caroténoïde destiné essentiellement aux futures larves ; on retrouve ici une illustration de l'opinion qui veut que le métabolisme et les besoins énergétiques du parasite reviennent presque uniquement à nourrir sans cesse de nouvelles pontes.

2. — PIGMENTS CAROTÉNOÏDES DES NAUPLII.

Les larves sortant de la cavité palléale du parasite ont une couleur violacée qui pourrait laisser supposer la présence de pigments caroténoïdes différents. C'est pourquoi j'ai recueilli une quantité suffisante de nauplii pour permettre une analyse satisfaisante, en laissant une grosse Sacculine détachée de l'hôte et prête à pondre séjourner toute une nuit dans de l'eau de mer filtrée. Au matin, les larves en grand nombre nagent librement dans le récipient. Je les ai récupérées par filtration et j'ai extrait le pigment, directement par l'acétone sur la moitié des larves, et après action de HCl préalablement à l'acétone sur l'autre moitié.

Les extraits obtenus dans l'éther de pétrole sont encore jaunes et c'est le tissu épuisé par le solvant qui reste violacé. L'analyse qualitative de la solution éthéro-pétrolique m'a révélé la présence uniquement du β carotène, en quantité relativement appréciable étant donné la taille des animaux et cela quel que soit le traitement utilisé pour l'extraction.

Ce résultat est d'ailleurs corroboré par l'examen des sacs viscéraux violets, proches de la ponte, signalé au précédent paragraphe.

3. — *PIGMENTS CAROTÉNOÏDES DES RACINES INTERNES DE LA SACCULINE.*

Puisque c'est par l'intermédiaire de ses racines que le parasite puise les matières indispensables à son entretien, on peut se demander quelle est la nature des pigments qu'on peut y trouver. J'ai donc entrepris d'analyser qualitativement le ou les pigments des « prolongements rhizoïdes » du parasite ramifiés dans l'hôte à partir du pédoncule et qui sont toujours colorés en jaune tant que la Sacculine est vivante.

Le prélèvement doit se faire par dissection sous la loupe après avoir ouvert le Crabe parasité. Ce sont les racines assez nombreuses et, pour certaines, relativement grosses convergeant vers le pédoncule qui sont les plus faciles à obtenir. La quantité recueillie s'est avérée assez importante pour en extraire une solution suffisamment concentrée et permettre une analyse satisfaisante sur micro-colonne d'alumine. L'extraction doit être précédée d'un rinçage soigné pour éliminer les traces éventuelles de liquide cavitairé du Crabe.

Une fois de plus je n'ai obtenu dans cet extrait qu'un seul et unique pigment, toujours le même, le β carotène. Dans cette opération, il restait encore en haut de la colonne, comme précédemment, une légère bande verdâtre impossible à éluer.

CONCLUSION

Le fait intéressant à constater est que, indépendamment du régime de l'hôte et du degré de développement du parasite, on ne rencontre jamais dans les différents tissus de ce dernier ou de ses embryons qu'un unique et même pigment, le β carotène.

Pourtant, si celui-ci est présent dans le milieu intérieur de l'animal parasité, il est facile de démontrer qu'il n'y est pas seul. Cela contredit complètement un aspect de la théorie de SMITH (1911) selon laquelle les racines de la Sacculine élaborent à partir du sang de l'hôte des matières de réserve analogues à celles qui sont normalement stockées dans les ovaires ; on sait en effet qu'il existe dans les gonades femelles d'autres pigments en plus du β carotène.

Le problème est donc posé de connaître les causes exactes de ce phénomène sélectif. Y a-t-il destruction ou transformation sur place, ou imperméabilité des racines à tous les pigments autres que le β carotène ? En l'état actuel de nos connaissances, la réponse ne peut être fournie. Pour l'amorcer, il faut d'abord essayer de connaître les effets de l'action du parasite sur le métabolisme des pigments caroténoïdes de l'hôte.

CHAPITRE II

ACTION DE LA SACCULINE SUR LES PIGMENTS CAROTÉNOIDES
DU CRABE PARASITÉ

Je ne puis envisager de traiter ici complètement et dans le détail cette vaste question qui pourrait constituer à elle seule le thème d'un important travail ; les observations que j'ai pu faire n'y suffiraient d'ailleurs pas. Elles me permettent cependant de les comparer aux travaux d'autres auteurs et de préciser certains points d'un sujet encore peu exploité.

C'est surtout le stade externe du parasite qui retiendra notre attention. Cela ne signifie pas que le parasite interne soit totalement sans action puisque, dès ce stade, des modifications très nettes surviennent chez l'hôte dans d'autres domaines tels que ceux de la croissance et des caractères sexuels. Cependant, le parasite interne épuise encore très peu les ressources vitales du Crabe et c'est en cela qu'une action sur les pigments doit être peu sensible.

1. — *ACTION SUR LES PIGMENTS CAROTÉNOIDES TÉGUMENTAIRES.*

Tous ceux qui se sont trouvés en présence de Crabes petits ou gros à parasite externe ont pu facilement constater que, en dessous des organismes nombreux et variés fixés sur la carapace, leur teinte était vert sombre à brun (SMITH, 1913), la face ventrale étant toujours orange à rouge ainsi que les membranes articulaires. Cela ne démontre nullement une modification dans la nature des pigments tégumentaires car l'analyse qualitative ne révèle que les pigments typiques des carapaces normales, xanthophylle et astaxanthine, de forme libre l'une et l'autre.

L'explication réside dans le blocage de la mue provoqué par la présence de la Sacculine externe. J'ai dit plus haut que l'exuviation entraîne une expulsion des caroténoïdes représentant une réelle excrétion de ces substances. Dans le cas des Crabes parasités, cette importante excrétion est stoppée et les pigments de l'alimentation s'accumulent de plus en plus jusqu'à devenir très abondants au même titre que ceux des téguments très rouges des gros Crabes muant très rarement.

Il ne faut pourtant pas exclure sans preuves la formation, comme chez les animaux ayant subi l'ablation des pédoncules oculaires, de nouveaux complexes astaxanthino-protéides (terme proposé par MASSONET, 1958) dont la forme serait

différente, soit par la nature de la protéine, soit par la nature de sa liaison avec les pigments.

J'ai profité de ce blocage de la mue pour démontrer que les pigments tégumentaires ne sont jamais réutilisés par l'organisme du Crabe. Des animaux parasités très colorés soumis à un régime carencé en pigments restent toujours aussi intensément pigmentés, quelle que soit la durée du traitement (240 jours au maximum), même chez les femelles où il y avait eu un début de vitellogenèse, donc un besoin de pigments.

On peut aussi déduire de cette expérience que la Sacculine elle-même ne prélève pas les pigments fixés dans les téguments de l'hôte ; cela semble d'ailleurs normal puisque, à part de faibles traces dans l'hypoderme, on n'y trouve pas de β carotène.

2. — ACTION SUR LES PIGMENTS CAROTÉNOIDES DE L'HÉMOLYMPHE.

Quelques travaux assez anciens ont été réalisés dans ce domaine. ROBSON (1911) trouve que le sang des Crabes *Inachus mauritanicus*, ♂ ou ♀, parasités par *Sacculina neglecta*, est toujours rose comme chez les animaux proches de la mue. Par contre, SMITH (1911, 1913), observant le sang de *Carcinus maenas* parasité, affirme qu'il est invariablement incolore ou faiblement jaune quel que soit le sexe et qu'il n'est jamais rose.

Je ne suis pas d'accord avec ces auteurs, SMITH en particulier, car mes observations amènent une conclusion légèrement différente. J'ai relevé la pigmentation de l'hémolymphe de 56 mâles et 64 femelles en classant pour chaque sexe les résultats des animaux à Sacculine interne et à Sacculine externe. Dans chaque catégorie, j'ai porté le nombre d'hémolymphe incolores, jaunes, orange ou roses.

Chez les mâles à parasite interne, il y avait 8 hémolymphe incolores et 5 nettement roses ; dans le cas plus probant des parasites externes, 18 hémolymphe étaient incolores, mais 8 étaient bien jaunes, 5 orange et 12 roses.

Pour les femelles, j'ai trouvé 8 hémolymphe incolores, 1 jaune, 9 orange et 2 roses chez les individus à Sacculine interne, et 19 incolores, 14 jaunes, 7 orange et 4 roses si le parasite est externe.

Il n'est donc pas exact de dire que le « sang » des Crabes parasités est toujours incolore ou faiblement jaune mais jamais rose. Si on compare les chiffres fournis par les mâles à Sacculine externe — Crabes étant sûrement tous au stade C_4 de l'intermue — avec ceux du tableau IV, page 127, on constate qu'il y a peu de différence entre les Crabes normaux et les Crabes parasités ; le nombre des hémolymphe orange ou roses aurait même une légère tendance à augmenter chez les parasités, mais il n'y a pas assez de cas pour en faire une certitude.

De toute façon, certains phénomènes subsistent dont l'action doit motiver une coloration plus ou moins intense et variée de l'hémolymphe. C'est tout d'abord l'accentuation constante de la pigmentation des téguments ; les caroténoïdes y sont transportés par le milieu intérieur, on doit donc y déceler leur présence. C'est aussi chez certaines femelles un début de vitellogenèse puisque, dans quelques cas, les ovaires, même réduits, ont une teinte jaunâtre ou orange ; là encore, les pigments responsables sont véhiculés aux gonades par l'hémolymphe. Enfin, les pigments de la nourriture ingérée peuvent se retrouver dans le liquide cavitaire et donner à celui-ci une couleur variable.

Ainsi, ayant prélevé en plusieurs prises espacées de quelques jours de petites quantités d'hémolymphe à des individus à parasite externe, j'ai pu constater les variations de la pigmentation avec passage de la teinte jaune à la teinte orange ou rosée et vice versa. Pour éliminer le facteur pigment de l'alimentation, je me suis adressé à des Crabes carencés en caroténoïdes. Chez une femelle ayant une

grosse Sacculine, l'hémolymphe était encore très jaune 75 jours après le début du traitement, les ovaires étant eux-mêmes orange ; chez un mâle à parasite externe, au bout de 1 mois l'hémolymphe était rose, puis jaune orange après 50 jours de régime apigmenté.

La présence d'un stock pigmentaire important dans l'organisme de l'animal est d'ailleurs attestée par tous les auteurs qui font remarquer que l'hépatopancréas est toujours très coloré chez les Crabes parasités ; mais je conteste l'affirmation de SMITH (1913) selon laquelle la lutéine n'inonde pas le sang du parasite car les racines de la Sacculine l'extraient de suite rapidement. Il n'y a en effet pas de lutéine dans la Sacculine et si le parasite prélève du β carotène, ce dernier est accompagné d'autres pigments dans l'organisme du Crabe.

Du point de vue quantitatif, malgré les difficultés d'analyse dues aux très petites quantités traitées à la fois, il semble que l'on puisse dire dans certains cas qu'il y a une réduction de la quantité du β carotène que je n'ai, hélas, pas pu chiffrer. Dans 4 cas au moins, je n'ai trouvé à la chromatographie que des traces de ce pigment, sa concentration n'étant importante que dans un autre exemplaire. Cela peut paraître normal puisque, comme je l'ai déjà signalé, le parasite chez lequel on ne trouve que du β carotène doit puiser celui-ci dans le milieu intérieur. C'est peut-être là le seul point où la Sacculine agirait sur le métabolisme pigmentaire de l'hémolymphe et il n'est pas impossible que l'on démontre un jour un parallélisme entre les divers stades physiologiques du parasite et les fluctuations du taux de β carotène dans le liquide cavitair de l'hôte.

3. — ACTION SUR LES PIGMENTS CAROTÉNOIDES DE L'HÉPATO-PANCRÉAS.

L'hépatopancréas étant un organe aux nombreuses et importantes fonctions métaboliques, l'action du parasite s'y fait évidemment sentir sous divers aspects. En particulier, FISCHER (1928) signale que le foie des Crabes parasités subit une réduction assez prononcée. Auparavant, ROBSON (1911) et SMITH (1911, 1913), voulant démontrer l'existence d'une corrélation entre le taux de lipides dans l'organisme des parasités et leur degré de féminisation, publient qu'il y a toujours une augmentation de la quantité des graisses dans le foie des Crabes sacculinés.

Dans le cas de *Carcinus maenas*, ce phénomène entraînerait une coloration constante jaune brillant et VEILLET (1945, p. 244) fait la même observation à propos de jeunes animaux dont l'hépatopancréas, de vert noirâtre qu'il était, devient jaune quand la Sacculine est externe.

Cette question du taux des lipides chez les parasités a été très controversée et son étude étendue à des Crustacés de différentes espèces ; une revue bibliographique comparée de ces travaux est fournie par RUDLOFF et VEILLET (1954). Pour s'en tenir au seul exemple du *Carcinus*, les travaux de FRENTZ et VEILLET (1953), repris et détaillés par FRENTZ (1960), apportent la conclusion que « ... le parasitisme du Crabe par la Sacculine ne modifie pas significativement la teneur en graisse de l'hôte, sauf peut-être au moment de la sortie du sac viscéral et de la première croissance de celui-ci ».

Une des erreurs de SMITH concernant les pigments est de faire dépendre obligatoirement la teinte de l'hépatopancréas de sa teneur en lipides. S'il est exact que les pigments caroténoïdes responsables en grande partie de la couleur de l'organe sont liposolubles et donc dissous dans les globules graisseux des « tubes hépatiques », cela ne signifie pas forcément que le foie soit plus ou moins coloré quand il y a plus ou moins de graisse. D'ailleurs, ROBSON (1911), chez *Inachus* parasité, signale de grandes quantités de graisse dans le foie mais aussi une absence de coloration de celui-ci. Les animaux ne pouvant faire la synthèse directe des caroténoïdes,

le métabolisme de ceux-ci n'est pas nécessairement tributaire du métabolisme des graisses ; ils peuvent seulement, quand ils sont présents, en être éventuellement l'expression imagée.

C'est pourquoi mes propres observations n'aboutissent pas à des résultats aussi catégoriques que ceux de SMITH. L'hépatopancréas des Crabes parasités n'est pas constamment jaune brillant, cependant, la coloration jaune ou jaune orange est de beaucoup la plus fréquente.

Sur 73 animaux à parasite externe dont j'ai relevé la pigmentation de l'hépatopancréas, 62 ont cet organe très coloré, de jaune à jaune orange, celui des 11 autres étant très pauvre en pigments caroténoïdes (couleur bistre ou blanche). Pour la comparaison, le tableau IV, page 127, nous révèle des proportions bien différentes chez les mâles normaux en C₄, avec 173 hépatopancréas colorés et 83 autres bistres ou blancs.

Ces faits ne sont pas surprenants puisque dans le cas normal les périodes de décoloration maximum de cet organe se situent après la mue, au début des stades C, et en outre après la ponte chez les femelles ; ces deux étapes physiologiques étant supprimées par la présence du parasite externe, il n'existe plus de « demande » de pigments de la part des tissus soumis à ces modifications. Les réserves pigmentaires de l'hépatopancréas, de même que la nourriture, suffisent à assurer les faibles besoins de la Sacculine en caroténoïdes. L'excédent, nous l'avons vu, est transporté progressivement aux téguments. Les individus dont l'hépatopancréas n'est pas coloré sont alors peut-être ceux dont les réserves n'étaient pas suffisamment reconstituées au moment de la sortie du parasite.

L'intérêt se reporte alors sur les parasités nourris sans pigment caroténoïde. Nous avons vu au tableau VIII, page 131, que les Crabes ♂ normaux, carencés en pigment et n'ayant pas mué, avaient l'hépatopancréas totalement apigmenté, vraisemblablement assez tôt, mais de toute façon au moins 50 jours après le début du régime. Pour les femelles, la décoloration dépend dans ce cas de la vitellogenèse. Au début de celle-ci, quand son action est encore pourtant peu intense, l'hépatopancréas est déjà totalement décoloré le 22^e jour. En revanche, chez les mâles ou les femelles à parasite externe, cet organe demeure très coloré bien après ce laps de temps.

Un mâle avait l'hépatopancréas bien jaune après 48 jours de carence et chez un autre mâle ayant deux Sacculines externes, il était encore intensément jaune d'or après 70 jours. Chez les 6 femelles traitées de la même façon, l'hépatopancréas était également soit jaune, soit même jaune orange respectivement 64, 69, 75, 95, 100 et 105 jours après le début du régime. Dans l'exemple observé à 75 jours, l'organe était encore jaune orange, les ovaires eux aussi étaient pourtant colorés en orange.

Devant ces différents aspects entre Crabes normaux et parasités, on doit admettre une action incontestable du parasite sur le métabolisme des pigments de l'hépatopancréas de l'hôte. Elle se traduit le plus souvent par la présence continue de caroténoïdes dans cet organe. Le mécanisme de cette action étant susceptible d'être précisé grâce aux résultats de l'analyse, j'ai recherché les modifications éventuelles de la nature et de la quantité des pigments dans l'hépatopancréas des animaux parasités nourris sans caroténoïde, seuls susceptibles de fournir des données significatives et spécifiques.

La nature des caroténoïdes mis en évidence n'est pas différente de celle des hépatopancréas normaux ; on peut y trouver, en tout ou en partie selon les cas, du β carotène, de la cryptoxanthine, de la xanthophylle et de l'astaxanthine normale et isomérisée. De ce point de vue, il n'y a donc pas de preuve de l'action

du parasite. Restent les résultats des analyses quantitatives. Si nous reprenons comme témoins les animaux normaux carencés en caroténoïdes, nous avons vu page 65 et dans le tableau VIII, page 131, qu'au bout de 50 jours au grand maximum il n'y avait plus du tout de β carotène dans l'organisme ; je concluais alors qu'il avait été transformé en pigments spécifiques plus oxydés. Chez les parasités par contre, au bout de 75 jours pour un exemplaire, il restait dans l'hépto-pancréas 63,8 $\mu\text{g/g}$ de pigments totaux dont une quantité importante de β carotène : 57 $\mu\text{g/g}$; dans d'autres cas, il n'y avait pratiquement plus que du β carotène, et cela après 69, 70 et 105 jours de nourriture apigmentée, la concentration étant de 58,1 $\mu\text{g/g}$ pour l'un d'eux.

Ces constatations sont intéressantes et montrent que la proportion de β carotène augmente progressivement dans l'hépto-pancréas des Crabes sacculinés, ce pigment devenant finalement, semble-t-il, le seul pigment présent dans cet organe. Nous avons ainsi une démonstration concrète de l'influence de la Sacculine sur les pigments caroténoïdes du Crabe parasité.

L'interprétation de ces phénomènes reste cependant très énigmatique et plusieurs explications peuvent être suggérées sans qu'aucune d'elles soit particulièrement probante. On peut imaginer que la présence du parasite provoque par exemple un manque d'assimilation du seul β carotène par les tissus du Crabe ; ou encore un blocage des réactions d'oxydation, donc de la transformation de ce caroténoïde ; ou même une réduction des cycles oxygénés des xanthophylles et astaxanthines avec néoformation du β carotène, comme cela pourrait se produire semble-t-il dans d'autres cas (GRANGAUD, VIGNAIS, MASSONET, MOATTI, 1957). Ce ne sont là que de pures hypothèses, la physiologie des Crabes sacculinés n'étant pas encore assez approfondie pour permettre aux chercheurs de se prononcer.

On sait que chez les Crabes normaux l'ablation des pédoncles oculaires se traduit par la décoloration de l'hépto-pancréas et, à longue échéance, par la disparition du β carotène. Il était alors curieux de rechercher les résultats de cette opération sur les pigments des hépto-pancréas des Crabes sacculinés où, au contraire, comme nous venons de le voir, le β carotène reste en quantité importante. Cette étude, pour l'instant encore superficielle, semble indiquer une prédominance des effets de l'opération sur les effets résultant du parasitisme.

L'hépto-pancréas de 11 animaux parasités ayant subi l'ablation bilatérale des pédoncles oculaires, que j'ai eu l'occasion d'observer, était peu coloré en beige ou beige rosé dès le 25^e jour après l'opération. C'est une couleur qui est à peu de chose près typique de celle des hépto-pancréas d'animaux non sacculinés opérés. Chez deux autres animaux normalement nourris, opérés alors que la Sacculine était encore interne, le sac viscéral du parasite est sorti 22 et 27 jours après l'opération. L'analyse pratiquée 60 jours plus tard a montré seulement 0,37 $\mu\text{g/g}$ de β carotène dans l'hépto-pancréas beige clair de l'un d'eux et 0,62 $\mu\text{g/g}$ dans l'hépto-pancréas de l'autre. Dans ces deux cas, la présence du parasite interne ou externe n'a pu ni maintenir ni reformer le taux élevé de β carotène existant normalement dans l'hépto-pancréas des Crabes sacculinés.

L'absence des éléments neuro-sécréteurs des pédoncles oculaires provoque donc bien une réaction plus forte et opposée à celle de la Sacculine sur le métabolisme des pigments de l'hépto-pancréas de *Carcinus maenas*.

RÉSUMÉ DE LA QUATRIÈME PARTIE

Cette partie concerne l'étude des pigments caroténoïdes du Crustacé Rhizo-céphale *Sacculina carcini* Thompson parasitant le Crabe *Carcinus maenas* et l'action de ce parasite sur le métabolisme des pigments caroténoïdes de l'hôte.

J'ai tout d'abord défini la nature des pigments présents dans le sac viscéral externe du parasite, les racines internes et les larves à l'éclosion. L'analyse a révélé dans chacun de ces éléments un seul et même pigment, le β carotène en quantité non négligeable.

Ce fait est d'autant plus curieux que la Sacculine puise toute sa substance du milieu intérieur de l'hôte et qu'on trouve dans celui-ci plusieurs caroténoïdes de nature variée. Cela laisse supposer une nette influence du parasite sur le métabolisme des pigments. La démonstration est particulièrement évidente si l'on considère en particulier les caroténoïdes de l'hépatopancréas du Crabe parasité. Cet organe est en effet toujours très riche en pigments et, après un temps plus ou moins long, il semble qu'on y trouve uniquement du β carotène. Le mécanisme de ce phénomène ne peut encore être éclairci.

Enfin, l'ablation des éléments neuro-sécréteurs des pédoncules oculaires serait susceptible de contrecarrer cette action et de fournir des résultats différents de ceux observés chez les animaux parasités non opérés.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Les pigments caroténoïdes sont des substances largement répandues dans la nature. Leur présence, très facile à observer du fait de leur couleur, peut servir, dans certains cas, à mieux comprendre la biologie des êtres vivants dans lesquels ils se trouvent. De plus, on est autorisé à penser que leur fonction dans l'organisme n'est peut-être pas à négliger, ce qui justifie l'intérêt que leur portent un grand nombre de chercheurs.

Ce sujet n'ayant jamais été traité dans le détail en ce qui concerne les Crustacés, pourtant toujours très riches en pigments, j'ai entrepris son étude dans le cas précis du Crabe *Carcinus maenas*.

Le domaine ainsi prospecté est bien entendu trop vaste, pour un chercheur isolé, pour être totalement et définitivement défriché et les voies sont encore nombreuses qui nécessiteront la poursuite des travaux ainsi commencés. D'ailleurs, tout au long de cet ouvrage, j'ai indiqué les lacunes qui subsistent encore dans nos connaissances et il m'appartiendra, ainsi qu'à d'autres, de les combler petit à petit.

Ce sont les résultats déjà très abondants que j'ai obtenus qui font l'objet de ce présent travail.

Après avoir présenté l'exposé de la question, je donne sommairement les renseignements utiles sur le matériel étudié et sur les conditions d'élevage des animaux. Les différentes opérations permettant le contrôle des constantes physiques et chimiques de l'eau de mer utilisée en circuit fermé sont particulièrement développées ; le maintien des conditions naturelles est en effet nécessaire à la réussite des élevages. C'est l'élimination du CO_2 par réoxygénation de l'eau contaminée qui apparaît le plus indispensable ; cela permet le retour à un pH normal.

A la suite de ce préambule technique, j'aborde le sujet lui-même.

PREMIÈRE PARTIE.

— La première partie, peu importante par sa longueur, l'est cependant par son contenu. Elle traite d'abord des pigments caroténoïdes en général et donne des indications peu approfondies mais suffisantes sur leur structure et leurs principales propriétés. Elle est donc indispensable pour nous familiariser un peu avec ces substances.

Une revue bibliographique circonscrite la complète, l'ensemble formant ainsi un tout homogène plaçant le lecteur au cœur du problème avec suffisamment de connaissances pour lui permettre de mieux comprendre le travail et les arguments exprimés.

DEUXIÈME PARTIE.

— Elle comprend tout d'abord un chapitre consacré aux différentes techniques et manipulations utilisées pour obtenir les pigments caroténoïdes séparés les uns des autres. Il faut en retenir la nécessité de prendre certaines précautions en cours d'étude pour éviter la dégradation ou la transformation de ces derniers. L'essentiel de l'analyse repose sur le fractionnement des solutions par chromatographie sur colonne, d'alumine principalement, et sur la détermination de la nature des produits ainsi isolés par confection de leur spectre d'absorption dans différents solvants au spectrophotomètre. Ces propriétés d'absorption sont en outre susceptibles de nous fournir certains renseignements quantitatifs.

— Le deuxième chapitre est une suite logique du précédent puisqu'il nous révèle la nature et les propriétés des différents pigments trouvés grâce aux techniques précédemment décrites. La nature des uns est facile à démontrer ; il s'agit du β carotène, de la xanthophylle (lutéine), de l'astaxanthine et de l'astacine, certains d'entre eux pouvant se présenter sous des formes isomérisées ou estérifiées, ou encore être complexés avec des protéines. Celle des autres est moins précise et plus difficile à déterminer ; ce sont vraisemblablement des mono- ou poly-hydroxy-caroténoïdes dont l'un serait la cryptoxanthine, et des mono- ou poly-hydroxy-céto-caroténoïdes de structure et de position intermédiaires dans le processus de la transformation des pigments par l'organisme ; malgré leur qualification de « mineurs », leur importance est donc de premier ordre dans le métabolisme de ces substances. Un de ces caroténoïdes ne semble pas encore avoir été signalé par aucun auteur ; je l'ai appelé, dans le cadre de ce travail, la « carcinoxanthine ».

— Tous ces pigments variés sont plus ou moins diversement localisés dans les différents tissus ou organes du Crabe ; le chapitre III nous donne leur répartition dans l'animal.

La carapace, les exuvies, les membranes articulaires rouges, renferment de l'astaxanthine libre, des astaxanthino-protéides, et de la xanthophylle non estérifiée.

La constitution pigmentaire de l'hypoderme est plus complexe. La nature d'un des pigments les plus répandus dans ce tégument reste assez obscure, c'est la « carcinoxanthine ». Les autres pigments, en proportions variables, sont : des traces de β carotène, la cryptoxanthine, la xanthophylle, un hydroxy-céto-caroténoïde très peu concentré et des isomères d'astaxanthine en quantité assez importante.

La position intermédiaire des nouveaux téguments explique la diversité constatée dans l'association de leurs pigments. On peut en effet y trouver soit les pigments typiques des carapaces, soit ceux de l'hypoderme, ou encore un mélange variable des uns et des autres.

A l'exception de la « carcinoxanthine », tous les pigments énumérés au chapitre II existent ou sont susceptibles d'exister dans l'hémolymphe, l'hépatopancréas, les ovaires et les œufs.

TROISIÈME PARTIE.

Je devais ensuite exploiter ces connaissances acquises pour étudier le métabolisme des pigments en relation avec le métabolisme du Crabe.

— C'est d'abord l'importante question de l'origine des caroténoïdes présents dans l'individu qui fait l'objet du premier chapitre, le but de cette étude étant de préciser si l'animal peut ou non faire la synthèse de ces pigments ; ce sujet a toujours été très discuté et controversé à propos de tout le règne animal.

C'est l'observation de l'action de la nourriture sur les caroténoïdes des différents tissus du sujet et l'analyse de ses effets qui constituent l'essentiel du travail

réalisé. Avant tout, grâce à l'étude approfondie de 814 animaux, j'ai déterminé la pigmentation théorique des différents organes des Crabes considérés ainsi comme témoins, en fonction du sexe et des diverses étapes physiologiques. La principale difficulté rencontrée réside dans l'action de facteurs individuels incontrôlables ; le nombre élevé de cas considérés réduit cependant au maximum leur influence. En définitive, seule la pigmentation de l'hémolymphe ne peut trouver place dans un cadre théorique préalablement établi, que pour certains stades bien précis.

Je mentionne ensuite les résultats obtenus par l'administration de différents régimes de teneur variable en caroténoïdes.

Le régime totalement carencé en pigments fait apparaître une diminution constante de la concentration des caroténoïdes de toutes les parties de l'organisme. Cette diminution est facile à chiffrer dans les exuvies successives d'un même Crabe. La disparition des chromatophores rouges ou orange de l'hypoderme est très longue et ne sera peut-être jamais totale ; les chromatophores jaunes semblent disparaître les premiers. Au bout d'un temps plus ou moins long, l'hépatopancréas est complètement blanc. Il en est de même des ovaires où les oocytes pigmentés ne sont cependant pas dégénérés, certains œufs ainsi pondus ayant commencé leur développement.

L'analyse quantitative a démontré que le β carotène disparaissait assez rapidement de l'organisme ; c'est une preuve qu'il se transforme en caroténoïdes différents subsistant encore dans les tissus.

Si, à des animaux carencés, on redonne des aliments contenant des caroténoïdes, tous les organes retrouvent progressivement leur pigmentation caractéristique facile à doser dans la nouvelle carapace formée après la réabsorption des pigments.

Le régime très riche en pigments fournit des renseignements corroborant ceux déjà obtenus précédemment et montre aussi que la teneur en β carotène reste à peu près normale et constante dans les individus. Ce pigment se transforme donc assez rapidement puisque la concentration des autres pigments augmente.

De ces résultats, on peut conclure en particulier que le Crabe ne peut pas effectuer la synthèse directe des pigments caroténoïdes mais qu'il est toutefois capable de transformer ceux qu'il absorbe en pigments spécifiques endogènes ; ceux-ci, en nombre limité, sont toujours de même nature, quel que soit le traitement appliqué. On peut dire aussi que les caroténoïdes tégumentaires ne sont jamais réutilisés par l'organisme et que la présence de pigments caroténoïdes ne semble pas indispensable à l'accomplissement des principales réactions physiologiques de l'animal.

— Par le chapitre II, j'apporte ma contribution aux nombreux travaux démontrant l'action des éléments neuro-sécréteurs, organe X et glande du sinus situés dans le pédoncule oculaire, sur de multiples fonctions de l'animal.

Je montre pour ma part que, en ce qui concerne le métabolisme des pigments, les modifications enregistrées s'inscrivaient bien dans la ligne générale d'une augmentation très nette de toutes les réactions métaboliques. On peut les résumer en disant que les pigments, β carotène en premier lieu, sont plus rapidement oxydés, ce qui provoque un accroissement de la concentration de l'astaxanthine dans les téguments et les ovaires. La formation des complexes astaxanthino-protéines de la carapace paraît, elle aussi, influencée par l'ablation de ces massifs glandulaires.

— Tous les faits ainsi observés apportent un faisceau d'arguments permettant la construction d'hypothèses concernant les modalités de l'absorption, de l'excrétion et de la transformation des pigments, et les rapports existant entre la présence de caroténoïdes et les phénomènes de la mue et la vitellogenèse. C'est ce qui constitue en grande partie la matière du troisième chapitre.

L'importance de l'hépatopancréas comme organe régulateur de l'absorption, de l'excrétion et de la transformation des pigments y est mise en évidence, l'exuvia-

tion et la ponte représentant elles-mêmes un phénomène supplémentaire non négligeable d'excrétion des caroténoïdes.

Cela m'amène à démontrer que le β carotène se transforme en astaxanthine par différentes réactions d'oxydation, certains des autres pigments isolés représentant les formes intermédiaires dans ce processus. Leur structure chimique, dévoilée par leurs propriétés, permet de justifier cette théorie, mais la position de la xanthophylle et de la « carinoxanthine » n'est pas bien établie dans le déroulement de ces réactions.

Ces transformations s'effectuent surtout dans les tissus hautement métaboliques que sont l'hépto-pancréas et l'hypoderme. Lors de la formation des nouveaux téguments par les cellules de l'hypoderme, il se produit un remaniement dans la nature des pigments pour donner, après la mue, les pigments caractéristiques de la carapace. Le passage d'une forme à l'autre se réalise entre les stades D_3 et A_1 du cycle d'intermue.

Le chapitre se termine par un essai d'interprétation du rôle possible des pigments dans l'animal. Aucun des renseignements recueillis ne me permet d'attribuer une fonction bien définie à ces substances, sauf éventuellement dans le phénomène de la vision.

QUATRIÈME PARTIE.

Elle a pour objet la recherche des caroténoïdes de la Sacculine parasitant le Crabe et des effets de celle-ci sur les pigments de l'hôte.

— Dans un premier chapitre, je démontre la présence, comme caroténoïde, du seul β carotène dans le sac viscéral externe, les racines internes et les embryons du parasite. Le fait est d'autant plus curieux que la Sacculine puise sa substance dans l'organisme de l'hôte qui contient lui-même des pigments d'autre nature. Les causes de cette préférence pour le β carotène restent encore énigmatiques.

— La présence du parasite modifiant certaines réactions physiologiques du Crabe parasité, il restait à déceler l'existence possible de telles modifications sur le métabolisme des pigments. Le chapitre II apporte les premières données obtenues sur ce sujet.

La mue de l'hôte étant supprimée par la sortie du parasite, les pigments s'accumulent dans les téguments sans être rejetés ni réutilisés ; c'est la cause unique de la pigmentation toujours très intense des Crabes à Sacculine externe.

Malgré les résultats de certains travaux déjà anciens, il ne semble pas que la pigmentation de l'hémolymphe soit beaucoup perturbée par la présence du parasite, autrement que par une réduction de la quantité de β carotène. C'est par ailleurs l'inverse qui se produit dans l'hépto-pancréas où le taux de ce pigment devient proportionnellement plus important. De toute façon, la Sacculine n'induit jamais la formation par l'animal de pigments autres que ceux trouvés chez les Crabes témoins.

Enfin, on sait que l'ablation des pédoncules oculaires provoque chez les animaux normaux des résultats en partie différents de ceux-ci, c'est pourquoi j'ai pratiqué cette opération chez des individus parasités ; la concentration très basse du β carotène alors constatée dans les tissus du Crabe ainsi traité montre que l'action du parasite est moins prononcée que l'action résultant de l'ablation des pédoncules oculaires.

BIBLIOGRAPHIE

- ABELOOS M., FISCHER E. (1926). — Sur l'origine et les migrations des pigments carotinoïdes chez les Crustacés. C. R. Soc. Biol., **95** pp. 383-384.
- ABELOOS M., FISCHER E. (1927). — Les pigments carotinoïdes chez les Crustacés : sur l'origine des pigments de la carapace. C. R. Soc. Biol., **96**, pp. 374-375.
- ABELOOS M., FISCHER E. (1928). — Sur les transformations des pigments carotinoïdes dans le tube digestif des Crustacés. C. R. Soc. Biol., **98**, pp. 673-675.
- ABRAMOWITZ R. K., ABRAMOWITZ A. A. (1940). — Moulting, growth and survival after eyestalk removal in *Uca pugilator*. Biol. Bull., **78**, pp. 179-188.
- ALLPORT N. L. (1947). — Colorimetric analysis. Chapman and Hall, London.
- ALTMANN G. (1959). — Hormonale Beeinflussung des Stoffwechsels bei *Carcinus maenas*. Experientia, **15**, pp. 191-192.
- BALL E. G. (1944). — A blue chromoprotein found in the eggs of the Goose-Barnacle. J. Biol. Chem., **152**, pp. 627-634.
- BATHAM E., FISHER L. R., HENRY K. M., KON S. K., THOMPSON S. Y. (1951). — Preformed vitamine A in marine crustacea. Biochem. J., **48**, pp. 10-11.
- BAUCHAU A. G. (1948). — Intensité du métabolisme et glande sinuaire chez *Eriocheir sinensis* H. M. Edw. Ann. Soc. Roy. Zool. Belg., **79**, pp. 73-86.
- BAUER L. (1952). — Trennung der Karotinoide und chlorophylle mit Hilfe der Papierchromatographie. Naturwiss., **39**, p. 88.
- BLISS D. E. (1953). — Endocrine control of metabolism in the land crab, *Gecarcinus lateralis* (Fremenville). I. Differences in the respiratory metabolism of sinus-glandless and eyestalkless crabs. Biol. Bull., **104**, pp. 275-296.
- BLISS D. E., DURAND J. B., WELSH J. H. (1954). — Neurosecretory systems in decapod Crustacea. Z. Zellforsch., **39**, pp. 520-536.
- BLISS D. E., WELSH J. H. (1952). — The neurosecretory system of brachyuran Crustacea. Biol. Bull., **103**, pp. 157-169.
- BODEA C., NICOARA E., FLORESCU M., GROSS J. (1957). — Asupra mecanismului de actiune al carotinei in vitro si in vivo. Stud. Cerc. Chim., Roman., **5**, pp. 27-34.
- BODEA C., NICOARA E., MECEA E. (1957). — Asupra autoxidarii carotinoidelor. II. Mecanismul de formare al epoxizilor si al furanoid-oxizilor de carotina si xantofile in procesul de autoxidare al α -si β -carotinei. Stud. Cerc. Chim., Roman., **5**, pp. 17-25.
- BOGART M. T. (1938). — « Carotenoids : The Polyene Pigments of Plants and Animals ». Organic Chemistry, **2**, pp. 1138-1219, John Wiley and sons, New-York.

- BROCKMANN H., SCHODDER H. (1941). — Aluminiumoxyd mit abgestuftem Adsorptionsvermögen zur chromatographischen Adsorption. Ber. dtsh. chem. Ges., **74**, pp. 73-78.
- BRODE W. R. (1950). — Spectrophotometry and colorimetry, dans « Physical Methods in Chemical Analysis », **1**, pp. 193-253, ed. BERL W. G., Academic Press, New-York.
- BROWN F. A. Jr (1934). — The chemical nature of the pigments and the transformations responsible for color changes in *Palaemonetes*. Biol. Bull., **67**, pp. 365-380.
- BROWN F. A. Jr (1942). — Sinus gland extirpation in the Crayfish without eyestalk removal. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **50**, pp. 295-297.
- BROWN F. A. Jr (1948). — Hormones in Crustaceans, dans « The Hormones », pp. 159-200, ed. PINCUS G., THIMANN K., Academic Press, New-York.
- BROWN F. A. Jr (1949). — The mechanism of color changes in crustaceans. Collecting Net, **19**, pp. 8-12.
- BROWN F. A. Jr, JONES G. M. (1947). — Hormonal inhibition of ovarian growth in the crayfish *Cambarus*. Anat. Rec., **99**, p. 657.
- BROWN F. A. Jr, JONES G. M. (1949). — Ovarian inhibition by a sinus-gland principle in the fiddler crab. Biol. Bull., **96**, pp. 228-232.
- BROWN F. A. Jr, SANDEEN M. I., WEBB H. M. (1949). — Responses of the red chromatophores of the fiddler crab. Anat. Rec., **105**, p. 615.
- BUSNEL R. G., DRILHON A. (1948). — Sur les pigments flaviniques et ptéridiniques des Crustacés. Bull. Soc. Zool. Fr., **78**, pp. 141-185.
- CHASSART C. (1957). — Modifications de la répartition topographique des chromatophores au cours de l'adaptation chromatique d'*Hippolyte varians* Leach (Crust. Déc.), C. R. Ac. Sc., **245**, pp. 2406-2409.
- CHECHAN C., GRANGAUD R., MASSONET R. (1950). — Recherches sur les pigments caroténoïdes des Penaeidae. Examens spectrophotométriques. C. R. Soc. Biol. **144**, pp. 1025-1028.
- CHEVALIER A., BURG C., MANUEL S. (1949). — Sur le rôle du carotène dans l'oxydation des esters non saturés. Bull. Soc. Chim. Biol., **31**, p. 381.
- COSTES C. (1958). — Séparation et dosage des caroténoïdes foliaires par chromatographie sur cellulose. Ann. agron., **9**, pp. 35-48.
- COTTE J. (1925). — Au sujet d'une aberration de couleur chez *Maïa squinado*. Trav. Stat. Zool. Wimereux, **9**, pp. 36-42.
- DAMBOVICEANU A. (1932). — Composition chimique et physico-chimique du liquide cavitaire chez les Crustacés Décapodes (Physiologie de la calcification). Arch. Roum. Pathol. Exper. Microbiol., **5**, pp. 239-309.
- DEMEUSY N. (1953). — Comparaison biologique de deux populations de *Carcinus maenas* Pennant : mue de puberté. C. R. Ac. Sc., **236**, pp. 1203-1205.
- DEMEUSY N. (1958). — Recherches sur la mue de puberté du Décapode Brachyoure *Carcinus maenas* Linné. Arch. Zool. Exp. Gén., **95**, pp. 253-491.
- DEMEUSY N., LENEL R. (1954). — Effet de l'ablation des pédoncules oculaires sur la fréquence de la ponte chez *Carcinus maenas* Pennant. C. R. Soc. Biol., **148**, pp. 156-158.
- DEMEUSY N., VEILLET A. (1953). — Sur l'existence de deux populations de *Carcinus maenas* Pennant et sur les caractères morphologiques qui les distinguent. C. R. Ac. Sc., **236**, pp. 1088-1090.
- DOUIN R. (1953). — Analyse chromatographique sur papier des pigments chlorophylliens. Rev. Gén. Bot., **60**, pp. 777-796.
- DOUIN R. (1956). — Pigments chlorophylliens des Bryophytes. Caroténoïdes des Bryales. C. R. Ac. Sc., **243**, pp. 1051-1054.

- DRACH P. (1939). — Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes. Ann. Inst. Océan. Monaco, **19**, pp. 103-391.
- DRACH P. (1947). — Glande du sinus, mue et métabolisme chez les Crustacés. Conf. Sci. intern. Endocr. Arthropodes.
- DRILHON A. (1935). — Etude biochimique de la mue chez les Crustacés Brachyours (*Maia squinado*). Ann. Physiol. Physiochim. Biol., **11**, pp. 301-326.
- DUPRAW E. J. (1958). — Analysis of egg color variation in *Cyclops vernalis*. J. Morphol., **103**, pp. 31-63.
- DUSSART B., FRANCIS-BCEUF C. (1949). — Technique du dosage de l'oxygène dissous dans l'eau basée sur la méthode de Winkler. Circul. Centre Rech. Et. Océan., **1**, n° 1, 8 p.
- DUTRIEU J. (1959). — Les pigments d'*Artemia salina* L. Rapport entre la nature des pigments et le mode de reproduction des adultes. C. R. Ac. Sc., **248**, pp. 2522-2524.
- EDWARDS G. A. (1950). — The influence of eyestalk removal on the metabolism of the fiddler crab. Physiol. Comp., **2**, pp. 34-50.
- FABRE R., LEDERER E. (1933). — Note sur la présence de l'astacine chez les Crustacés. C. R. Soc. Biol., **113**, pp. 344-346.
- FABRE R., LEDERER E. (1934). — Contribution à l'étude des lipochromes des animaux. Bull. Soc. Chim. Biol., **16**, pp. 105-118.
- FIESER L. F. (1950). — Absorption spectra of carotenoids ; structure of Vitamin A₂. J. Org. Chem., **15**, pp. 930-943.
- FINGERMAN M. (1959). — The physiology of chromatophores. Intern. Rev. Cytol., **8**, pp. 175-210.
- FINGERMAN M., SANDEEN M. I., LOWE M. E. (1959). — Experimental analysis of the red chromatophore system of the prawn *Palaemonetes vulgaris*. Physiol. Zool., **32**, pp. 128-149.
- FISCHER E. (1926). — Sur l'absorption digestive chez les Crustacés Décapodes : Les pigments carotinoïdes. C. R. Soc. Biol., **95**, pp. 438-440.
- FISCHER E. (1927 a). — Sur les fonctions de l'hépatopancréas des Crustacés. Les pigments d'excrétions. C. R. Soc. Biol., **96**, pp. 850-852.
- FISCHER E. (1927 b). — Sur l'origine des pigments carotinoïdes du foie des Crustacés Décapodes. C. R. Soc. Biol., **97**, pp. 1459-1461.
- FISCHER E. (1928). — Sur les modifications d'un organisme (Crabe) envahi par un parasite (Sacculine). C. R. Soc. Biol., **98**, pp. 837-839.
- FISHER L. R., KON S. K., THOMPSON S. Y. (1952). — Vitamin A and carotenoids in certain invertebrates. I. Marine Crustacea. J. mar. biol. Ass. U. K., **31**, pp. 229-258.
- FISHER L. R., KON S. K., THOMPSON S. Y. (1953). — Vitamine A and carotenoids in some mediterranean Crustacea with a note on the swarming of Meganyctiphanes. Bull. Inst. Océan. Monaco, **50**, n° 1021, 19 p.
- FISHER L. R., KON S. K., THOMPSON S. Y. (1954). — Vitamin A and carotenoids in certain invertebrates. II. Studies of seasonal variations in some marine Crustacea. J. mar. Biol. Ass. U. K., **33**, pp. 589-612.
- FISHER L. R., KON S. K., THOMPSON S. Y. (1955). — Vitamin A and carotenoids in certain invertebrates. III. Euphausiacea. J. mar. biol. Ass. U. K., **34**, pp. 31-100.
- FISHER L. R., KON S. K., THOMPSON S. Y. (1956). — Vitamin A and carotenoids in certain invertebrates. IV. Mollusca : Loricata, Lamellibranchiata and Gastropoda. J. mar. biol. Ass. U. K., **35**, pp. 41-61.

- FISHER L. R., KON S. K., THOMPSON S. Y. (1957). — Vitamin A and carotenoids in certain invertebrates. VI. Crustacea : Penaeidea. J. mar. biol. Ass. U. K., **36**, pp. 501-507.
- FLOREY E. (1952). — Untersuchungen über die Natur der Farbwechsellormone der Crustaceen. Biol. Zentr. Bl., **71**, pp. 499-511.
- FLORKIN M. (1944). — Introduction à la biochimie générale, Masson, Paris.
- FOX D. L. (1947). — Carotenoid and indolic biochromes of animals. Ann. Rev. Biochem., **16**, pp. 443-470.
- FOX D. L. (1955). — Astaxanthin in the American flamingo. Nature, **175**, pp. 942-943.
- FOX D. L., HAXO F. T. (1959). — Pigments and algal commensalism in the blue oceanic Siphonophore *Velella lata*. Proc. XV th Intern. Congress Zool., London, pp. 280-282.
- FOX H. M. (1953). — Haemoglobin and biliverdin in parasitic cirripede Crustacea. Nature, **171**, pp. 162-163.
- FOX H. M. (1955). — The colours of animals. Endeavour, **14**, pp. 40-47.
- FRENTZ R. (1960). — Contribution à l'étude biochimique du milieu intérieur de *Carcinus maenas* Linné. Bull. Soc. Sci. Nancy, mém. 1, n° 2, 176 p.
- FRENTZ R., VEILLET A. (1953). — Teneur en lipides et déterminisme des caractères sexuels externes chez le Crabe *Carcinus maenas* Pennant, parasité par le Rhizocéphale *Sacculina carcini* Thompson. C. R. Ac. Sc., **236**, pp. 2168-2170.
- FROST R., SALOUM R., KLEINHOLZ L. H. (1951). — Effect of sinus gland and of eyestalk removal on rate oxygen consumption in *Astacus*. Anat. Rec., **111**, p. 572.
- FUCHS K. (1913). — Der Farbenwechsel und die chromatische Hautfunktion der Tiere. Handb. Vergl. Physiol., **3**, cité par LWOFF, 1927.
- GABE M. (1954). — La neuro-sécrétion chez les Invertébrés. Année Biol., **30**, pp. 5-62.
- GALSTON A. W. (1959). — Phototropism of stems, roots and coleoptiles. Encycl. Plant Physiol., **17**, part. 1, pp. 492-529.
- GARCIA I., GRANGAUD R. (1953). — Sur les pigments caroténoïdes de *Maja squinado*. C. R. Soc. Biol., **147**, pp. 433-434.
- GILCHRIST B. M., GREEN J. (1960). — The pigments of *Artemia*. Proc. roy. Soc., B, **152**, pp. 118-136.
- GOLDMAN A. S. (1953). — Synthesis of pigment during the reconstitution of *Tubularia*. Biol. Buil., **105**, pp. 450-465.
- GOLDMAN M., WELLS P. H. (1954). — Cray-fish reddening effect of Vertebrate adrenal cortical extract. Science, **120**, pp. 350-351.
- GOODWIN T. W. (1950). — Carotenoids and Reproduction. Biol. Rev., **25**, pp. 391-413.
- GOODWIN T. W. (1951). — Carotenoid metabolism during development of lobster eggs. Nature, **167**, p. 559.
- GOODWIN T. W. (1952 a). — The comparative biochemistry of the carotenoids. Chapman and Hall, London.
- GOODWIN T. W. (1952 b). — The biochemistry of locusts pigmentation. Biol. Rev., **27**, pp. 439-460.
- GOODWIN T. W. (1952 c). — The carotenoids of the Berries of *Lonicera japonica*. Biochem. J., **51**, pp. 458-463.

- GOODWIN T. W. (1952 d). — Studies in carotenogenesis. III. Identification of the minor polyene components of the fungus *Phycomyces blakesleeanus* and a study of their synthesis under various cultural conditions. *Biochem. J.*, **50**, pp. 550-558.
- GOODWIN T. W. (1955). — Carotenoids. *Annu. Rev. Biochem.*, **24**, pp. 497-522.
- GOODWIN T. W. (1960). — Biochemistry of pigments, dans « The physiology of Crustacea », **1**, pp. 101-140, ed. Waterman T. H., Academic Press, New-York.
- GOODWIN T. W., FOX D. L. (1955). — Some unusual carotenoids from two nudibranch slugs and a lamprid fish. *Nature*, **175**, pp. 1086-1087.
- GOODWIN T. W., SRISUKH S. (1949 a). — Some observations on astaxanthin distribution in marine crustacea. *Biochem. J.*, **45**, pp. 268-270.
- GOODWIN T. W., SRISUKH S. (1949 b). — The bio-chemistry of locusts. I. *Biochem. J.*, **45**, pp. 263-268.
- GOODWIN T. W., SRISUKH S. (1949 c). — The bio-chemistry of locusts. II. *Biochem. J.*, **45**, pp. 472-479.
- GOODWIN T. W., SRISUKH S. (1951). — Biochemistry of locusts. V. *Biochem. J.*, **48**, pp. 199-203.
- GRANGAUD R. (1951). — L'astaxanthine, nouveau facteur vitaminique A. *Actualités Biochim.*, n° 15, Masson, Paris.
- GRANGAUD R., CHARDENOT P. (1956). — Stéréoisomérisation cis-trans de l'astaxanthine. *C. R. Ac. Sc.*, **242**, pp. 1767-1769.
- GRANGAUD R., CHARDENOT P. (1957). — Coupure oxydante des esters de l'astaxanthine. *C. R. Ac. Sc.*, **244**, pp. 2983-2985.
- GRANGAUD R., CHECHAN C., MASSONET R. (1950). — Recherches sur les pigments caroténoïdes des Penaeidae. *C. R. Soc. Biol.*, **144**, pp. 1022-1024.
- GRANGAUD R., GARCIA I. (1952 a). — Chromatographie de partage des caroténoïdes. I. Séparation de l'astaxanthine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34**, pp. 754-760.
- GRANGAUD R., GARCIA I. (1952 b). — Application de la chromatographie sur papier à l'étude des pigments de la fleur de *Tecoma radicans* L. *C. R. Soc. Biol.*, **146**, pp. 1577-1579.
- GRANGAUD R., MASSONET R. (1954). — Activité antixérophtalmique des esters de l'astaxanthine. *C. R. Soc. Biol.*, **148**, pp. 1392-1394.
- GRANGAUD R., MASSONET R. (1955 a). — Recherches sur la biogenèse de la vitamine A des Poissons. I. L'astaxanthine, provitamine A pour *Gambusia holbrooki* Grd. *Arch. Sci. Physiol.*, **9**, pp. 245-256.
- GRANGAUD R., MASSONET R. (1955 b). — Conversion de l'astaxanthine en vitamine A chez *Gambusia holbrooki* Grd. *C. R. Ac. Sc.*, **241**, pp. 1087-1089.
- GRANGAUD R., MASSONET R., SANSAC A. (1954). — Activité antixérophtalmique du pigment caroténoïde de Pénéidés (*Aristeomorpha foliacea* Risso et *Aristeus antennatus* Risso). Technique de préparation des extraits actifs. *C. R. Soc. Biol.*, **148**, pp. 533-536.
- GRANGAUD R., VIGNAIS P., MASSONET R., MOATTI J. P. (1957). — Recherches sur la biogenèse de la vitamine A des Poissons. II. Néoformation des vitamines A₁ (Rétinol) et A₂ (Déhydrorétinol) chez *Gambusia Holbrooki* Grd. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **39**, pp. 1271-1278.
- GREEN J. (1957). — Carotenoids in *Daphnia*. *Proc. r. Soc.*, ser. B, **147**, pp. 392-401.
- GUYSELMAN B. J. (1953). — An analysis of the molting process in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Biol. Bull.*, **104**, pp. 115-137.
- HARVEY H. W. (1949). — Chimie et biologie de l'eau de mer, traduit par FRANCIS-BŒUF C. et LALOU C., Presses universitaires de France.

- HEILBRON I., COOK A. H. (1951). — Caroténoïdes et vitamine A - la fin d'un chapitre. *Endeavour*, **10**, n° 40, pp. 175-182.
- HEIM F. (1892). — Etudes sur le sang des Crustacés Décapodes suivies d'un essai sur le rôle des pigments. Thèse Sci. nat., Paris.
- HERISSET A. (1948). — Nouvelles recherches sur les propriétés anti-oxygènes de quelques caroténoïdes. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **30**, pp. 187-195.
- HERISSET A. (1954). — Influence du carotène sur les réactions catalysées in vitro par quelques déshydrases. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **36**, pp. 809-813.
- HIDAKA T. (1956). — Recherche sur le déterminisme hormonal de la coloration pupale chez les Lépidoptères. I. Les effets de la ligature, de l'ablation des ganglions et de l'incision des nerfs chez prépupes et larves âgées de quelques Papilionides. *Annot. Zool. Jap.*, **29**, pp. 69-74.
- HIGH E. G., SMITH H. C. Jr, TAYLOR H. H., WILSON S. S. (1954). — Antioxydant studies concerned with the metabolism of caroten and vitamin A. *J. Biol. Chem.*, **210**, pp. 681-686.
- ISLER O., GUTMANN H., MONTAVON M., RUEGG R., RYSER G., ZELLER P. (1957). — Synthesen in der Carotinoid-Reihe. X. Anwendung der Wittig-Reaktion zur Synthese von Estern des Bixinis und Crocetinis. *Helv. Chim. Acta*, **15**, pp. 1242-1249.
- ISLER O., ZELLER P. (1957). — Total syntheses of carotenoids, dans « Vitamins and Hormones », **15**, pp. 31-71, Academic Press, New-York.
- JENSEN A., JENSEN S. L. (1959). — Quantitative paper chromatography of carotenoids. *Acta Chem. Scand.*, **13**, pp. 1863-1868.
- JOLYET F., RENARD P. (1877). — Recherches sur la respiration des animaux aquatiques. *Arch. phys.*, **4**, p. 548.
- JUNGE H. (1941). — Über grüne Insektenfarbstoffe. *Hoppe Seyler's Ztschr. physiol. Chem.*, **268**, pp. 179-186.
- KARRER P. (1948). — Union Internationale de Chimie. Commission de nomenclature de chimie organique et commission de nomenclature de chimie biologique. I. Sur la nomenclature des caroténoïdes. II. Règles de nomenclature des caroténoïdes. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **30**, pp. 150-156.
- KARRER P. (1955). — Synthesis and stereochemistry of carotenoids. *J. Sci. Industr. Res.*, A, **14**, pp. 166-177.
- KARRER P. (1959). — Zur Entwicklung der Carotinoid-Chemie. *Angew. Chem.*, **71**, pp. 253-259.
- KARRER P., JUCKER E. (1948). — Carotinoide. Birkhauser, Basel (English Ed. 1950, trans. BRAUDE, Elsevier).
- KARRER P., WURGLER E. (1943). — Absorptionspektren einiger Carotenoide. *Helv. Chim. Acta*, **26**, pp. 116-121.
- KAYSER F., VILLOUTREIX J. (1960). — Absence d'influence de la modification de la caroténogenèse sur la croissance et la respiration de *Rhodotorula mucilaginosa*. *C. R. Soc. Biol.*, **154**, pp. 1264-1267.
- KLEINHOLZ L. H. (1947). — A method for removal of the sinus gland from the eyestalks of Crustaceans. *Biol. Bull.*, **93**, pp. 52-55.
- KNOWLES F. G. W., CARLISLE D. B. (1956). — Endocrine control in the Crustacea. *Biol. Rev.*, **31**, pp. 396-473.
- KON S. K. (1954). — Vitamine A des Invertébrés marins et métabolisme des caroténoïdes du plancton. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **36**, pp. 209-225.
- KUHN R., LEDERER E. (1931). — Fraktionierung und Isomerisierung des Carotins. *Naturwiss.*, **19**, p. 306.

- KUHN R., LEDERER E., (1933). — Uber die Farbstoffe des Hummers (*Astacus gammarus* L.) und ihre Stammsubstanz, das Astacin. Ber. Deutsch. Chem. Ges., **66**, pp. 488-495.
- KUHN R., LEDERER E., DEUTSCH A. (1933). — Astacin aus den Eiern der Seespinne (*Maja squinado*). Hoppe Seyler's Ztschr. physiol. Chem., **220**, pp. 229-234.
- KUHN R., SORENSEN N. A. (1938). — Ueber Astaxanthin und Ovoverdin. Ber. Deutsch. Chem. Ges., **71**, pp. 1879-1888.
- LEDERER E. (1935). — Caroténoïdes des animaux. Actualités scientifiques et industrielles, Hermann, Paris.
- LEDERER E. (1938 a). — Recherches sur les caroténoïdes des animaux inférieurs et des Cryptogames. Thèse Doct. Sci., Paris.
- LEDERER E. (1938 b). — Recherches sur les caroténoïdes des Invertébrés. Bull. Soc. Chim. Biol., **20**, pp. 567-610.
- LEDERER E. (1949). — Progrès récents de la chromatographie. 1^{re} partie : Chimie organique et biologique. Actualités scientifiques et industrielles. Hermann, Paris.
- LEDERER E. (1955). — Acquisitions récentes en chromatographie, pp. 43-65, dans « Mise au point de chimie analytique pure et appliquée et d'analyse bromatologique », Masson, Paris.
- LEDERER E., LEDERER M. (1953). — Chromatography. A review of principles and applications. Elsevier, New-York.
- LENEL R. (1953 a). — Nature des pigments caroténoïdes de *Carcinus maenas* Pennant. C. R. Ac. Sc., **236**, pp. 1090-1092.
- LENEL R. (1953 b). — Localisation et métabolisme des pigments caroténoïdes chez *Carcinus maenas* Pennant. C. R. Ac. Sc., **236**, pp. 1448-1450.
- LENEL R. (1954). — Sur l'absorption des pigments caroténoïdes du Crabe *Carcinus maenas* Pennant par son Parasite *Sacculina carcini* Thompson. C. R. Ac. Sc., **238**, pp. 948-949.
- LENEL R. (1955 a). — Complément à l'étude des pigments caroténoïdes de la carapace du Crabe *Carcinus maenas* Pennant. C. R. Ac. Sc., **240**, pp. 2020-2022.
- LENEL R. (1955 b). — Evolution des pigments caroténoïdes de l'hypoderme au cours de la formation des nouveaux téguments chez le Crabe *Carcinus maenas*. C. R. Ac. Sc., **241**, pp. 662-664.
- LENEL R. (1957). — Influence de l'ablation des pédoncules oculaires sur les pigments caroténoïdes de l'hypoderme du Crabe *Carcinus maenas*. C. R. Ac. Sc., **245**, pp. 746-748.
- LENEL R. (1959). — Effet de l'ablation des pédoncules oculaires sur les pigments caroténoïdes de l'hépto-pancréas chez *Carcinus maenas* Pennant. Proc. XVth Intern. Congr. Zool., London, pp. 491-492.
- LENEL R., VEILLET A. (1951). — Effets de l'ablation des pédoncules oculaires sur les pigments caroténoïdes du Crabe *Carcinus maenas*. C. R. Ac. Sc., **233**, pp. 1064-1065.
- LINDER H. J. (1959). — Studies on the fresh water fairy shrimp *Chirocephalopsis bundyi* (Forbes). I. Structure and histochemistry of the ovary and accessory reproductive tissues. J. Morphol., **104**, pp. 1-60.
- LIPPERT M. — Untersuchungen ueber Carotinoide. Inaug. Diss. Dokt. philos., Pitman Press, Zurich.
- LONNBERG E. (1931). — Untersuchungen über das Vorkommen carotinoider Stoffe bei marinen Evertebraten. Arch. Zool., **22**, pp. 1-49.

- LWOFF A. (1925). — Un carotinoïde, pigment oculaire de Copépodes. Son origine et son évolution pendant l'ontogénèse. C. R. Soc. Biol., **2**, pp. 1602-1604.
- LWOFF A. (1927). — Le cycle du pigment carotinoïde chez *Ithya furcata* (Baird). Bull. Biol. Fr. Belg., **61**, pp. 193-240.
- MACKINNEY G. (1952). — Carotenoids. Ann. Rev. Biochem., **21**, pp. 473-492.
- MAC MUNN C. A. (1883). — Observations on the colouring matters of the so called bile of invertebrates. Proc. Roy. Soc., **35**, p. 370.
- MALY R. (1881). — Ueber die Dotterpigment. Berichte Akad. Wiss. Wien, **83**, p. 1126.
- MANUNTA C. (1952). — Sul metabolismo dei pigmenti carotenoidi nella dorifora delle patate *Leptinotarsa decemlineata* Say. Atti Accad. nazion. Lincei, Rendic., Cl. sci. fis. mat. nat., **12**, pp. 759-767.
- MASSONET R. (1955). — Activité antixérophtalmique des chromoprotéides de Crustacés administrés au Rat blanc carencé en vitamine A. C. R. Soc. Biol., **149**, pp. 1971-1976.
- MASSONET R. (1958). — Recherches sur la biochimie de l'astaxanthine. Thèse Sci. nat. Lyon.
- MAYER F. (1943). — The chemistry of natural coloring matters, pp. 11-92. Reinhold Publishing Corp., New-York.
- MAYER R. (1957). — Über das Vorkommen von Astacin im Neonfisch. Hoppe Seyler's Ztschr. f. physiol. Chem., **307**, pp. 154-160.
- MEREJKOWSKY C. de (1881). — Sur la tétronerithrine dans le règne animal et sur son rôle physiologique. C. R. Ac. Sc., **93**, p. 1029.
- MEUNIER P., JOUANNETEAU J., ZWINGELSTEIN G. (1950). — Sur la coupure oxydante du β carotène en rétinène (axérophtol) par MnO_2 . C. R. Ac. Sc., **231**, p. 1170.
- MEUNIER P., JOUANNETEAU J., ZWINGELSTEIN G. (1951). — Sur l'isomérisation cis-trans des caroténoïdes en C_{40} , provoquée par adsorption sur des oxydes métalliques. Bull. Soc. Chim. Biol., **33**, p. 1228.
- MONROY A., MONROY-ODDO A., NICOLA M. de (1951). — The carotenoid pigments during early development of the egg of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. Exper. Cell Research, **2**, pp. 700-702.
- MOSELEY H. N. (1877). — On the colouring matter of various animals, Quat. J. micr. Sci., **17**, p. 12.
- NICOLA M. de (1954 a). — The carotenoids of the carapace of the echinoderm *Ophidiaster ophidianus*. Biochem. J., **56**, pp. 555-558.
- NICOLA M. de (1954 b). — Further investigations on the change in the pigment during embryonic development of Echinoderms. Exper. Cell Research, **7**, pp. 368-373.
- NICOLA M. de (1956). — Astaxanthin in asteroid echinoderms *Asterina panzeri*. Exper. Cell Research, **10**, pp. 441-446.
- NICOLA M. de, GOODWIN T. W. (1954 a). — The distribution of carotenoids in some marine invertebrates. Pubbl. Staz. Zool., Napoli, **25**, pp. 145-160.
- NICOLA M. de, GOODWIN T. W. (1954 b). — Carotenoids in the developing eggs of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. Exper. Cell Res., **7**, pp. 23-31.
- NICOLA M. de, MONROY-ODDO A. (1952). — The distribution of carotenoids in the eggs, ovaries, and testicles of *Paracentrotus lividus*. Experientia, **8**, p. 187.
- NISHIBORI K. (1954). — Studies on marine animal pigments. II. On the pigment-components from skins of Asteroidea. Bull. jap. Soc. sci. Fish., **20**, pp. 36-39.

- NUNEZ G. (1954). — Chromatographie de partage des substances liposolubles. II. Chromatographie sur papier des caroténoïdes. Bull. Soc. Chim. Biol., **36**, pp. 411-413.
- OHNISHI E. (1959). — Pigment composition in the pupal cuticles of two colour types of the swallowtails, *Papilio xuthus* L. and *Papilio protenor demetrius* Cramer. J. Insect Physiol., **3**, pp. 132-145.
- OKAY S. (1954). — Further investigations on colour change in Orthoptera. Communic. Fac. Sci. Univ. Ankara, Ser. C, **4**, pp. 31-43.
- PALMER L. S. (1922). — Carotenoids and related pigments. Am. Chem. Soc. Monograph Series n° 9, pp. 137-145, 288-289.
- PALMER L. S., ECKLES C. H. (1914). — Carotin the principal natural yellow pigment of milk fat. I. II. III. IV. J. Biol. Chem., **17**, pp. 191-210, 211-221, 223-236, 237-243.
- PANOUSE J. B. (1946). — Recherches sur les phénomènes humoraux chez les Crustacés. L'adaptation chromatique et la croissance ovarienne chez la Crevette *Leander serratus*. Ann. Inst. Océan. Monaco, **23**, pp. 65-147.
- PASSANO L. M. (1953). — Neurosecretory control of molting in crabe by the X-organ sinus gland complex. Physiol. Comp. Ecol., **3**, pp. 156-189.
- PETRACEK F. J., ZECHMEISTER L. (1956). — Determination of partition coefficients of carotenoids as a tool in pigment analysis. Anal. Chem., **28**, pp. 1484-1485.
- POUCHET G. (1872). — Note sur les rapides changements de coloration provoqués expérimentalement chez les Crustacés. C. R. Ac. Sc., **74**, pp. 757-760.
- RENAUD L. (1949). — Le cycle des réserves organiques chez les Crustacés Décapodes. Ann. Inst. Océan. Monaco, **24**, pp. 259-357.
- ROBSON G. C. (1911). — The effect of *Sacculina* on the fat metabolism of its host. Quat. J. micr. Sci., **57**, pp. 267-278.
- RUDLOFF O., VEILLET A. (1954). — Influence du Rhizocéphale *Septosaccus cue-noti* sur le métabolisme lipidique du Pagure *Diogenes pugilator*. C. R. Soc. Biol., **148**, pp. 1464-1467.
- SCHEER B. T. (1959). — The hormonal control of metabolism in Crustaceans. IX. Carbohydrate metabolism in the transition from intermoult to premoult in *Carcinides maenas*. Biol. Bull., **116**, pp. 175-183.
- SCUDAMORE H. H. (1947). — The influence of the sinus glands upon molting and associated changes in the crayfish. Physiol. Zool., **20**, pp. 187-208.
- SERVIGNE M., GUERIN de MONTGAREUIL P., PINTA M. (1951). — Fractionnement chromatographique et dosage de la vitamine A. Public. C.N.R.S., Paris.
- SMITH G. (1911). — Studies in the experimental analysis of sex. P. 7. Sexual changes in the blood and liver of *Carcinus maenas*. Quat. J. micr. Sci., **57**, pp. 251-265.
- SMITH G. (1913). — Studies in the experimental analysis of sex. P. 10. The effect of *Sacculina* of the storage of fat and glycogen on the formation of pigment by its host. Quat. J. micr. Sci., **59**, pp. 267-295.
- SOIN S. G. (1956). — Le rôle respiratoire du pigment caroténoïde dans les œufs des Salmonidés et d'autres Clupéiformes, (en russe). Zool. Zh., S.S.S.R., **35**, pp. 1362-1369.
- SPOTTEL W. (1914). — Über die Farben der Vogelfedern. II. Die Färbung der *Columba livia* nebst Beobachtungen über die mechanischen Bauverhältnisse der Vogelfedern. Zool. Jahrb. Anat. Ontog., **38**, pp. 357-426.
- STEVEN D. M. (1947). — Carotenoid pigmentation of Trout. Nature, **160**, pp. 540-541.

- STEVEN D. M. (1948). — Studies on animal carotenoids. I Carotenoids of the brown trout (*Salmo trutta* Linn.) J. exper. Biol., **25**, pp. 369-387.
- STEVEN D. M. (1949). — Studies on animal carotenoids. II. Carotenoids in the reproductive cycle of the brown trout. J. exper. Biol., **26**, pp. 295-303.
- STRAIN H. H. (1949). — Chromatographic separations. Anal. Chem., **21**, p. 75.
- TAPPI G., MENZIANI E. (1955). — Sui carotenoidi di *Strelitzia reginae*. Gazz. chim. ital., **85**, pp. 720-724.
- TEISSIER G. (1925). — Changements de coloration des embryons de *Clava squamata* au cours de l'ontogenèse. Interprétation chimique et physiologique. Trav. Stat. Zool. Wimereux, **9**, pp. 233-238.
- TEISSIER G. (1932). — Origine et nature du pigment caroténoïde des œufs de *Daphnia pulex* (de Geer). C. R. Soc. Biol., **109**, p. 813.
- TSWETT M. S. (1910). — Chromofilli w rastitelnom i schivotnom mirje. Varsovie, cité par LEDERER E., LEDERER M., 1953.
- VEGEZZI G. (1916). — Recherches sur quelques pigments des Invertébrés. Thèse Doct. Sci., Fribourg.
- VEILLET A. (1945). — Recherches sur le parasitisme des Crabes et des Galathées par les Rhizocéphales et les Epicarides. Ann. Inst. Océan. Monaco, **22**, pp. 193-341.
- VEILLET A., DEMEUSY N. (1951). — Utilisation des matières plastiques dans les installations d'élevage d'animaux marins. Bull. Inst. Océan. Monaco, **48**, n° 987.
- VERNE J. (1921). — Les pigments tégumentaires des Crustacés Décapodes. Introduction à l'étude histochimique des pigments animaux. Thèse Doct. Sci., Paris.
- VERNE J. (1923 a). — Essai histochimique sur les pigments tégumentaires des Crustacés Décapodes. Arch. Morph. Gén. Exp., fasc. 16, pp. 1-168.
- VERNE J. (1923 b). — Les pigments rouges et la formation d'hémoglobine chez les Daphnies. Bull. Soc. Zool. Fr., **48**, pp. 140-144.
- VERNE J. (1926 a). — Les pigments dans l'organisme animal. Doin, Paris.
- VERNE J. (1926 b). — Cristallisation du carotène dans les téguments des Crustacés Décapodes. C. R. Soc. Biol., **94**, pp. 1349-1350.
- VERNE J. (1927). — Caroténoïdes d'origine endogène et d'origine exogène dans la carapace de *Carcinus maenas*. C. R. Soc. Biol., **97**, pp. 1290-1292.
- VEVERS H. G., MILLOTT N. (1956). — Use of plastic tubing in chromatography Nature, **178**, p. 1132.
- VEVERS H. G., MILLOTT N. (1957). — Carotenoid pigments in the integument of the starfish *Marthasterias glacialis* L. Proc. Zool. Soc., **129**, pp. 75-80.
- VEVERS H. G., PHIL D. (1952). — The biology of *Asterias rubens* L. III. Carotenoid pigments in the integument. J. mar. biol. Ass. U. K., **30**, pp. 569-574.
- VILLOUTREIX J. (1960). — Sur les caroténoïdes d'une levure rouge : *Rhodotula mucilaginosa* (Jorg.) Harrison. Thèse Doct. Sci., Nancy.
- VITZOU A. N. (1882). — Recherches sur la structure et la formation des téguments chez les Crustacés Décapodes. Arch. Zool. Exp., **10**, pp. 451-576.
- WAGNER K. H. (1939). — Vitamine A und Carotin des Finn-, Blau- und Spermwals. Johann Ambrosius Barth, Leipzig.
- WALD G. (1943). — The photoreceptor functions of the carotenoids and vitamins A, dans « Vitamins and Hormones », **1**, pp. 195-228, Academic Press, New-York.
- WALD G., NATHANSON N., JENCKS W. P., TARR E. (1948). — Crustacyanin, the blue carotenoid-protein of the lobster shell. Biol. Bull., **95**, pp. 249-250.

- WALLCAVE L., ZECHMEISTER L. (1953). — Conversion of Dehydro- β -carotène, via its Boron Trifluoride Complex, into an Isomer of Cryptoxanthin. J. Am. Chem. Soc., **75**, pp. 4495-4498.
- WEBER M. (1880). — Über den Bau und die Thätigkeit der sogenannten Leber der Crustaceen. Arch. mikrosk. Anat., **17**, p. 385.
- WILLIAMS R. J., KIRBY H. (1948). — Paper chromatography using capillary ascent. Science, **107**, p. 481.
- WILLSTATTER R., STOLL A. (1913). — Untersuchungen über Chlorophyll. Methoden und Ergebnisse. J. Springer, Berlin.
- WITTMANN H. (1957). — Untersuchungen ueber die Veränderung der Carotinoidkomponenten von *Rhodotorula rubra* in Abhängigkeit von Ernährungsbedingungen. Arch. Mikrobiol., **25**, pp. 373-391.
- ZECHMEISTER L. (1934). — Carotinoide. J. Springer, Berlin.
- ZOPF W. (1893). — Ueber Produktion von carotinartigen Farbstoffen bei niederen Tieren. Beitr. phys. Morph. Nied. Org., **3**, p. 26.
-

TABLEAUX

TABLEAU I
 PIGMENTS CAROTENOÏDES
 EXTRAITS DU CRABE CARCINUS MAENAS

Description	Propriétés de partage entre éther de pétrole et méthanol 90°		Adsorbants P L = Prolabo M = Merck	Eluants	Spectre d'absorption (en m μ) ∫ = inflexion	Identification
	avant saponification	après saponification				
Jaune dans l'éther de pétrole	épiphasique	épiphasique	Al ₂ O ₃ PL 5 % CO ₃ Ca Al ₂ O ₃ M.I	pas adsorbé en solution dans éther de pétrole pas adsorbé en solution dans éther de pétrole bande jaune orange élue par éther de pétrole pur	∫ 425, 450, 477 dans hexane ∫ 450, 485, 520 dans CS ₂	β carotène
Jaune légèrement orange dans l'éther de pétrole et sur colonne d'Al ₂ O ₃	épiphasique	épiphasique	Al ₂ O ₃ PL 5 % CO ₃ Ca	éther de pétrole pur éther de pétrole pur	∫ 425, 450, 476 dans hexane ∫ 455, 483, 510 dans CS ₂	mono-hydroxy-β carotène = cryptoxanthine
Jaune dans l'éther de pétrole et sur colonne d'Al ₂ O ₃	épiphasique	hypophasique	Al ₂ O ₃ PL 5 % faiblement adsorbé SO ₄ Na ₂ hydraté	éther de pétrole pur avant saponification	∫ 400, 422, 447 dans éther de pétrole 451, 477 dans CS ₂ 433, 458 dans CHCl ₃ ∫ 408, 431, 456 dans benzène	ester de poly-hydroxy-xanthophylle = carinoxanthine (?) (flavoxanthine ?)
Jaune orange dans l'éther de pétrole et sur colonne d'Al ₂ O ₃	épiphasique	hypophasique	Al ₂ O ₃ PL 5 %	éther de pétrole + 1 % méthanol "	423, 445, 473 dans éther de pétrole ∫ 430, 456, 484 dans CHCl ₃	ester de xanthophylle (lutéine)
Jaune dans l'éther de pétrole et sur colonne d'Al ₂ O ₃	hypophasique	hypophasique	Al ₂ O ₃ PL 5 % Al ₂ O ₃ M.I	éther de pétrole + 1 % méthanol éther de pétrole saturé de méthanol	423, 445, 473 dans éther de pétrole 422, 445, 473 dans méthanol ∫ 429, 456, 485 dans CHCl ₃ 445, 475, 506 dans CS ₂	xanthophylle libre (lutéine)
Rose orange sur colonne d'Al ₂ O ₃	épiphasique	hypophasique (en majeure partie)	Al ₂ O ₃ PL 5 %	éther de pétrole + 1 % méthanol avant saponification éther de pétrole + 10 % CH ₃ COOH après saponification	unique à 452-458 dans éther de pétrole	ester de mono-hydroxy-mono-céto-caroténoïde (?)
Orange dans l'éther de pétrole	épiphasique	→ astacine hypophasique	Al ₂ O ₃ M.I	éther de pétrole + 1 à 10 % méthanol	variable entre 455 à 470 dans éther de pétrole	esters de trans- et de cis-astaxanthine
rouge dans la pyridine; rose orange sur colonne d'Al ₂ O ₃	hypophasique	→ astacine hypophasique	Al ₂ O ₃ PL 5 % Al ₂ O ₃ M.I	éther de pétrole + 1 % méthanol éther de pétrole + 10 % CH ₃ COOH	470 dans éther de pétrole 492 dans pyridine	astaxanthine libre (chromoprotéides dans certains cas)
Rose orange dans l'éther de pétrole; rouge sang dans la pyridine	hypophasique	hypophasique	fortement adsorbé sur toutes Al ₂ O ₃	méthanol + 5 % KOH	500 dans la pyridine	Astacine

TABLEAU II

SCHEMA THEORIQUE DE LA SEPARATION DES PIGMENTS CAROTENOIDES
D'UNE SOLUTION ETHERO-PETROLIQUE EXTRAITE D'UN CRABE ENTIER

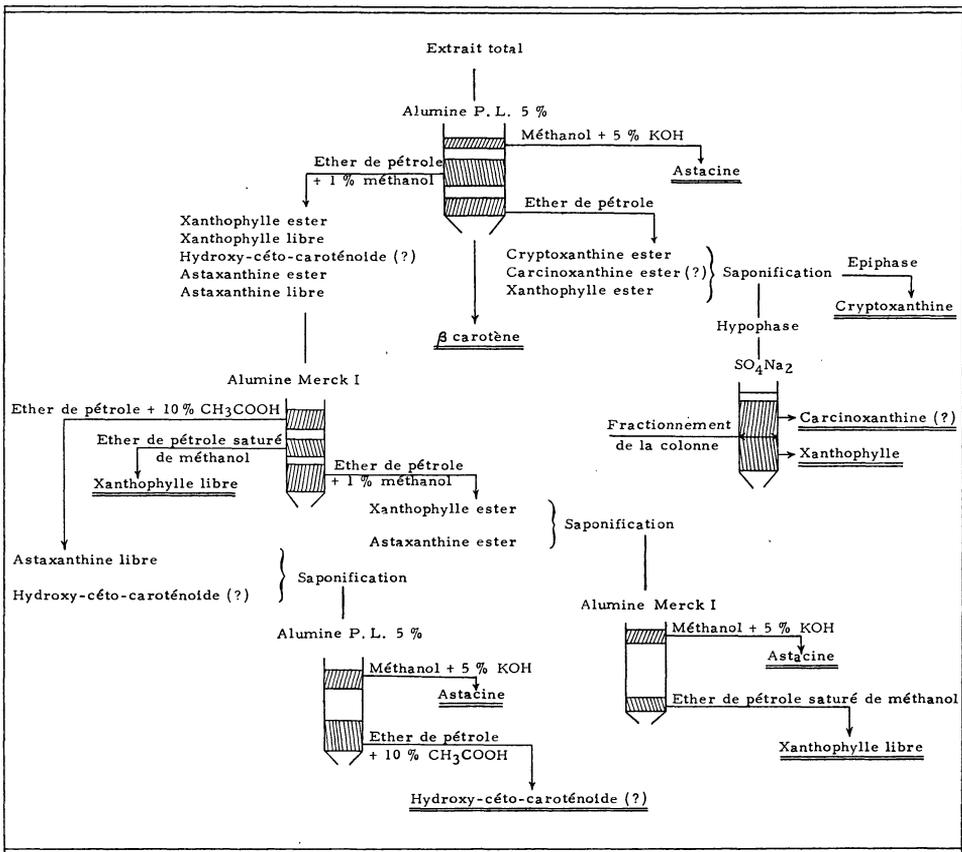


TABLEAU III
RÉPARTITION DES PIGMENTS CAROTÉNOÏDES DANS L'ANIMAL

Nature des pigments	ORIGINE DES PIGMENTS							
	Carapace	Exuvie	Hypo-derme	Nouveaux téguments (1)	Hémo-lymphes	Hépatopan-créas	Excréments et contenu digestif	Ovaires ceufs
β carotène		—	+		+	+	+	+
Cryptoxanthine			+	+	+	+		+
Carcinoxanthine (?)			+	+				
Xanthophylle ester			+	+				
Xanthophylle libre	+	+		+	+	+	+	+
Hydroxy-céto-caroténoïde			+	+				+
Astaxanthine ester (isomères)			+	+		+		
Astaxanthine libre	+	+			+	+	+	+
Chromoprotéide	+	+		+				

(1) Répartition variable suivant les cas.

TABLEAU V

ETUDE COMPARATIVE DE LA PIGMENTATION DE L'OVAIRE,
DE L'HEPATO-PANCREAS ET DE L'HEMOLYMPHE CHEZ LES FEMELLES,
EN RAPPORT AVEC LA MATURATION DES GONADES

Stade	Ovaires		Hépto-pancréas	Hémolymphe	Nombre de cas	
	Degré de développement	Pigmentation				
C ₃ , début C ₄	oocytes peu développés	blancs	blanc à jaune-brun : ou brun violacé	variable d'incolore à jaune	77	
Début C ₄	début de vitellogénèse : oocytes petits bien visibles	jaunâtres à légèrement rosés	blanc à jaune-brun : ou brun violacé	variable d'incolore à jaune	40	
C ₄	vitellogénèse	oocytes petits très visibles	jaunes	jaune	jaune	11
		oocytes moyens	jaune d'or à jaune-orange	jaune d'or	jaune-orange	15
		oocytes assez gros	orange	très jaune		21
		oocytes gros	orange vif	jaune		25
		oocytes très gros bien développés	très orange vif	jaune clair	variable d'incolore à jaune, orange ou rose	13
		oocytes proches de la ponte	orange-rouge	jaune pâle ou jaune gris jaune brun (kaki) brun-bistre	Le plus souvent jaune incolores = 35 colorés = 142	34 12
C ₄	début d'ovogénèse	pas d'oocytes visibles	blancs transparents	jaune pâle	jaune	9
				blanc-crème	jaune	17
	fin d'ovogénèse	oocytes très peu développés	blancs	brun	incolore incolore	10 17
				jaune	jaune	8
Fin de C ₄	après l'éclosion : s'il y a eu vitellogénèse et ponte	oocytes peu développés	blancs	jaune à jaune-orange	incolore jaune	20 17
				jaune ou blanc	jaune	6
D ₃ D ₄		oocytes peu développés	blancs	blanc jaune	jaune-orange incolore rose-orange	3 5 12
C ₄		oocytes gros très développés	blancs	légèrement jaune	incolore	1
		Cas aberrant				

Remarque : Les divisions ci-dessus sont conventionnelles et schématiques. Cette classification artificielle est cependant nécessaire à la netteté et à la compréhension de l'exposé.

TABLEAU VI

POURCENTAGE DES HÉMOLYMPHES
 COLORÉES ET INCOLORES CHEZ LE δ
 EN FONCTION DU CYCLE D'INTERMUE

Stades	Hémolymphe colorée	Hémolymphe incolore
A-B	4 cas exceptionnels (rose)	théoriquement 100 %
C ₁ -C ₂	84,6 % (rose)	15,4 %
C ₃	27,8 % (jaune)	72,2 %
C ₄	49,20 % (généralement jaune)	50,80 %
D	73,10 % (rose)	26,90 %

TABLEAU VII

OBSERVATION DE LA PIGMENTATION DE L'HÉMOLYMPHE
CHEZ DES ♀ EN VITELLOGENÈSE, PAR PRÉLÈVEMENTS SUCCESSIFS

Date des pré- levements	♀ ayant mué le 8 Juin (A ♂ 1)	♀ ayant mué le 24 Juin (A ♂ 2)	♀ ayant mué le 29 Juin (A ♂ 4)	♀ ayant mué le 7 Juin (A ♂ 6)	♀ ayant mué le 25 Juin (C ♂ 6)
29-6-1953	nettement jaune	légèrement rose violet	incolore	légèrement jaune	incolore
30-6-1953	—	—	légèrement rose	—	—
1-7-1953	jaune orange	incolore	jaunâtre	jaune	légèrement rose
3-7-1953	orange	jaunâtre	jaune	jaune	incolore
6-7-1953	orange	légèrement jaune	jaune orange	orange	incolore
10-7-1953	orange	jaune	jaune orange	orange	jaunâtre
14-7-1953	très orange	orange	jaune orange	très orange	légèrement jaune
17-7-1953	—	très orange (à la mort)	orange (à la mort)	très orange (à la mort)	—
22-7-1953	orange				jaune orange
4-8-1953	orange rosé (à la mort)				jaune orange (à la mort)

TABLEAU VIII
EFFETS DU REGIME CARENCE EN PIGMENTS CAROTENOIDES
EN RAPPORT AVEC LE NOMBRE DES MUES

Nombre de mues	Sexe	N° d'ordre	Nbre de jours de régime	Hépto-pancréas	Gonades	Téguments (carapace - hypoderme)	Divers
Pas de mue	♂	D ₃ a	13	jaune		Sans modification, chromatophores orange et rouges.	-
		D ₃ b	50	blanc		Nombreux chromatophores rouges.	-
		B ₅ a	62	blanc		Carapace grise devenue orange.	Quantitatif total = 39,65 µg/g;
		D ₃ c	62	blanc		chromatophores rouges.	β carotène = 0 µg/g;
		D ₂ a	122	blanc		-	-
		D ₂ a	122	blanc		Carapace verte devenue orange clair. Nombreux chromatophores rouges.	-
mue	♀	D ₂ b	14	beige clair	Légèrement orange. oocytes moyens = vitellogénèse. Impubère.	Nombreux chromatophores jaunes et rouges.	1 prélèvement d'hémolymphe jaune, puis 8 autres toujours orange.
		D ₄ b	20	jaune		Chromatophores jaunes et rouges.	-
		D ₄ a	22	légèrement crème beige	Jaune, début de vitellogénèse. Impubère.	Pigmentation inchangée de la carapace.	-
		D ₆ b	102			Carapace verte devenue vert brunâtre.	-
Début du régime	♂	A ₆ a	30	blanc		Carapace beige devenue orange, chromatophores orange.	-
		A ₅ a	120	légèrement brun		Carapace inchangée mais les membranes articulaires sont devenues légèrement orange; chromatophores orange et rouges.	-
		A ₃ a	120	légèrement brun		Nombreux chromatophores orange.	-
immédiatement	♀	A ₃ b	25	brun kaki	Beiges, oocytes peu développés, début de vitellogénèse.	Pigmentation inchangée de la carapace verte.	Excréments rouges 6 jours après la mue, puis rouille; puis blancs 22 jours après la mue. Hémolymphe toujours jaunâtre.
après la mue	♀	A ₂ a	135	légèrement brun	Beiges, oocytes moyens.	Pigmentation inchangée de la carapace verte; chromatophores orange et rouges.	Excréments jaunes 5 jours après la mue, puis blancs; 17 jours après la mue; hémolymphe jaune 5 jours après la mue puis incolore; 17 jours après la mue

Voir suite au verso

TABLEAU VIII (suite)

		D ₂ c	33	blanc		Carapace verte devenue vert grisâtre.	
	♂	D ₆ a	60	blanc		Pigmentation inchangée de la carapace verte.	Liquide digestif jaune kaki; Quantitatif total = 20,5 µg/g; β-carotène = 17 µg/g
		D ₄ c	20	blanc gris	Blanches, oocytes peu visibles.	Chromatophores orange et rouges.	
		D ₁ a	80	blanc	Oocytes blancs assez développés.	Carapace jaune verdâtre devenue vert clair; chromatophores orange et rouges.	Hémolymphe orange clair au début du régime puis orange 3 jours après; oran- ge-rose 7 jours après puis incoloré jusqu'à la mue 12 jours après; ensuite tou- jours incolore durant 5 pri- ses dont la dernière à la mort de l'animal 66 jours après la mue.
1 mue	♀	A ₄ a	110	blanc	Ponte d'oeufs blancs 1 mois après la mue; stade morula.	De verte, devenue bleu- vert; 1 patte régénérée est blanche.	Quantitatif total = 14,52 µg/g; β-carotène = 0 µg/g; Avait mué une 1ère fois au début du régime.
		B ₂ a	140	blanc	Ponte d'oeufs blancs après la mue; pas d'oocytes visi- bles à la mort.	De grise, devenue bleu; chromatophores orange et rouges.	Quantitatif sur oeufs = 0 µg/g
		B ₄ a	150	blanc	Ponte jaune orange avant la mue; ovaires blancs à la mort.	De grise, devenue bleu; chromatophores orange et roses.	
	♂	B ₆ a	45	blanc gris		De verte, la carapace est devenue presque entière- ment blanche.	Quantitatif total = 3,4 µg/g; β-carotène = 0 µg/g
		D ₁ b	70	blanc	Blanches, oocytes peu développés.	De verte, devenue grise; quelques chromatophores orange.	
2 mues	♀	A ₄ c	135	blanc	Blanches, oocytes bien développés.	Verte, devenue blanc laiteux quelques rares chromatophores orange.	
		D ₄ d	150	blanc	Blanches, oocytes peu développés.	Jaune verdâtre devenue bleu; chromatophores orange.	Quantitatif total = 2,8 µg/g; β-carotène = 0 µg/g; hémolymphe toujours incol- ore entre les deux mues
		D ₅ b	105	blanc gris		Verte, devenue gris jaunâtre; chromatophores orange.	
3 mues	♂	B ₄ b	120	blanc		Verte, devenue blanc gris.	Etait encore verdâtre avec des taches grises à la 2e mue.
		D ₁ c	165	blanc		Verte, devenue blanche; chromatophores rouges.	2 pattes régénérées à la 2e mue sont blanches; on y trou- ve des chromatophores blancs et noirs mais pas de rouges.
	♂	B ₅ b	164	blanc		Verte, devenue grise; rares chromatophores rouges.	Quantitatif sur exuvies : Quantitatif total = 14 µg/g; β-carotène = 0 µg/g
4 mues	♀	B ₂ b	150	blanc	Blanches, oocytes moyens.	Verte et brune, devenue grise; on ne voit pas de chromatophores rouges, mais la solution acétonique est très légèrement jaunâ- tre.	Quantitatif sur exuvies : Quantitatif total = 1,2 µg/g; β-carotène = 0 µg/g

Pour quantitatifs sur exuvies, voir page 62.

TABLEAU IX

EFFETS DE L'ABLATION DES PÉDONCULES OCULAIRES
 SUR LA QUANTITÉ DE CAROTÉNOIDES
 DANS L'HÉPATO-PANCRÉAS DES MALES.
 COMPARAISON AVEC LES TÉMOINS NORMAUX

Crabes normaux			Crabes opérés		
n° d'ordre	β carotène (μ g/g)	autres pigments (μ g/g)	n° d'ordre	β carotène (μ g/g)	autres pigments (μ g/g)
13 A	35,82	2,96	13 B	0,83	2,25
b 4	70,00	4,20	b 5	4,55	—
d 1	30,95	4,06	b 3	17,41	2,36
d 5	29,10	3,40	d 2	1,48	2,03
b 1	46,87	4,16	b 2	2,84	1,00
d 4	82,85	4,76	d 3	18,92	1,20
1 b	42,10	—	c 2	5,57	0,73
2 b	62,25	—	c 3	19,00	1,70
1 d	31,00	—	1 a	10,16	—
2 d	56,58	—	2 a	9,60	—
1 f	40,04	—	1 c	15,13	—
2 f	55,90	—	2 c	12,56	—
			1 e	2,28	—
			2 e	3,10	—

TABLEAU X

RELATIONS ENTRE CERTAINS STADES DU CYCLE D'INTERMUE
ET LES PIGMENTS CAROTÉNOIDES DES NOUVEAUX TÉGUMENTS

N° d'ordre	Stade	Pigments des nouveaux téguments	Comparaison avec les pigments des autres assises tégumentaires du même animal
46	D ₂	« Carcinoxanthine » ester, xanthophylle ester, isomère d'astaxanthine ester.	= pigments de l'hypoderme.
55	D ₂	« Carcinoxanthine » ester, xanthophylle ester, hydroxy-céto-caroténoïde ester, isomère d'astaxanthine ester.	= pigments de l'hypoderme.
59	D ₂	« Carcinoxanthine » ester, xanthophylle ester, xanthophylle libre, isomère d'astaxanthine ester, astaxanthine libre.	= pigments de l'hypoderme + pigments de la carapace.
49	D ₃ - D ₄	« Carcinoxanthine » ester, xanthophylle ester, isomère d'astaxanthine ester, astaxanthine libre.	= pigments de l'hypoderme + un pigment de la carapace.
67	A ₁	Cryptoxanthine ester, xanthophylle ester, xanthophylle libre, isomère d'astaxanthine ester, astaxanthine libre.	= certains pigments de l'hypoderme + pigments de la carapace.
66	A ₁	Cryptoxanthine ester, xanthophylle libre, astaxanthine libre.	= pigments de la carapace + un pigment de l'hypoderme.
47	A ₂	Xanthophylle libre, astaxanthine libre.	= pigments de la carapace.
50	B	Xanthophylle libre, astaxanthine libre.	= pigments de la carapace.
54	B	Xanthophylle libre, astaxanthine libre.	= pigments de la carapace.
53	C ₁	Xanthophylle libre, astaxanthine libre.	= pigments de la carapace.