

LES ENZYMES HYDROLYTIQUES DU SYSTÈME DIGESTIF CHEZ LES CRUSTACÉS PAGURIDES.

par

Chantai Arnould et Charles Jeuniaux

Université de Liège, Institut Ed. Van Beneden, Laboratoire de Morphologie,
Systématique et Ecologie animales (1)

Résumé

L'activité enzymatique de vingt-trois types d'hydrolases (oligo- et polysaccharidases, estérases, protéases) a été décelée et localisée au sein du système digestif de six espèces de Crustacés Pagurides, notamment au moyen de méthodes histoenzymologiques.

La sécrétion des hydrolases digestives s'effectue à différents niveaux du tube digestif, non seulement dans la glande digestive médio-intestinale, qui est le siège principal de la sécrétion enzymatique, mais aussi dans l'épithélium stomacal et même dans la muqueuse intestinale.

Diverses activités enzymatiques ont été mises en évidence dans le revêtement cuticulaire de l'estomac, notamment dans les dents du moulin gastrique. Le rôle possible de ces structures dans la fourniture d'enzymes digestives pendant la digestion stomacale est envisagée.

Introduction

La physiologie digestive des Crustacés est encore relativement mal connue. Les travaux ne concernent que quelques espèces, principalement l'écrevisse et le homard. Les recherches concernant notamment les Pagurides sont fort rares et de caractère fragmentaire.

Il est généralement admis que les Pagures marins sont omnivores (Jackson, 1913 ; Orton, 1927 ; Marschall *et al.*, 1960 ; Samuelson, 1970). Ces animaux se nourrissent habituellement de cadavres et de débris végétaux mais ils ne dédaignent pas les petites proies vivantes telles que Bivalves, Crustacés et Polychètes. Selon Mc Ginitie (1937) et Thorson (1966), une autre source alimentaire, non négligeable si elle n'est pas la plus importante, serait représentée par les détritus organiques accumulés dans les sédiments. Certaines observations permettent de penser que ces pagures pourraient également se sustenter de plancton (Brightwell, 1951 ; Mc Ginitie, 1968 ; Gerlach *et al.*, 1976).

Quant aux Cénobites, pagures terrestres des plages tropicales, ils sont habituellement considérés comme franchement herbivores

(1) Quai Van Beneden, 22, B-4020 Liège (Belgique).

et même frugivores. Cependant, nous avons constaté qu'élevés en terrarium, ces Crustacés apprécient l'alimentation carnée et sont avides de petits Crustacés (type daphnie, artémia...).

Il semble donc que les Pagurides peuvent s'alimenter de diverses manières et, de la sorte, utiliser de façon optimale les ressources alimentaires disponibles dans leur environnement. Toutefois, pour déterminer dans quelle mesure les Pagurides peuvent réellement tirer profit d'une alimentation apparemment opportuniste, il est indispensable de connaître l'équipement enzymatique de leur système digestif.

Dans ce travail, 23 types d'activité enzymatique de nature hydrolytique ont été recherchés et localisés au niveau du tube digestif chez six espèces de pagures. La détection des enzymes a été réalisée d'une part au moyen de techniques biochimiques classiques, d'autre part à l'aide de méthodes histoenzymologiques dont plusieurs sont originales.

Matériel biologique

Les exemplaires de *Pagurus bernhardus* ont été ramassés à la côte belge dans les environs d'Ostende.

Les autres pagures marins, en l'occurrence *Pagurus cuanensis*, *P. anachoretus*, *Dardanus arrosor*, *Paguristes oculatus* et *Calcinus ornatus* ont été récoltés en plongée de nuit aux abords de la Station Océanographique Stareso de l'Université de Liège à Calvi (Corse, France).

Les cénobites (*Coenobita* sp.) ont été achetés dans le commerce à Liège.

Méthodes

1. Dosages enzymatiques

Les dosages enzymatiques par les méthodes biochimiques classiques ont porté sur quatre types de polysaccharidases.

a) Préparation des extraits enzymatiques

Les organes, prélevés sur le vivant, ont été pesés puis broyés dans un mortier en présence de quartz et d'eau distillée. L'extraction a été réalisée à 4 °C pendant 24 heures. Après centrifugation, les extraits enzymatiques ont été amenés, par addition d'eau distillée, à un volume tel que la proportion en tissu frais soit d'environ 100 mg/ml.

b) Techniques de dosage

Les activités enzymatiques du type laminarinase et cellulase ont été mesurées selon la méthode décrite par Piavaux *et al.* (1972), basée sur le dosage à la notatine du glucose libéré (Liebecq *et al.* 1960). Les substrats utilisés étaient respectivement de la laminarine insoluble (NBCo) et de la carboxyméthylcellulose sodique Cellofas B 10 (Imperial Chemical Industries). Les incubations ont été réalisées à

37 °C en milieu tamponné à pH 5,1 pour la laminarinase, à pH 5,2 pour la cellulase.

Pour l'amylase, la méthode de dosage de Bernfeld a été appliquée en utilisant toutefois du glycogène (Merck) comme substrat (Dandri-fosse, 1977).

L'activité chitinolytique a été dosée selon la méthode de Jeuniaux (1963, 1965) en utilisant comme substrat de la chitine pulvérisée d'os de seiche et en incubant à pH 5,2 et 37 °C.

2. Techniques histoenzymologiques

Au moyen de techniques histoenzymologiques, vingt-trois activités hydrolytiques différentes ont été recherchées et localisées. Ces méthodes ne permettent pas uniquement la localisation précise de l'origine des hydrolases observées ; elles permettent également, sous certaines conditions, d'apprécier leur degré d'activité. On peut, en effet, tenir compte, dans le cas des méthodes d'empreinte, de l'intensité de la lyse du substrat en fonction de la durée d'incubation et, dans le cas des méthodes de précipitation, de l'intensité de la réaction colorée qui se développe au cours de l'incubation. Cette évaluation de l'intensité relative de l'activité enzymatique a été traduite dans les tableaux 2 et 3 par un système de signes +.

La mise en évidence des polysaccharidases suivantes : amylase, cellulase, laminarinase et chitinase a été réalisée selon les méthodes d'empreinte détaillées dans une publication précédente (Arnould *et al.*, 1978). Les substrats utilisés sont respectivement de l'amidon hydrolysé (Connaught Medical Research Laboratories, Toronto, Canada), de la carboxyméthylcellulose sodique (Cellofas B 10, ICI), de la laminarine insoluble (NBCo) et de la carboxyméthylchitine sodique, préparée au laboratoire d'après le procédé de Trujillo (1968).

Les hydrolases du type alginase et licheninase ont été recherchées suivant la méthode utilisée pour la laminarinase mais en utilisant comme substrat respectivement de l'alginate sodique (The British Drug Houses) et de la lichenine (Koch-Light).

L'activité protéolytique a été détectée en utilisant un film de gélatine pré-coloré suivant la technique de Michel *et al.* (1975). Toutefois, dans le but d'améliorer la visualisation de la réaction d'hydrolyse, les préparations, après incubation, ont été post-colorées. Cette coloration est double : elle consiste en un passage pendant cinq minutes dans un bain de vert de méthyle suivi, après lavage, d'une immersion durant cinq minutes dans la laque aluminique de rouge nucléaire solide.

La méthode de post-couplage préconisé par Rutenburg *et al.* (1958) pour la β -galactosidase a été suivie pour la mise en évidence des α -et β -galactosidases. Les α -et β -glucosidases, l' α -mannosidase et la β -xylosidase ont été recherchées suivant le procédé de détection utilisé pour l' α -glucosidase (Rutenburg *et al.*, 1960). L'activité de la β -N-acétylglucosaminidase a été mise en évidence suivant la méthode de couplage simultané de Hayashi (1965). Les aliéstérases ont été décelées selon la technique de Burstone (1956) tandis que les lipases ont été recherchées avec la méthode aux tweens de Gomori (1945).

Ces différentes méthodes histoenzymologiques de précipitation ont été appliquées suivant les modes opératoires décrits par Pearse (1972).

Les glycosidases suivantes : maltase, cellobiase, mélibiase, lactase et sucrase ont été mises en évidence à l'aide de dissaccharides naturels, selon le procédé proposé par Lojda (1972).

Résultats expérimentaux

Le dosage biochimique de l'amylase, de la cellulase, de la chitinase et de la laminarinase a été réalisé chez cinq espèces de pagures. Les résultats sont présentés dans le tableau 1. Les activités enzymatiques ont été mesurées au niveau de la glande digestive médio-intestinale et, chez deux espèces, elles ont également été dosées au niveau stomacal et intestinal. Les homogénats d' « estomac » consistent en broyats de cavité gaslrique entière, c'est-à-dire en un mélange de parois cellulaires avec leur revêtement cuticulaire et de contenu gastrique. Les extraits d' « intestin » ont été préparés à partir des muqueuses intestinales dont le contenu intestinal n'a pas été séparé.

Les observations histoenzymologiques réalisées au moyen des techniques d'empreinte figurent dans le tableau 2. Les essais ont été effectués chez cinq espèces marines et chez une forme terrestre. Les données présentées concernent uniquement les activités enzymatiques observées au niveau tissulaire. La présence d'une activité enzymatique n'est donc signalée que lorsque l'hydrolyse spécifique du film de substrat est observée à proximité immédiate de l'épithélium concerné; et non seulement dans la lumière de l'organe.

Les résultats recueillis avec les techniques histoenzymologiques classiques de précipitation sont repris dans le tableau 3. Ils s'appliquent à quatre espèces marines et une espèce terrestre.

Discussion des résultats

Il existe une bonne concordance entre les résultats des dosages par méthodes biochimiques (tableau 1) et les évaluations quantitatives établies à partir des observations histoenzymologiques (tableau 2). Dès lors, les données de l'histoenzymologie peuvent être utilisées pour comparer et discuter de l'importance des activités enzymatiques chez les différentes espèces étudiées.

L'examen des résultats expérimentaux montre clairement que l'équipement en enzymes hydrolytiques du système digestif des Pagurides est largement diversifié. Les glycosidases sont présentes en grand nombre et souvent les activités mises en évidence sont élevées. De même, l'activité protéolytique est généralement très élevée. Par contre, les activités estérolytiques semblent assez modérées.

La sécrétion des hydrolases étudiées semble se répartir à différents niveaux dans le système digestif. Les hydrolases peuvent être sécrétées non seulement dans la glande médio-intestinale mais aussi au niveau de l'épithélium stomacal et parfois même de l'épithélium intestinal.

Données quantitatives concernant quatre types d'activité enzymatique du système digestif chez quelques pagures

TABEAU 1

Espèces	Matériel	Concentration de l'extrait enzymatique (1)	Amylase (2)	Cellulase (3)	Chitinase (4)	Laminarinase (3)
<i>Pagurus bernhardus</i>	Gl. médio-intestinale Estomac (5) Intestin (5)	104.32 57.96 36.33	514 903 405	222 — —	1 770 520 690	42 930 — —
<i>Pagurus anachoretus</i>	Gl. médio-intestinale Estomac (5) Intestin (5)	108.85 78.88 98.10	481 892 654	607 706 1 655	440 370 280	43 259 69 289 54 037
<i>Pagurus cuanensis</i>	Gl. médio-intestinale	101.01	548	3 537	0	40 536
<i>Paguristes oculatus</i>	Gl. médio-intestinale	100.78	292	1 611	0	48 519
<i>Dardanus arrosor</i>	Gl. médio-intestinale	98.10	362	2 293	110	65 370

Résultats exprimés en : (1) mg de poids frais/ml ; (2) mg de maltose libéré/h/gr de poids frais ; (3) µg de glucose libéré/h/gr de poids frais — sans addition de β-glucosidase ; (4) µg de N-acétylglucosamine /h/gr de poids frais, avec ou sans addition de N-acétylglucosaminidase.

— : non testé.

(5) : contenus et muqueuses non séparés.

TABLEAU 2
Mise en évidence, par la technique histoenzymologique d'empreinte, de quelques activités hydrolytiques au niveau du système digestif de six espèces de pagures.

Espèces	Tissus	Amylase	Cellulase	Chitinase	Laminarinase	Licheninase	Alginase	Protéase
<i>Pagurus bernhardus</i>	Gl. médio-intestinale Intestin	+++ —	± —	+++ —	+++ —	+++ —	+ —	+++ —
<i>Pagurus anachoretus</i>	Gl. médio-intestinale Estomac Intestin	+++ ++ —	++ + —	+ + —	+++ ++ —	+++ ++ —	++ ± —	+++ + —
<i>Pagurus cuanensis</i>	Gl. médio-intestinale Estomac Intestin	+++ ++ —	+++ ++ —	— +++ —	+++ ++ —	+++ ++ —	+ — —	+++ ++ —
<i>Paguristes oculatus</i>	Gl. médio-intestinale Intestin	+ —	++ —	— —	+++ —	+++ —	+ —	+++ —
<i>Calcinus ornatus</i>	Gl. médio-intestinale Estomac Intestin	+++ +++ —	+ + —	+++ ++ —	+++ ++ —	+++ ++ —		+++ + —
<i>Coenobita</i> sp.	Gl. médio-intestinale Estomac Intestin	+++ ++ —	+++ ++ —	+++ ++ ±	+++ + —	+++ —	++ —	+++ ++ ±

— : absence d'activité visible ; ± : très légère activité ; + : faible activité ; ++ : activité moyenne ; +++ : forte activité ; ++++ : activité très élevée ; sans signe : non testé.

TABLEAU 3
Localisation, par des méthodes histoenzymologiques de précipitation, de diverses activités hydrolytiques au niveau du système digestif chez cinq espèces de pagures.

Espèces	Tissus	Oligosaccharidases										Estérases					
		α-Glucosidase	Maltase	β-Glucosidase	Cellulobiose	α-Galactosidase	Melibiose	β-Galactosidase	Lactase	Sucrase	α-Xylosidase	Mannosidase	β-N-acétyl-Glucosaminidase	Estérase	Lipase (T 40)	Lipase (T 60)	Lipase (T 80)
<i>Pagurus bernhardus</i>	Gl. médio-intestinale Intestin	+	++	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pagurus anachoretus</i>	Gl. médio-intestinale Intestin	++	+	++	+	++	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pagurus cuanensis</i>	Gl. médio-intestinale Estomac Intestin	++	++	++	++	++	+	++	++	+	+	++	++	++	+	+	+
<i>Paguristes oculatus</i>	Gl. médio-intestinale Intestin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Coenobita</i> sp.	Gl. médio-intestinale Intestin	+	++	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	++	+	++	++

— : absence d'activité visible ; ± : très légère activité ; + : faible activité ; ++ : activité moyenne ; +++ : forte activité ; ++++ : activité très élevée ; sans signe : non testé.

A. Importance et localisation des activités enzymatiques

— *Amylase* (E.C.3.2.1.1.) (1).

Comme chez les autres Crustacés étudiés jusqu'à présent, les pagures possèdent de fortes activités amylolytiques, variant peu d'une espèce à l'autre (tableaux 1 et 2).

L'amylase est présente non seulement dans les cellules de la glande médio-intestinale mais également dans l'épithélium de la cavité cardiaque. Cette cavité appelée plus couramment « estomac » possède un revêtement cuticulaire interne de nature chitineuse. Par endroits, la cuticule s'épaissit et même se calcifie pour former un système complexe de pièces triturantes : *le moulin gastrique*. La méthode d'empreinte permet de mettre en évidence une intense activité amylolytique au niveau des formations dentiformes du moulin gastrique (Planche I, 1).

— *Cellulose* (E.C.3.2.1.4.).

Le problème de l'activité cellulolytique chez les Crustacés n'est pas très clair. Alors qu'une cellulase très active a été isolée de la glande digestive de l'Isopode *Limnoria lignorum* (Ray *et al.*, 1952), l'enzyme semble absente chez la ligie (Nicholls, 1931) comme chez la langouste (Yonge, 1924).

Chez les pagures, les dosages biochimiques comme les résultats histoenzymologiques montrent que l'activité cellulolytique diffère nettement selon l'espèce envisagée. La cellulase est présente non seulement dans la glande médio-intestinale mais aussi au sein de l'épithélium stomacal. Avec la méthode d'empreinte, on peut observer une forte activité enzymatique en bordure des pièces triturantes du moulin gastrique (Planche I, 2).

On considère généralement que la cellulose nécessite une longue durée d'incubation en présence de cellulase pour que son hydrolyse soit complète. Dès lors, le matériel cellulosique doit être retenu,

(1) Suivant les recommandations du « Nomenclature Committee » de l'Union Internationale de Biochimie pour la nomenclature et la classification des enzymes (1972, revision 1978 ; Academic Press, 1979).

PLANCHE I

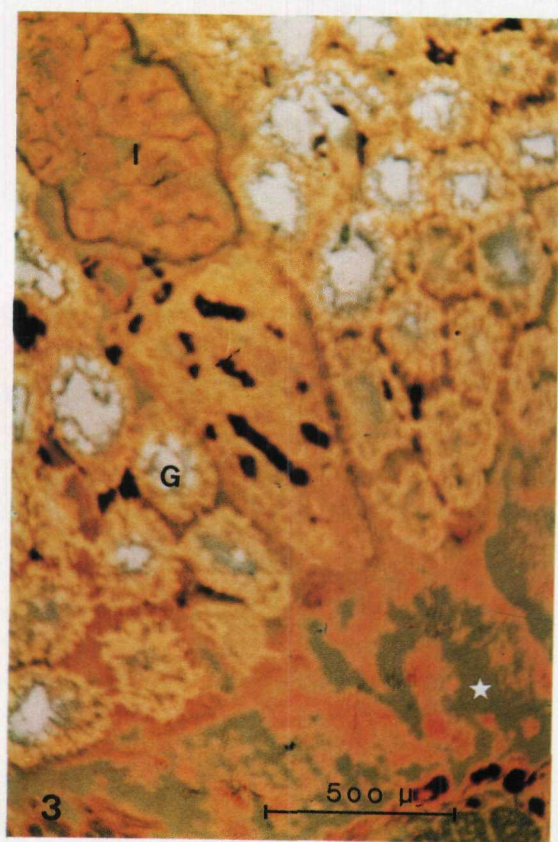
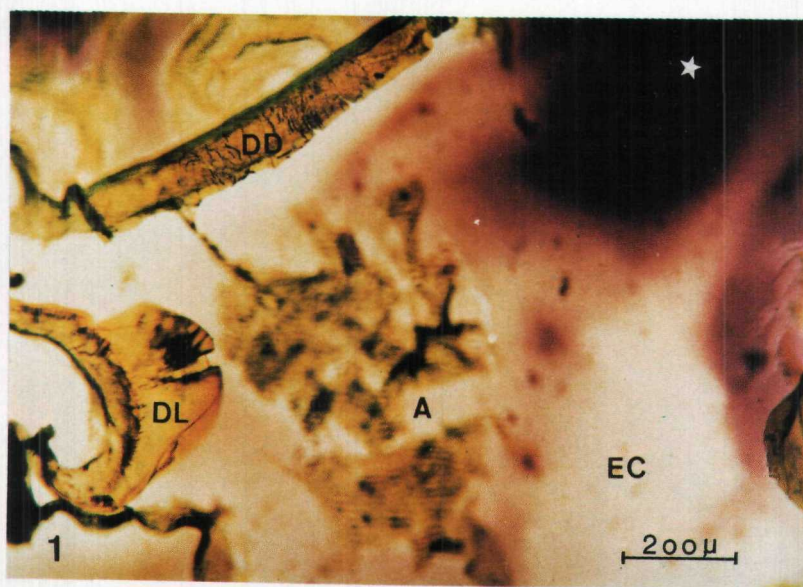
Méthodes histoenzymologiques par empreinte.

1. Activité amylolytique dans la cavité cardiaque chez *Pagurus anachoretus*. La digestion du film d'amidon est importante en bordure des dents du moulin gastrique.

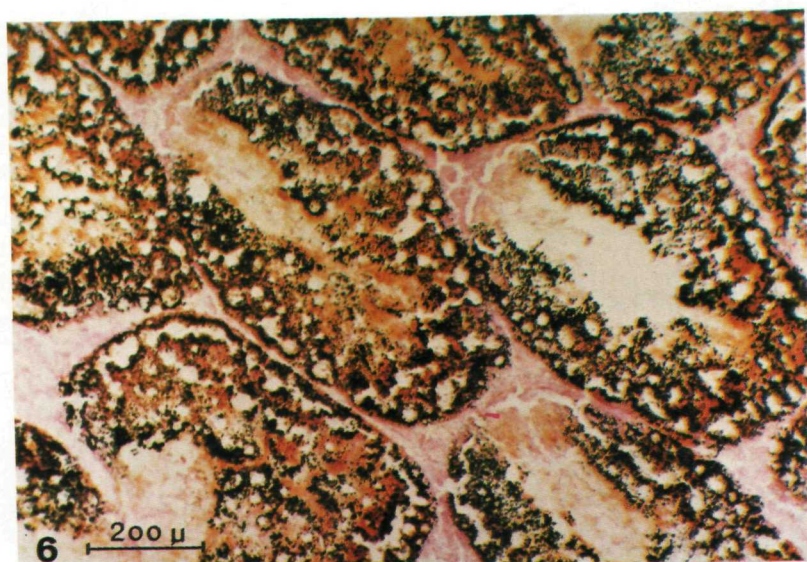
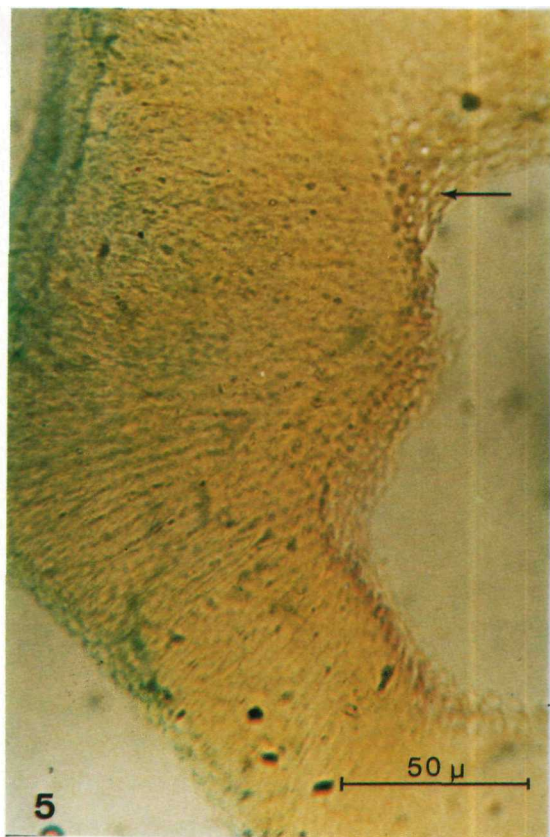
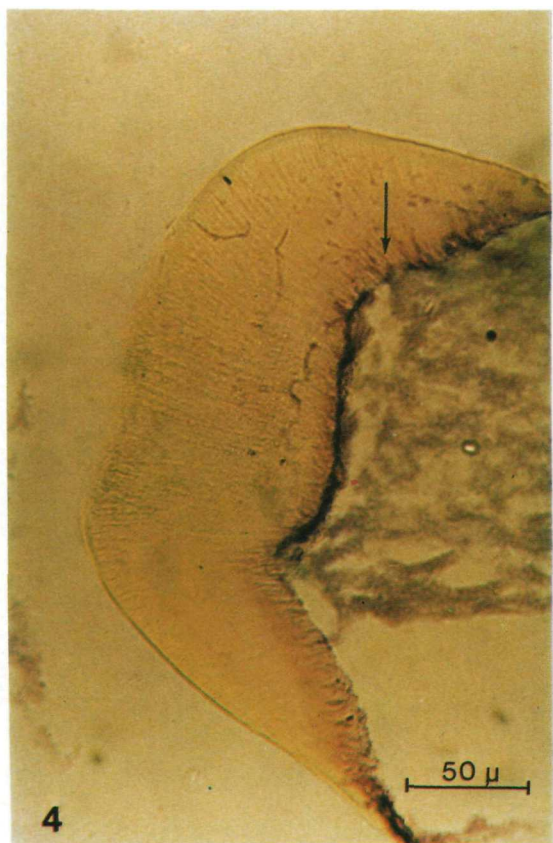
A : aliments; DD : dent dorsale; DL : dent latérale; EC : cavité cardiaque (estomac). (Film-susbrat d'amidon*, épaisseur de la coupe : 12 μ , incubation : 20 minutes, coloration : lugol + picro-indigocarmin).

2. Activité cellulolytique en bordure de la dent latérale dans la cavité cardiaque de *Pagurus anachoretus*. (Film-substrat de carboxyméthylcellulose*, épaisseur de la coupe : 12 μ , incubation : 3 heures, coloration : bleu de toluidine + laque de rouge nucléaire solide).

3. Mise en évidence de la laminarinase dans le tube digestif de *Coenobita* sp. L'activité laminarinolytique est présente dans les tubules de la glande médio-intestinale (G) mais absente dans l'intestin postérieur (I). (Film-substrat de laminarine-gélatine*, épaisseur de la coupe : 10 μ , incubation : 15 minutes, coloration : picro-bleu + laque aluminique de rouge nucléaire solide.)



C. ARNOULD et C. JEUNIAUX



C. ARNOULD et C. JEUNIAUX

dans le tube digestif, un temps suffisant pour rendre effective l'action enzymatique. On peut imaginer que, chez les pagures, le rôle d'incubateur est dévolu à l'intestin. Cela permettrait de comprendre la haute activité cellulolytique dosée dans l'intestin de *Pagurus anachoretus* alors que l'épithélium intestinal lui-même ne sécrète pas de cellulase (tableaux 1 et 2).

— *Chitinase* (E.C.3.2.1.14).

Comme chez les autres Crustacés (Jeuniaux, 1963) l'activité chitinolytique des pagures varie dans des proportions considérables allant depuis l'absence complète d'activité (*Paguristes oculatus*) jusqu'à des valeurs très élevées (*Pagurus bernhardus* — *Coenobita* sp.).

Contrairement à l'opinion générale, la sécrétion de la chitinase digestive n'est pas seulement limitée à la glande digestive. Elle se réalise également au niveau de la muqueuse gastrique (tableau 2). En bordure des dents du moulin gastrique, une activité chitinolytique importante apparaît nettement. Chez *Coenobita*, l'épithélium intestinal présente une très légère activité du type chitinase.

— *Laminarinase* (E.C.3.2.1.6.).

La laminarinase est très largement répandue chez les Crustacés (Kooiman, 1964 ; Sova *et al.*, 1969 ; Piavaux, 1976). Au sein des pagures, c'est la polysaccharidase dont l'activité varie peu avec l'espèce considérée (tableau 2). Elle est présente au niveau de la glande médio-intestinale (Planche I, 3) mais aussi, dans une très large mesure, dans l'épithélium stomacal.

Dans la cavité cardiaque, c'est toujours en bordure des dents du moulin gastrique que l'activité laminarinolytique est la plus forte.

— *Licheninase* (E.C.3.2.1.6.).


Les sites de digestion de la lichenine sont en tout point semblables à ceux de la laminarine. Il est donc impossible de distinguer l'activité du type laminarinase d'une activité lichenolytique.

— *Alginase* (E.C.3.2.1.16).


On considère généralement que les Crustacés ne possèdent pas

PLANCHE II

Méthodes histoenzymologiques de précipitation.

4. Mise en évidence d' α -glucosidase dans la dent médio-dorsale du moulin gastrique de *Pagurus cunensis*. L'activité enzymatique (coloration rose foncé ) se localise à l'apex des cellules de l'épithélium sous-jacent, ainsi qu'au niveau de fins canalicules qui perforent la dent.

(Méthode de Rutenburg *et al.*, épaisseur de la coupe : 12 μ , incubation : 8 heures).

5. Activité du type β -N-acetylglucosaminidase au niveau de la dent médio-dorsale du moulin gastrique chez *Pagurus cunensis*. L'activité enzymatique (coloration rouge ) est localisée à l'intérieur des fins canalicules qui traversent la substance anhydre de la dent.

(Méthode de Hayashi, épaisseur de la coupe : 12 μ , incubation : 20 minutes).

fi. Activité lipolytique dans les tubules de la glande médio-intestinale (G) chez *Pagurus bernhardus*.

(Méthode de Gomori, « Tween 80 », épaisseur de la coupe : 10 μ , incubation : 8 heures).

d'alginase (Kooiman, 1964 ; Favorov *et al.*, 1971). Il faut cependant remarquer que les quelques espèces étudiées jusqu'à présent ont un régime alimentaire excessivement pauvre en algues brunes, source d'alginate.

Chez les pagures, l'alginase est incontestablement présente dans le tube digestif. L'activité enzymatique est modérée parmi les formes marines mais importante chez le genre terrestre *Coenobita* (tableau 2). L'enzyme semble uniquement produite par la glande digestive. Toutefois, une très légère activité alginolytique a été décelée dans la dent dorsale du moulin gastrique chez *Pagurus anachoretus*.

— α -Glucosidase, Maltase (E.C.3.2.1.20).

La maltase, dont l'activité est assez modérée, peut être mise en évidence dans la glande médio-intestinale ainsi que dans l'épithélium stomacal. L'activité enzymatique est essentiellement localisée à l'apex des cellules. Elle se manifeste également le long de lignes parallèles traversant toute l'épaisseur des dents du moulin gastrique (Planche II, 4).

— β -Glucosidase, Cellobiase (E.C.3.2.1.21).

Selon l'espèce envisagée, l'activité de la cellobiase varie de façon importante (tableau 3). C'est chez *Pagurus cuanensis* que la cellobiase est la plus active ; elle est présente dans la glande médio-intestinale mais également dans l'épithélium stomacal sous-jacent aux dents du moulin gastrique. Chez *Coenobita*, aucune activité du type cellobiase n'a été décelée. C'est d'autant plus étrange qu'il s'agit d'une espèce réputée végétarienne qui, par ailleurs, possède la faculté de sécréter des cellulases.

— α -Galactosidase, Mélibiase (E.C.3.2.1.22).

Chez les invertébrés marins, la mélibiase est souvent présente mais généralement avec une faible activité (Kristensen, 1972). C'est également le cas pour les pagures (tableau 3). L'activité enzymatique est essentiellement localisée dans la glande médio-intestinale. Chez *Pagurus bernhardus*, la mélibiase est également présente dans la muqueuse intestinale. Chez *Coenobita*, la mélibiase n'a pu être mise en évidence.

— β -Galactosidase, Lactase (E.C.3.2.1.23).

On considère généralement que la lactase ne fait pas partie de l'arsenal enzymatique des Crustacés (Florkin, 1952). Cependant, Agraval (1963) a signalé sa présence chez *Corophium* et Kooiman (1964) l'a décelée chez *Astacus* au niveau de la glande digestive. Selon ce dernier auteur, la lactase est présente chez les Crustacés mais en très faible quantité et sa mise en évidence nécessite une très longue période d'incubation. Toutefois, Van Weel *et al.*, (1969) ne trouvent pas cette enzyme chez *Procambarus* et *Thalamita*, même après des incubations de plus de 24 heures.

Parmi les pagures, la lactase serait présente chez les formes marines mais avec une activité variable selon les espèces (tableau 3). Elle a été décelée dans la glande médio-intestinale ainsi que dans l'épithélium stomacal sous les dents du moulin gastrique.

— *Sucrase* (E.C.3.2.1.26).

Chez les pagures, la sucrase présente une faible activité contrairement aux autres Crustacés, étudiés jusqu'à présent, où elle est toujours fortement active (Arvy, 1969 ; Kristensen, 1972).

— α -*Xylosidase* (E.C.3.2.1.37).

L'activité de l' α -xylosidase varie considérablement selon l'espèce étudiée, du moins parmi les pagures. L'enzyme a été décelée dans la glande digestive, l'épithélium stomacal et même au niveau de la muqueuse intestinale.

— α -*Mannosidase* (E.C.3.2.1.24).

L' α -mannosidase semble être, de toutes les oligosaccharidases, l'enzyme la plus active (tableau 3). Elle est essentiellement localisée dans la glande médio-intestinale. Cependant, une légère activité a été décelée chez certaines espèces dans la muqueuse intestinale et chez *Pagurus cuanensis* dans les pièces du moulin gastrique.

— β -*N-Acetylglucosaminidase* (ou *chitobiase*) (E.C.3.2.1.30).

L'activité de la chitobiase varie sensiblement selon les espèces de pagures. L'activité enzymatique peut être mise en évidence, d'une part au niveau de la glande digestive, d'autre part au niveau du moulin gastrique, notamment dans les pièces dentiformes où elle est strictement localisée à l'intérieur de fins conduits qui perforent toute l'épaisseur cuticulaire (Planche II, 5).

Chez *Paguristes oculatus*, la chitobiase tout comme la chitinase (tableaux 1, 2, 3) fait totalement défaut dans l'équipement enzymatique du tube digestif.

— *Estérases*.

Le site principal de la sécrétion des estérases est la glande médio-intestinale (Planche II, 6). Toutefois, chez la forme terrestre *Coenobita*, les enzymes sont également présentes dans la muqueuse intestinale avec des activités fort comparables à celle de la glande digestive. Chez *Pagurus cuanensis*, une estérase simple a été mise en évidence dans l'épithélium stomacal ainsi qu'au sein des dents du moulin gastrique.

— *Protéases*.

Le test histoenzymologique qui a été appliqué n'est guère spécifique mais il montre clairement que l'activité protéolytique est importante chez tous les pagures. L'activité se localise essentiellement dans la glande digestive. Au niveau de la cavité stomacale, la protéolyse se manifeste principalement en bordure des plaques masticatrices du moulin gastrique.

B. Sites de sécrétion des enzymes

Chez les Crustacés, la digestion est essentiellement extracellulaire ; elle se réalise dans l'estomac au niveau de la cavité cardiaque.

Depuis Vonk (1960), la glande médio-intestinale est considérée comme la principale source, sinon la seule, des enzymes digestives. Le suc gastrique correspondrait donc aux sécrétions de la glande digestive, modifiées par les aliments ingérés (Arvy, 1969).

Cependant, malgré la rareté des données expérimentales, il semble que certaines enzymes du fluide gastrique pourraient avoir une autre origine. C'est notamment l'opinion de Brun et Wojtowicz (1976) qui prennent en considération les faits suivants. Chez *Astacus*, la trypsine prélevée dans la cavité stomacale et celle extraite de la glande digestive présentent des propriétés nettement différentes (Kleine, 1967). Enfin, Brockerhoff *et al.* (1970), rapportent la présence de certaines estérases et protéases dans le jus gastrique du homard américain, alors que ces mêmes enzymes ne peuvent être décelées au niveau de la glande digestive (Brun et Wojtowicz).

En ce qui concerne les Pagurides, l'utilisation des méthodes histoenzymologiques a non seulement permis de localiser les sites d'activité enzymatique au sein de la cavité gastrique mais également de préciser l'origine des enzymes digestives.

D'une part, les techniques d'empreinte ont mis en évidence l'existence de deux zones principales d'activité hydrolytique :

1. une hydrolyse enzymatique importante se manifeste généralement dans le profond sillon formé **par** la gouttière ventrale. Il semble bien que les enzymes responsables de cette digestion sont sécrétées par la glande médio-intestinale et libérées dans la cavité gastrique par l'intermédiaire de deux canaux latéro-ventraux ;

2. une intense activité enzymatique s'observe également dans la partie supérieure de la cavité cardiaque. Elle est localisée en bordure et au sein même des pièces masticatrices du moulin gastrique ainsi qu'au niveau de l'épithélium stomacal sous-jacent. Cette distribution de l'activité enzymatique suggère que ces enzymes pourraient être sécrétées par l'épithélium stomacal et transmises dans la lumière gastrique à travers les dents masticatrices.

D'autre part, les méthodes de précipitation montrent que l'activité enzymatique, présente au niveau des pièces masticatrices du moulin gastrique, est strictement localisée. Elle se manifeste uniquement le long de lignes parallèles disposées transversalement à l'épaisseur de la cuticule. Ces lignes semblent correspondre à de fins canalicules, ce qui permet de **supposer** que les enzymes sécrétées par l'épithélium sous-jacent sont transmises dans la cavité gastrique par l'intermédiaire de canaux perforant le revêtement cuticulaire.

Une organisation fonctionnelle comparable a été signalée par Barker et Gibson (1977, 1978), **pour la** cuticule œsophagienne des Décapodes *Homarus gammarus* et *Scylla serrata*. Des conduits en contact avec la surface distale des cellules épithéliales ou en relation avec les glandes tégumentaires enlournt l'œsophage, traversent la cuticule pour venir s'ouvrir dans la lumière du tube digestif. Ils assurent, semble-t-il, le passage des produits de sécrétion des glandes œsophagiennes vers la lumière digestive.

Dans le cas des Mollusques, nous avons également observé un phénomène de sécrétion d'hydrolases à travers les formations cuti-

culaires constituant le bouclier gastrique de divers Bivalves, et les dents gésiales de l'aplysie (Gasteropode Opisthobranchie) (Arnould, 1973 ; Arnould *et al.*, 1977).

Conclusions

Les Pagurides possèdent un équipement en hydrolases digestives largement diversifié. Les activités enzymatiques mises en évidence pour les polysaccharidases et les protéases sont particulièrement élevées tandis que, pour les oligosaccharidases et les estérases, elles semblent plutôt modérées. Dès lors, il apparaît qu'au point de vue enzymatique, les pagures sont bien adaptés à un régime alimentaire du type omnivore.

Toutefois, chez une espèce de pagure, à savoir *Paguristes oculatus*, le système chitinytique semble faire totalement défaut au niveau du tube digestif. Ce résultat, pour le moins inattendu, conduit à réviser les vues traditionnelles sur les aptitudes alimentaires omnivores et carnivores de ce Paguride et, par conséquent, sa position dans la chaîne trophique des biocénoses benthiques.

Chez les Pagurides, la sécrétion des enzymes digestives se déroule à divers niveaux du système alimentaire. Les activités enzymatiques peuvent être décelées, non seulement dans les cellules de la glande médio-intestinale, mais aussi au niveau de l'épithélium stomacal et, dans une moindre mesure, dans la muqueuse intestinale.

L'observation la plus surprenante est la mise en évidence d'enzymes hydrolytiques dans les pièces masticatrices du moulin gastrique. Les enzymes seraient sécrétées par l'épithélium stomacal sous-jacent et libérées dans la cavité gastrique par l'intermédiaire de fins canalicules perforant le revêtement cuticulaire. Sur le plan fonctionnel, l'organisation morphologique des dents gastriques présente un intérêt considérable. En effet, les aliments qui pénètrent dans la cavité stomacale sont simultanément soumis à la trituration par les dents et à l'action des enzymes. On peut penser que la conjonction de la dégradation mécanique et de l'hydrolyse enzymatique améliore l'efficacité et le rendement de la digestion.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à Mme Nicole Bouchez-Decloux qui nous a efficacement secondés dans les diverses manipulations expérimentales.

Nous remercions également MM. J.C. Bussers, P. Vandewalle et J.P. Thomé pour la récolte des pagures en plongée.

Ce travail a bénéficié de l'aide financière du Fonds National Belge de la Recherche Fondamentale Collective (F.R.F.C., crédit n° 2.4567.75).

Summary

The enzymatic activity of 23 different types of hydrolases (oligosaccharidases, polysaccharidases, esterases, proteases) was detected and located in the digestive system of 6 species of hermit-crabs (Crustacea Decapoda Pagurioidea), using mainly histoenzymological methods.

These hydrolases are secreted at different levels of the alimentary canal, not only in the digestive gland ("hepatopancreas"), but also in the gastric and intestinal epithelia.

The observation of different hydrolytic activities within the cuticular lining of the stomach, and especially in the teeth of the gastric mill, leads to discuss the possible role of these structures in the liberation of digestive enzymes during stomacal trituration of the ingested food.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- AGRAVAL, V.P., 1963. — Studies on the physiology of digestion in *Corophium volutator*. *J. mar. biol. Ass. U.M.*, 43, pp. 125-128.
- ARNOULD, CH., 1973. — Structure morphologique et histologique du bouclier gastrique de *Zypraea crispata* (L.) (Bivalvia Eulamellibranchia). *Ann. Soc. Roy. Zool. Belgique*, 103, pp. 281-291.
- ARNOULD, CH. et BOUCHEZ-DECLoux, N., 1978. — Méthodes histoenzymologiques pour la détection de cellulase, de chitinase et de laminarinase. Application au bouclier gastrique du mollusque bivalve *Scrobicularia plana*. *Histochemistry*, 56, pp. 45-54.
- ARNOULD, T.H. et JEUNIAUX, CH., 1977. — Caractères morphologiques du revêtement cuticulaire du premier gésier d'*Aplysia punctata* Cuv. (Mollusque Opisthobranchie) et homologie avec le bouclier gastrique des Bivalves. *C'ah. Biol. Mar.*, 18, pp. 465-473.
- ARVY, L., 1969. — Les enzymes chez les Crustacés. *Ann. biol.*, 8, pp. 505-580.
- DARKER, P.L. and GIBSON, R., 1977. — Observations on the feeding mechanism, structure of the gut, and digestive physiology of the European Lobster *Homarus gammarus* L. (Decapoda : Nephropsidae). *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 26, pp. 297-324.
- BARKER, P.L. and GIBSON, R., 1978. — Observations on the structure of the mouth-parts, histology of the alimentary tract, and digestive physiology of the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) (Decapoda : Portunidae). *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 32, pp. 177-196.
- BERNFELD, P., 1953. — Amylases α et β . In: *Methods in Enzymology*. Colowick and Kaplan, ed., Acad. Press, New York, pp. 149-158.
- BRIGHTWELL, L.R., 1951. — Some experiments with the common hermit crab (*Eupagurus bernhardus* Linn.) and transparent univalve shells. *Proc. Zool. Soc. London*, 121, pp. 279-283.
- BROCKERHOFF, H., HOYLE, N.J. and HWANG, P.C., 1970. — Digestive enzymes of the American Lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 27, pp. 1357-1370.
- BRUN, G.L. and WOJCIOWICZ, M.B., 1976. — A comparative study of the digestive enzymes in the hepatopancreas of Jonah Crab (*Cancer borealis*) and rock Crab (*Cancer irroratus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 53 B, pp. 387-391.
- BURSTONE, M.S., 1956. — Esterase of the salivary glands. *J. Histochem. Cytochem.*, 4, pp. 130-139.
- DANDRIFOSSE, P., 1977. — La sécrétion des enzymes digestifs chez les Vertébrés. *Arch. internat. Physiol. Biochem.*, 85, pp. 641-848.
- FAVOROV, V.V. and VASKOVSKY, V.E., 1971. — Alginases of marine Invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 38 B, pp. 689-696.
- FLORKIN, M., 1957. — Sur l'origine des cellulases et des chitinases animales. Extr. *Proceed. Intern. Symp. Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto*, pp. 390-392.
- GERLACH, S.A., EKSTROM, D.K. and ECKART, P.B., 1976. — Filter feeding in the hermit crab, *Pagurus bernhardus*. *Oecologia* (Berl.), 24, pp. 257-264.
- GOMORI, G., 1945. — The microtechnical demonstration of sites of lipase activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 58, p. 362.
- HAYASHI, M., 1965. — Histochemical demonstration of N-acetyl- β -glucosaminidase employing naphthol AS-BI-N-acetyl- β -glucosaminide as "substrate". *J. Histochem.*, 13, pp. 355-360.
- JACKSON, H.G., 1913. — *Eupagurus*. *Proc. L'pool. biol. Soc.*, 27, pp. 495-573.
- JEUNIAUX, CH., 1963. — Chitine et chitinolyse, un chapitre de la biologie moléculaire. Masson et Cie, éd., Paris, pp. 1-181.
- JEUNIAUX, CH., 1965. — Chitine et phylogénie : application d'une méthode enzymatique de dosage de la chitine. *Soc. Chim. Biol. Bull.*, 47, pp. 959-966.
- KLEINE, R., 1967. — Vorkommen und Eigenschaften der proteolytischen Enzyme des Magensaftes und der Mitteldarmdrüse des Flusskrebses *Astacus astacus* (L.) und *Cambarus affinis* (Say). *Z. vergl. Physiol.*, 55, pp. 51-69.

- KOOIMAN, P., 1964. — The occurrence of carbohydrases in digestive juice and in hepatopancreas of *Astacus fluviatilis* Fabr. and of *Homarus vulgaris* M.E. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 63, pp. 197-201.
- KRISTENSEN, H., 1972. — Carbohydrases of some marine invertebrates with notes on their food and on the "natural occurrence of the carbohydrates studied. *Mar. Biol.*, 14, pp. 130-142.
- LIEBECQ, C., BRACH, J. and JACQUEMOTTE-LOUIS, M., 1960. — Dosage du glucose par le système enzymatique « mutarase — notatine — peroxydase. *Arch. Internat. Physiol. Biochim.*, 68, pp. 525-528.
- LOJDA, Z., 1972. — An improved histochemical method for the demonstration of disaccharidases with natural substrates. *Histochemie*, 30, pp. 277-280.
- MARSCHALL, S.M. and ORR, A.P., 1960. — Feeding and nutrition. In : *The Physiology of the Crustacea*. Waterman, ed., Acad. Press, New York, 1, pp. 227-258.
- MCGINTIE, G.E., 1937. — Notes on the natural history of several marine Crustacea. *Am. Midland Naturalist*, 18, pp. 1031-1036.
- MCGINTIE, G.E., 1968. — Natural history of marine animals. McGraw Hill, ed., New York, pp. 1-523.
- MICHEL, C. and CHRÉTIEN, M., 1975. — Modification of Cunningham's method for detection of proteases in tissue sections. *Annls Histochem.*, 20, pp. 39-46.
- NICHOLLS, A.G., 1931. — Studies on *Luna oceanica*. *J. mar. Bil. Ass. U.K.*, 17, pp. 675-706.
- ORTON, J.H., 1927. — On the mode of feeding of the hermit-crab, *Eupagurus bernhardus*, and some other Decapoda. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, 14, pp. 909-921.
- PEARSE, A.G.E., 1972. — Histochemistry. Theoretical and Applied. Churchill Livingstone, Edinburgh and London, pp. 1-1518.
- PIAUAUX, A., 1977. — Distribution and localization of the digestive laminarinases in Animals. *Bioch. Syst. Ecol.*, 5, pp. 231-239.
- PIAUAUX, A. et DANDRIFOSSE, G., 1972. — Présence de laminarinases dans l'intestin d'un poisson cichlidac *Tilapia macrochir* Boulenger. *Arch. internat. Biochim. Biophys.*, 80, pp. 51-57.
- RAV, D.L. and JULIAN, J.R., 1952. — Occurrence of cellulase in *Limnoria*. *Nature*, 196, pp. 32-33.
- RUTENBURG, A.M., GOLBERG, J.A., RUTENBURG, S.H. and LANG, T.R., 1960. — The histochemical demonstration of α -D-glucosidase in mammalian tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 8, pp. 268-272.
- RUTENBURG, A.M., RUTENBURG, S.H., MONIS, B., TEAGUE, R. and SELIGMAN, A.M., 1958. — Histochemical demonstration of β -D-galactosidase in rat. *J. Histochem. Cytochem.*, 6, pp. 122-129.
- SAMUELSEN, T.J., 1970. — The biology of six species of Anomura (Crustacea Decapoda) from Raunefjorden, Western Norway. *Sarsia*, 45, pp. 25-52.
- SOVA, V.V., ELYAKOVA, L.A. and VASKOVSKY, V.E., 1970. — The distribution of laminarinases in marine invertebrates. *Camp. Biochem. Physiol.*, 32, pp. 459-464.
- THORSON, G., 1966. — Some factors influencing the recruitment and establishment of marine benthic communities. *Xeth. J. Sea Res.*, 3, pp. 267-293.
- TRUJILLO, R., 1968. — Preparation of carboxymethyl chitin. *Carbohndr. Res.*, 7, pp. 483-485.
- VONK, H.S., 1960. — Digestion and metabolism. In: *The Physiology of the Crustacea*. Waterman, ed., Acad. Press, New York, pp. 291-316.
- VAN WEEL, P.B., HOFFMAN, C.N., JAMES, M.L. and YEE, H.W.F., 1969. — On certain carbohydrases in *Aplysia Juliana* (Mollusca) and in *Thalamita crenata* and *Prncambarus clarki* (Crustacea). *Comp. Biochem. Physiol.*, 30, pp. 497-502.
- YONGE, CM., 1924. — Studies on the comparative physiology of digestion. II. The mechanism of feeding, digestion and assimilation in *Nephrops norvegicus*. *Brit. J. exp. Biol.* 1, pp. 343-389.