

LES ECDYSTÉROÏDES CHEZ LES CRUSTACÉS DÉCAPODES

par

F. Lachaise

E.N.S., Laboratoire de Zoologie, C.N.R.S. U.A. 686,
46, rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05.

En 1954, Butenandt et Karlson isolaient, à partir du ver à soie, une hormone stéroïde à 27 carbones, formée d'un noyau cyclique et d'une chaîne latérale : l'ecdysone ou hormone de mue des Insectes. Ce n'est qu'en 1966 que Hampshire et Hom ont trouvé, chez les Crustacés Décapodes, la 20-hydroxyecdysone anciennement appelée crustecdysone, ecdystérone ou encore β -ecdysone. Depuis, de nombreuses molécules, plus ou moins proches de l'ecdysone et ayant un rôle dans la mue des Arthropodes, ont été détectées chez ces animaux et regroupées sous le terme général d'ecdystéroïdes. Les recherches concernant les hormones de mue ont été réalisées soit sur des Insectes appartenant essentiellement au monde aérien soit sur des Crustacés qui pour la plupart appartiennent au monde marin. En effet si ces Arthropodes nécessitent la présence d'ecdystéroïdes pour leur développement et leur reproduction, ce ne sont pas les mêmes molécules ni les mêmes procédés de synthèse ou d'inactivation ou encore de régulation qui interviennent dans ces deux groupes.

Après avoir tenté de caractériser les ecdystéroïdes des Crustacés Décapodes, les chercheurs travaillant dans ce domaine ont essayé de connaître d'une part le lieu de synthèse de ces molécules ainsi que leurs voies de synthèse et d'autre part les processus d'inactivation de ces produits. La concentration des ecdystéroïdes de Crustacé semble régulée par une hormone inhibitrice de mue ou MIH (Molting Inhibiting Hormone) dont la sécrétion a pour effet de bloquer la mue. Cette MIH relarguée, chez les Crustacés Décapodes, par la glande du sinus située dans les pédoncules oculaires, agirait directement sur les organes Y ou lieu de synthèse de l'ecdysone. Si à ce jour, les travaux concernant la caractérisation, la synthèse et la dégradation des ecdystéroïdes de Crustacés Décapodes sont bien avancés il n'en est pas de même de la régulation du taux de ces hormones et de leur rôle dans la vie de ces Arthropodes.

CARACTÉRISATION DES ECDYSTÉROÏDES PRÉSENTS CHEZ LES CRUSTACÉS DÉCAPODES

Techniques d'études

La première étape dans la détection des ecdystéroïdes à partir d'un tissu ou d'animaux entiers est la réalisation d'un extrait, le plus propre possible, contenant les ecdystéroïdes. Les échantillons sont broyés dans divers solvants appropriés à la solubilité des ecdystéroïdes recherchés. L'extrait est ensuite purifié par différentes

méthodes (chromatographie sur plaque, sur petites colonnes SEP-PAK C-18 voir Lafont et coll. 1982, Watson et Spaziani, 1982). Les ecdystéroïdes de l'extrait sont alors caractérisés au moyen de tests biologiques, de radioimmunodosages, d'analyses chimiques ou, ce qui est préférable, d'une combinaison des différentes

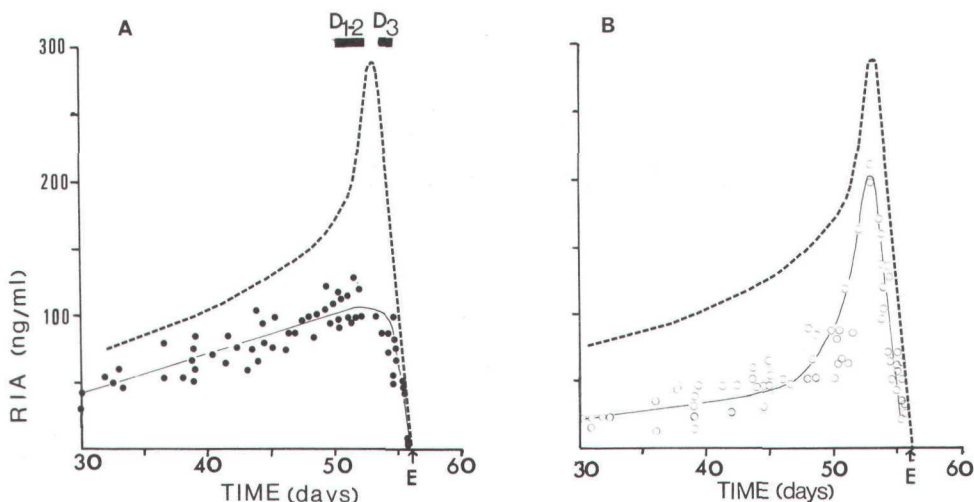


FIG. 1

Dosages radioimmunologiques (RIA, ng/ml) des ecdystéroïdes hémolympatiques chez le crabe *Gecarcinus lateralis* en fonction du stade de mue (Time, days) selon McCarthy (1982). Courbes tiretées A + B : dosages réalisés en utilisant l'anticorps de Horn et coll. (1976) qui reconnaît la ponastérone A et la 20-hydroxyecdysone de façon équivalente.

A (trait plein) : dosages réalisés en utilisant l'anticorps de Borst et O'Connor (1974) ne reconnaissant que la 20-hydroxyecdysone.

B (trait plein) : variation de la concentration de la ponastérone A au cours du cycle de mue, points calculés par la différence entre les points de la courbe tiretée (représentant la somme des concentrations de la ponastérone A et de la 20-hydroxyecdysone) et ceux de la courbe en trait plein de la figure A (représentant la concentration de la 20-hydroxyecdysone).

techniques. En effet, si nous prenons l'exemple des radioimmunodosages réalisés sur des extraits totaux d'hémolymph, les résultats obtenus ne renseignent pas sur la qualité ni même la quantité d'ecdystéroïdes présents dans les échantillons. Comme l'ont montré Spindler et coll. (1978), selon leurs techniques de fabrication les anticorps répondent de façon différente à un même ecystéroïde. Dans certain cas cette différence peut être utilisée pour mettre en évidence la présence d'un ecdystéroïde particulier. Ceci est illustré par les travaux de McCarthy (1982) qui a montré que l'hémolymph du crabe *Gecarcinus lateralis* contient des ecdystéroïdes dont la concentration varie en fonction du stade de mue; cependant, en utilisant l'anticorps de Horn et coll. (1976) l'auteur obtient une courbe avec un pic de concentration très net en prémue (courbe tiretée figure 1A) alors qu'avec celui de Borst et O'Connor (1974) il obtient une deuxième courbe différente de la première (trait plein figure 1A). Dans le premier cas l'auteur a utilisé un anticorps reconnaissant la ponastérone A et la 20-hydroxyecdysone de façon quasi équivalente et, dans le second cas, l'anticorps utilisé ne reconnaît pas la ponastérone A. Cet auteur, ayant auparavant montré que la 20-hydroxyecdysone et la ponastérone A étaient les deux ecdystéroïdes majeurs de l'hémolymph chez ce crabe, obtient, par différence entre les deux courbes, la variation de la concentration hémolympatique

de la ponastérone A au cours du cycle de mue chez *Gecarcinus lateralis* (Fig. 1B). Plus couramment, la caractérisation des ecdystéroïdes présents dans un échantillon s'effectue par séparation préalable des produits par une ou plusieurs chromatographies de l'extrait suivies de radio-immunodosages. Les produits ainsi isolés sont ensuite analysés, si la quantité obtenue est suffisante, par spectrométrie de masse et/ou par résonance magnétique nucléaire.

Liste des ecdystéroïdes variés trouvés chez les Crustacés Décapodes

De nombreux ecdystéroïdes ont été trouvés chez les Crustacés comme l'ont signalé Splinder et coll. (1980) : l'ecdysone, la 20-hydroxyecdysone, la makistérone (?), l'inokostérone, la 20,26-dihydroxyecdysone, la 2-deoxy-20-hydroxyecdysone. Plus récemment, McCarthy, (1979) et Lachaise et coll. (1981), ont trouvé un ecdystéroïde particulier chez les crabes : la ponastérone A (Fig. 2A). Cet ecdystéroïde, qui diffère de la 20-hydroxyecdysone par l'absence d'un hydroxyle en position 25 (Fig. 2B), était, jusqu'alors, inconnu chez les animaux. Il semble être quantitativement important chez les crabes dans l'hémolymph peu avant la mue (McCarthy, 1979-1982 et Lachaise et Lafont, 1984), dans l'ovaire au cours de la maturation ovarienne (Lachaise et coll., 1981) et dans l'œuf au cours du développement embryonnaire (McCarthy et Skinner, 1979a et Lachaise et Hoffmann, 1982).

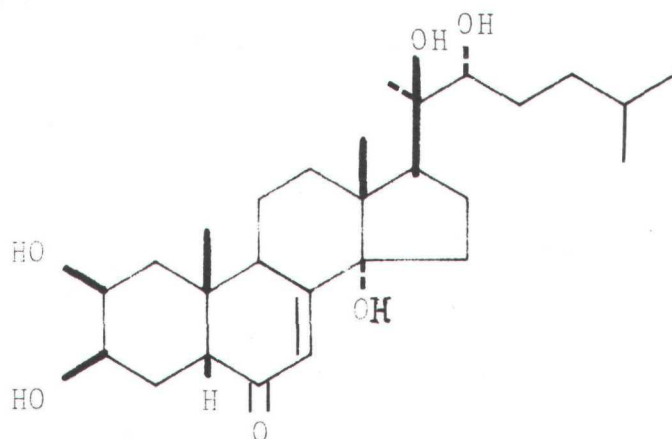
LIEU DE SYNTHÈSE DES ECDYSTÉROÏDES

La présence des ecdystéroïdes chez les Crustacés Décapodes pose tout naturellement la question de savoir d'une part si ces ecdystéroïdes sont synthétisés par le crabe et d'autre part où se situe cette synthèse.

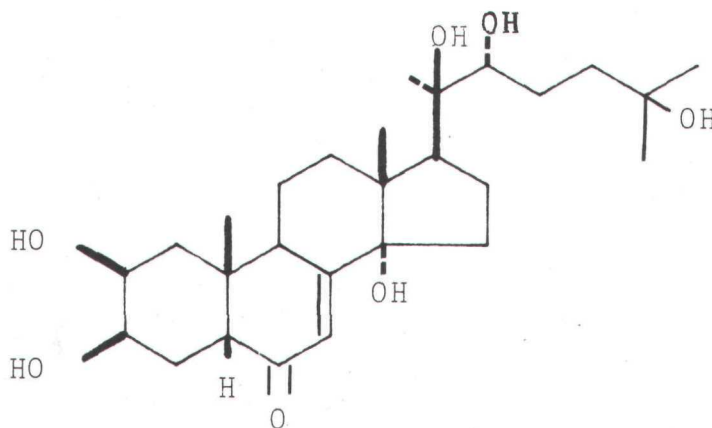
Les Crustacés, comme les Insectes, ne synthétisent pas le cholestérol qui est un précurseur classique des ecdystéroïdes en C-27 chez les Arthropodes. L'injection de cholestérol à des *Carcinus maenas* en prémue montre la présence de 3 produits, comigrant avec des ecdystéroïdes connus, la 20-hydroxyecdysone, l'ecdysone et la ponastérone A. Cette conversion s'effectue avec un rendement de 0,2 pour mille (Lachaise, résultats non publiés).

Si les Crustacés sont capables de synthétiser leurs ecdystéroïdes à partir du cholestérol nous pouvons nous demander où se situe cette synthèse. C'est en 1954-1955 qu'Echalier a pu mettre en évidence, chez le crabe *Carcinus maenas* une paire de glandes, situées ventralement, qui avaient un rôle prépondérant dans la mue de cet animal : l'ablation de ces organes ou organes Y, bloquait la mue alors que leur réimplantation restaurait celle-ci. Il était logique de penser que les organes Y, ou glandes de mue, étaient impliqués dans la synthèse des ecdystéroïdes ou hormones de mue. Divers auteurs ont tenté de mettre en évidence la synthèse d'ecdysone par les organes Y soit en incubant les organes dans un milieu et en mesurant le matériel immunoréactif formé soit en incubant les organes Y en présence d'un précurseur. Les travaux de Bollenbacher et O'Connor (1973) et de Chang et O'Connor (1977) ont montré que les organes Y de *Pachygrapsus crassipes*

synthétisent du matériel immunoréactif comigrant, sur Chromatographie sur plaque de silice, avec l'ecdysone de référence. Keller et Schmid (1979), à l'aide d'une technique similaire, ont confirmé ce résultat chez l'écrevisse. Divers auteurs ont

A

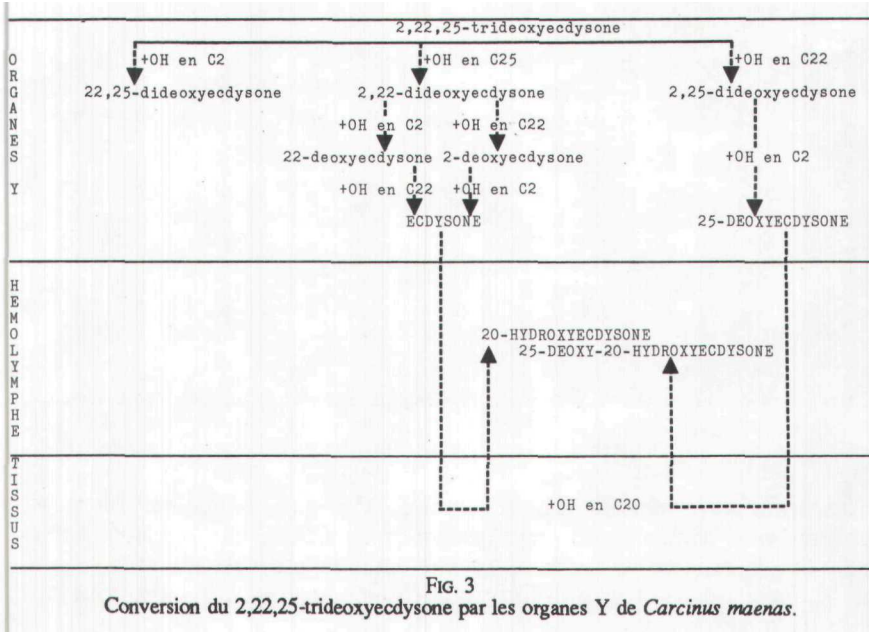
25-DEOXY-20-HYDROXYECDYSONE (PONASTERONE A)

B

20-HYDROXYECDYSONE

FIG. 2
Structure de la ponastérone A et de la 20-hydroxyecdysone.

donc montré que les organes Y de Crustacés synthétisent de l'ecdysone mais qu'en est-il de la ponastérone A découverte plus récemment chez ces animaux? A ce propos la littérature fait allusion à un ou des produits, plus apolaire(s) que l'ecdysone et cependant pas aussi apolaire que les triols ou 22,25-dideoxyecdysone (Chang et O'Connor, 1977, Thèse de Bollenbacher, 1974). Ce produit, qui n'est pas la ponastérone A est appelé «unknown product» par Watson et Spaziarli (1985b). Très récemment Haag et coll (1985) ont synthétisé une molécule, de très



haute activité spécifique (107 Ci/mM), le 2,22,25-trideoxyecdysone intervenant très probablement dans la synthèse des ecdystéroïdes (Hoffmann et coll., 1980 et Lachaise et coll., 1981). Cette molécule est transformée, par les organes Y de *Carcinus maenas*, en 3 produits terminaux : le 22,25-dideoxyecdysone, l'ecdysone et la 25-deoxyecdysone (Lachaise et coll. 1986). Les deux derniers produits, ecdysone et 25-deoxyecdysone, sont hydroxylés en position 20 par les tissus du crabe (Koolman, 1982 et Lachaise et coll. 1986) pour aboutir à la formation de 20-hydroxyecdysone et de ponastérone A circulantes (Fig. 3). Les organes Y de crabes synthétisent donc deux ecdystéroïdes l'un, l'ecdysone, commun aux Insectes et aux Crustacés, l'autre, la 25-deoxyecdysone, particulier aux Crustacés.

MÉTABOLISME DES ECDYSTÉROÏDES MAJEURS

Les deux hormones circulantes majeures des crabes, la 20-hydroxyecdysone et la ponastérone A, sont métabolisées par ces animaux en divers produits et leur métabolisme a été étudié par injection d'hormone radioactive suivie de la caractérisation des métabolites formés. De nombreux travaux ont mis en évidence la

conversion d'ecdysone en 20-hydroxyecdysone (cf. revue Koolman 1982) et étudié le métabolisme de ces deux hormones chez les Crustacés (Spindler et coll., 1980; McCarthy, 1982). Plus récemment, une étude plus complète a été réalisée chez *Carcinus maenas* où le métabolisme de la 20-hydroxyecdysone et celui de la ponastérone A ont été étudiés concomitamment (Lachaise et Lafont, 1984). Chez ce crabe, la ponastérone A est transformée en 20-hydroxyecdysone, ces deux molécules sont inactivées sous forme d'acides ecdysonoiques et de conjugués à

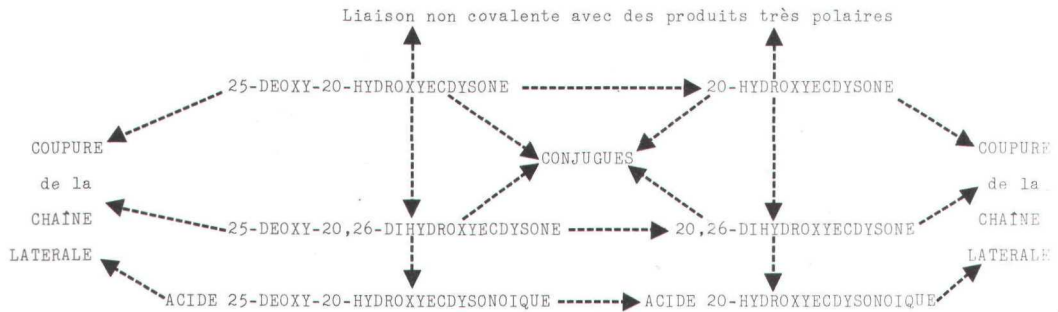


FIG. 4

Métabolisme de la ponastérone A et de la 20-hydroxyecdysone chez le crabe *Carcinus maenas*.

l'image des résultats obtenus chez les Insectes. Cependant, chez les Crustacés la principale voie d'inactivation (représentant parfois 90% des produits formés) semble être la coupure de la chaîne latérale entre les carbones 20 et 22 (Fig. 4). Cette coupure peut aboutir à la formation d'une nouvelle classe d'ecdystéroïdes dérivés de la poststérone.

ACTION DES ECDYSTÉROÏDES DANS LE DÉVELOPPEMENT ET LA REPRODUCTION

Action sur la mue

L'action de l'ecdysone et de la 20-hydroxyecdysone sur la mue des crabes est bien connue. En effet classiquement l'injection de l'une ou l'autre de ces deux hormones à des Crustacés en période d'intermue (stade C4 des crabes) déclenche les phénomènes préparatoires à la mue. Stevenson (1978) a pu montrer le rôle direct de la 20-hydroxyecdysone dans l'incorporation de N-Acétyleglucosamine dans la chitine chez l'écrevisse. Chez l'écrevisse toujours, Gorell et coll. (1972) ont mis en évidence le rôle activateur de la 20-hydroxyecdysone dans la synthèse des protéines au niveau de l'hépatopancréas. En 1981, Chaix et coll. signalent l'augmentation concomitante de la concentration des ecdystéroïdes hémo-lymphatiques et des protéines de l'épiderme du crabe *Acanthonyx lunulatus* durant le cycle de mue. A la lumière de ces quelques exemples, cités parmi tant d'autres, il apparaît que la 20-hydroxyecdysone joue un rôle dans tous les phénomènes impliqués dans la mue. Cependant, à côté de la 20-hydroxyecdysone circule la ponastérone A et l'on peut s'interroger sur le rôle de cette hormone : agit-elle

comme régulateur de l'action de la 20-hydroxyecdysone ou bien a-t-elle un rôle propre? La recherche systématique de ponastérone A chez les Arthropodes suggère une association entre «présence de ponastérone A» et «mue à l'état adulte». En effet, les Tiques et les Insectes ptérygotes étudiés ne possèdent pas de ponastérone A alors que les Crustacés et les Insectes aptérygotes (Thysanoures et Collembolés) en possèdent (Lachaise, résultats non publiés).

Action sur la reproduction

Chez les Crustacés Décapodes, les ecdystéroïdes semblent avoir un rôle négatif dans la vitellogénèse selon Adiyodi et Adiyodi (1970) bien que leur présence soit nécessaire aux mitoses goniales chez le jeune. Cette intervention des ecdystéroïdes dans la vitellogénèse s'effectuerait par l'intermédiaire du ganglion thoracique dont l'action serait inhibée par les ecdystéroïdes circulants. Cependant, si chez les femelles de *Carcinus maenas* en vitellogénèse l'hémolymph ne contient que peu ou pas d'ecdystéroïdes en revanche la concentration des ecdystéroïdes ovariens augmente avec la taille de ceux-ci (Lachaise et coll., 1981). Dans les ovaires du crabe *Acanthonyx lunulatus*, Chaix et de Reggi (1982) ont également montré la présence d'ecdystéroïdes dont la concentration varie au cours du développement ovarien. Les ecdystéroïdes ovariens sont probablement utilisés au cours de la maturation ovarienne mais leur rôle est encore inconnu du fait d'une part de la multiplicité de ces ecdystéroïdes, des relations pouvant exister entre eux (cf. plus haut) et de la mise en place d'un test indubitable pour prouver à coup sûr leur action au niveau de la maturation méiotique par exemple.

Une faible partie des ecdystéroïdes ovariens passe dans l'œuf car au moment de la ponte ceux-ci en contiennent (McCarthy et Skinner, 1979 a; Lachaise et Hoffmann, 1982 et Chaix et de Reggi, 1982). Cependant, chez *Carcinus maenas* le taux des ecdystéroïdes de l'œuf augmente dès les premiers stades de développement, bien avant l'apparition de la bandelette germinative et donc de l'organe Y. Ce fait suggère que l'œuf serait capable de synthétiser des ecdystéroïdes avant l'apparition des organes Y. Les ecdystéroïdes embryonnaires pourraient jouer un rôle dans la sécrétion des enveloppes de l'œuf. Un autre aspect du rôle des ecdystéroïdes dans la reproduction des Crustacés est celui que semblent jouer ces molécules dans l'attraction du mâle par la femelle peu avant l'accouplement. Seifert (1982) a montré que l'eau de mer ayant contenu des femelles en prémue attirait les mâles ainsi que l'eau de mer contenant de la 20-hydroxyecdysone à 10^{-7} mol... Cependant les travaux réalisés sur le métabolisme des ecdystéroïdes (voir plus haut) montrent que les mâles et les femelles de crabes excrètent dans l'eau de mer les mêmes ecdystéroïdes et il semble qu'il en soit de même pour d'autres crabes (McCarthy et Skinner, 1979b). Ces observations posent le problème de la spécificité d'une telle attraction.

RÉGULATION DU TAUX DES ECDYSTÉROÏDES

Divers facteurs, chez les Crustacés Décapodes, interviennent dans la régulation du taux des ecdystéroïdes. Ce sont des facteurs soit nerveux soit hormonaux qui peuvent s'exercer à plusieurs niveaux :

- sur les récepteurs de ces hormones au niveau du tissu cible

- sur la synthèse de ces hormones
- sur la dégradation et/ou l'excrétion de ces hormones
- sur leur libération ou leur séquestration

Rôle de la «reproduction»

Chez le crabe *Carcinus maenas* il est bien connu que la maturation ovarienne bloque la mue et que l'un de ces phénomènes se déroule à l'exclusion de l'autre. De plus comme nous l'avons vu précédemment, le taux des ecdystéroïdes circulants est bas chez la femelle en vitellogénèse avancée alors que celui des ovaires croît avec l'accroissement de taille de ceux-ci. Si les ecdystéroïdes circulants semblent inhiber la vitellogénèse par l'intermédiaire des ganglions thoraciques ceux-ci semblent exercer, en retour, une action inhibitrice sur les organes Y (Adiyodi et Adiyodi, 1970).

Rôle des facteurs externes

La température a un rôle dans le blocage de la mue du homard Gilgan et Burns, (1977). Ces auteurs montrent que chez des animaux adultes placés à faible température (2-6 °C) l'injection de 20-hydroxyecdysone n'a aucun effet sur le déclenchement de la mue alors qu'à 15 °C ils observent une entrée en prémue dose-dépendante.

Rôle des pédoncules oculaires et de la MIH (Molt-Inhibiting Hormone)

Dès 1939 Abramowitz et Abramowitz avaient montré que l'ablation des pédoncules oculaires provoquait le déclenchement de la mue. D'autres auteurs ont ensuite montré que l'injection d'extraits de pédoncules oculaires inhibait la mue et que l'ablation des pédoncules oculaires provoquait une augmentation du taux des ecdystéroïdes hémolymphatiques (voir revue Chang, 1985). Selon Freeman et Bartell (1976) l'action de la MIH s'effectue par compétition de celle-ci avec les récepteurs de la 20-hydroxyecdysone. Keller et Schmid (1979) montrent que l'ablation des pédoncules oculaires provoque une augmentation de l'activité de synthèse des organes Y ce qui suggère une action directe de la MIH sur les organes Y, lieu de synthèse des ecdystéroïdes. Ce résultat est confirmé par les travaux récents de Watson et Spaziani (1985a et b). Ces auteurs mettent en évidence le ralentissement de la prise du cholestérol et de la synthèse des ecdystéroïdes par les organes Y en présence d'extraits de pédoncules oculaires.

DISCUSSION ET CONCLUSION

En conclusion, nous pouvons dire que les ecdystéroïdes ont un rôle prépondérant chez les Crustacés Décapodes, qu'ils interviennent à beaucoup de niveaux et que, si les travaux concernant leur identification, leur synthèse, leur métabolisme, leur rôle et leur régulation sont bien avancés ces questions sont loin d'être entièrement élucidées. Le modèle Crustacé s'il présente des similitudes avec l'Insecte à propos des ecdystéroïdes possède aussi de grandes particularités du fait, probablement, de leur adaptation au milieu marin :

1) Les organes Y sont capables de réaliser parallèlement deux types de synthèse à partir d'un même précurseur, ce qui pose un problème enzymologique intéressant

2) Les Crustacés sont capables de couper la chaîne latérale des ecdystéroïdes portant un hydroxyle en 20 et en 22 ce qui introduit une nouvelle classe d'ecdystéroïdes, dérivés de la poststérone, qu'il serait intéressant d'étudier.

3) A propos du mode d'action des ecdystéroïdes, un problème particulier à ce groupe est posé par la présence concomitante de deux hormones biologiquement très actives dans la mue des Arthropodes : la ponastérone A et la 20-hydroxyecdysone.

4) A l'inverse des Insectes les Crustacés possèdent une hormone inhibitrice mue dont l'action est encore mal connue.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ABRAMOWITZ, R.K. and ABRAMOWITZ, A.A., 1939. — Moulting and variability after removal of the eyestalk in *Uca pugnator*. *Biol. Bull. (Woods Hole)*, 77, pp. 326-327.
- ADIYOD, D.G. and ADIYODI, R.G., 1970. — Endocrine control of reproduction in decapod crustacea. *Biol. Rev. Camb. philos. soc.*, 45, pp. 121-166.
- BOLLENBACHER, W.E. and O'CONNOR, J.D., 1973. — Production of an ecdysone by crustacean Y-organs *in vitro*. *Am. Zool.*, 13, p. 1274.
- BOLLENBACHER, W.E., 1974. — *In vitro* secretions of Arthropod ecdysial glands : correlation with the *in vivo* system. Thèse, University of California, Los Angeles, U.S.A.
- BORST, D.W. and O'CONNOR, J.D., 1974. — Trace analysis of ecdysones by gas-liquid chromatography, radioimmunoassay and bioassay. *Steroids*, 24, pp. 637-656.
- BUTENANDT, A. und KARLSON, P., 1954. — Über die Isolierung eines Metamorphosehormons der Insekten in Kristallisierter Form. *Z. Naturforsch.*, 9b, pp. 389-391.
- CHAIX, J.C., MARVALDI J. and SECCHI, J., 1981. — Variations of ecdysone titer and hemolymph major proteins during the molt cycle of the spider crab *Acanthonyx lunulatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69 B, pp. 709-714.
- CHAIX, J.C. and de REGGI, M., 1982. — Ecdysteroid levels during ovarian development and embryogenesis in the spider crab *Acanthonyx lunulatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 47, pp. 7-14.
- CHANG, E.S. and O'CONNOR, J.B., 1977. — Secretion of ecdysone by crab Y-organs *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 74, pp. 615-618.
- CHANG, E.S., 1985. — Hormonal control of molting in Decapod Crustacea. *Am. Zool.*, 25, pp. 179-185.
- ECHALIER, G., 1954. — Recherches expérimentales sur le rôle de «l'organe Y» dans la mue de *Carcinus maenas* L. Crustacé Décapode. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 238, pp. 523-525.
- ECHALIER, G., 1955. — Rôle de l'organe Y dans le déterminisme de la mue de *Carcinides (Carcinus) maenas* L. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 238, pp. 1581-1583.
- FREEMAN, J. and BARTELL, C., 1976. — Some effects of the molt-inhibiting hormone and 20-hydroxyecdysone upon molting in the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 28, pp. 131-142.
- GILGAN, M.W. and BURNS, B.G., 1977. — On the reduced sensitivity of the adult male lobster (*Homarus americanus*) to ecdysterone at reduced temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.*, 58A, pp. 33-36.
- GORELL, T.A., GILBERT, L.I. and SIDDAL, J.B., 1972. — Studies on hormone recognition by Arthropod target tissues. *Amer. Zool.*, 12, pp. 347-356.
- HAAG, T., HETRU, C., NAKATANI, Y., LUU, B., PICHAT, L., 1985. — Synthesis of labelled ecdysone precursors : part I - Tritium labelled ($^3\text{H}_4$ -22,23,24,25) - 3 β , 14 α Dihydroxy - 5 β - Cholest - 7 - en - 6 - One. *J. Labelled Compd & Radiopharm.*, XXII, pp. 547-557.

- HAMPSHIRE, F. and HORN, D.H.S., 1966. — Structure of crustecdysone, a crustacean moulting hormone. *Chem. Comm.*, 2, pp. 37-38.
- HOFFMANN, J.A., LAGUEUX, M., HETRU, C., CHARLET, M. and GOLTZENE, F., 1980. — Ecdysone in reproductively competent female adults and in embryos of Insects. «Progress in ecdysone research» Hoffmann ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 431-465.
- HORN, D.H.S., WILKI, J.S., SAGE, J.S., and OCONNOR, J.D., 1976. — A high affinity antiserum specific for the ecdysone nucleus. *J. insect Physiol.*, 22, pp. 901-905.
- KELLER, R., and SCHMID, E., 1979; — *In vitro* secretion of ecdysteroids by Y-organs and lack of secretion by mandibular organs of the crayfish following molt induction. *J. Comp. Physiol.*, 130, pp. 347-353.
- KOOLMANJ, 1982. — Ecdysone metabolism. *Insect Biochem.*, 12, pp. 225-250.
- LACHAISE, F., GOUDEAU, M., HETRU, C. and HOFFMANN, J.A., 1981. — Ecdysteroids and ovarian development in the shore crab, *Carcinus maenas*. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.*, 362, pp. 521-529.
- LACHAISE, F. and HOFFMANN, J.A., 1982. — Ecdysteroids and embryonic development in the shore crab, *Carcinus maenas*. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.*, 363, pp. 1059-1067.
- LACHAISE, F. and LAFONT, R., 1984. — Ecdysteroid metabolism in a crab : *Carcinus maenas* L. *Steroids*, 43, pp. 243-260.
- LACHAISE, F., MEISTER, M.P., HETRU, C. and LAPONT, R., 1986. — Studies on the biosynthesis of ecdysone by the Y-organs of *Carcinus maenas*. *Mol. cell. Endocrinol.*, 45, pp. 253-261.
- LAFONT, R., SOMME-MARTIN, G. and CHAMBERT, I.C., 1982. — Sample processing for high performance liquid chromatography of ecdysteroids. *J. Chromatogr.*, 236, pp. 137-149.
- MCCARTHY, J.P., 1979. — Ponasterone A : a new ecdysteroid from the embryos and serum of Brachyuran Crustaceans. *Steroids*, 34, pp. 799-806.
- MCCARTHY, J.P. and SKINNER, D.M., 1979a. — Changes in ecdysteroids during embryogenesis of the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Dev. Biol.*, 69, pp. 627-633.
- MCCARTHY, J.P. and SKINNER, D.M., 1979b. — Metabolism of α -ecdysone in intermolt land crabs (*Gecarcinus lateralis*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 37, pp. 250-263.
- MCCARTHY, J.P., 1982. — Ecdysone metabolism in premolt land crabs (*Gecarcinus lateralis*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 47, pp. 323-332.
- SEIFERT, p., 1982. — Studies on the sex pheromone of the shore crab, *Carcinus maenas*, with special regard to ecdysone excretion. *Ophelia*, 21, pp. 147-158.
- SPINDLER, K.B., BECKERS, C., GROSHOL-STEWART, u. and EMMERICH, H., 1978. — A radioimmunoassay for arthropod molting hormones, introducing a novel method of immunogen coupling. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.*, 359, pp. 1269-1275.
- SPINDLER, K.B., KELLER, R. and O'CONNOR, J.D., 1980. — The role of ecdysteroids in the crustacean molting cycle. «Progress in ecdysone research» Hoffmann ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 247-280.
- STEVENSON, R., 1978. — The ecdysones and control of chitin synthesis in *Orcones*. *Freshwater Crayfish*, 4, pp. 123-130.
- WATSON, R.D. and SPAZIANI, E., 1982. — Rapid isolation of ecdysteroids from crustacean tissues and culture media using Sep-Pak C18 cartridges. *J. Liq. Chromatogr.*, 5, pp. 525-535.
- WATSON, R.B. and SPAZIANI, E., 1985a. — Effects of eyestalk removal on cholesterol uptake and ecdysone secretion by crab (*Cancer antennarius*) Y-organs *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 57, pp. 360-370.
- WATSON, R.B. and SPAZIANI, E., 1985b. — Biosynthesis of ecdysteroids from cholesterol by crab Y-organs, and eyestalk suppression of cholesterol uptake and secretory activity, *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 59; pp. 140-148.