

**ÉTUDE DE L'INFLUENCE D'UNE SURCHARGE
EN CHLORURE DE COBALT
SUR LA COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS LIBRES
DE L'HÉMOLYPHE DU CRUSTACÉ DÉCAPODE :
CARCINUS MAENAS L.**

par

J.-C. Amiard - J.-C. Harduin et G. Odilon

Commissariat à l'Energie Atomique
Département de Protection, Service de Recherches Toxicologiques et Ecologiques
B.P. N° & - 92260 Fontenay-aux-Roses
Laboratoire d'Analyses Médicales - Centre de La Hague, B.P. N° 209 - 50107 Cherbourg

Résumé

La concentration moyenne de treize acides aminés libres de l'hémolymphe du Crustacé Décapode : *Carcinus maenas* L. présente des différences significatives (test de Student) lorsque les animaux sont maintenus en présence d'une surcharge de 10 mg/l de chlorure de cobalt.

Dix acides aminés « non essentiels » (acides cystéique, aspartique et glutamique, taurine, glycine, alanine, 1-méthyl-histidine, arginine et ASN+glutamine) voient leurs concentrations augmenter chez les individus « pollués » tandis que pour trois acides aminés « essentiels » (méthionine, lysine et histidine), leurs concentrations diminuent chez les animaux « pollués ».

Ces acides aminés ont des rôles connus dans le métabolisme : osmorégulation, synthèse d'acides aminés, rôle énergétique, etc.

Introduction

Les acides aminés ont un rôle très important chez les Crustacés puisqu'ils sont liés au métabolisme de base et ont des fonctions physiologiques nombreuses tant chez l'adulte (Florkin, 1960), que chez les embryons (Smaldon, 1973) et les larves (Regnault, 1971). La composition en acides aminés libres de ce groupe zoologique présente de grandes variations liées aux stades embryonnaires (Smaldon, 1973), larvaires (Regnault, 1971) ou d'intermues (Torres, 1973). Le pool d'acides aminés libres chez les Crustacés semble également varier suivant la saison (Lynch et Webb, 1973), le jeûne (Torres, 1973) et les diverses espèces. D'autre part, la biosynthèse (Zandee, 1966) et les cycles de catabolisme et d'anabolisme (Huggins, 1966 ; Vatsis et Schatzlein, 1972) des acides aminés chez ces animaux ont fait l'objet de plusieurs études.

Chez l'homme, le travail du plomb déclenche une maladie (saturnisme) entraînant de nombreuses perturbations biologiques et notamment l'apparition dans les urines d'un acide aminé particulier : l'acide delta aminolévulinique (A.A.L.) (Danieli et coll., 1961 ; Davis et coll., 1968 ; Haeger-Aronsen, 1957 et 1960 ; Harduin, 1971). Aussi avons-nous pensé que l'étude des variations du pool d'acides aminés libres dans l'hémolymphe du Crustacé pourrait être un intéressant test de toxicité subléthale des pollutions métalliques (Amiard et Amiard-Triquet, 1974).

Matériel et méthodes

Parmi des *Carcinus maenas* L. récoltés en Manche (Cherbourg) au mois d'août, nous avons sélectionné les crabes se trouvant au stade d'intermue C₄ (Drach, 1939) de poids 20 à 50 g et de largeur frontale comprise entre 40 et 60 mm.

Les crabes sont placés individuellement dans des seaux en plastique blanc renfermant 2 litres d'eau de mer naturelle (Goury, Manche). Un huilage assure une aération et un brassage de l'eau. Ces seaux sont placés dans une salle dont la température est réglée à $15^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Le groupe témoin est constitué de quinze individus. Le test de toxicité a porté sur quinze crabes, maintenus dans les mêmes conditions, mais à l'eau desquels on a ajouté une surcharge de chlorure de cobalt de 10 mg/l.

A la fin de l'expérience (8 jours), nous prélevons 1 à 2 ml d'hémolymphe sur chacun des 30 individus. L'hémolymphe est recueillie dans des flacons à pénicilline héparinés.

La préparation des échantillons, l'appareillage et le système d'analyse des acides aminés par voie automatique dans l'éluat ont déjà été décrits par Harduin (1971). Rappelons cependant que ces analyses sont réalisées sur un auto-analyseur « Technicon ».

L'intégration de la surface des pics a été faite par une méthode manuelle. Cependant, les calculs de concentration ont été effectués par ordinateur.

Tous nos résultats sont exprimés en mg pour 100 ml d'hémolymphe.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de notre expérience sont rassemblés dans le tableau 1. Pour chaque acide aminé, un test de Student a été effectué afin de mettre en évidence des différences significatives (à 95 et 99 p. 100) entre les teneurs moyennes chez les individus pollués et chez les témoins.

Treize différences significatives sont ainsi relevées (avec, dans sept cas, une probabilité de 99 p. 100). Elles concernent les acides

TABLEAU 1

Les teneurs en acides aminés de l'hémolymphe de *Carcinus maenas* chez les individus témoins et pollués et les variations significatives de ces teneurs.

	Individus témoins 15 ind. stade C ₁		Individus pollués 15 ind. stade C ₁		Acides aminés « essentiels » = + « non essentiels » = -	Test de Student non significatif = 0 significatif à 0,05 = + à 0,01 = ++	Concentration en acides aminés des ind. pollués supérieure = ΔV ou inférieure = ΛV aux individus témoins
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type			
Acide cystéique	0,06	0,07	0,21	0,18	-	++	>
Taurine	5,87	2,72	13,31	6,17	-	++	>
Hydroxyproline	0,17	0,22	0,02	0,04	-	+	Λ
Thréonine	0,71	0,50	0,52	0,21	+	0	
Acide aspartique	0,10	0,09	0,20	0,13	-	+	>
Sérine	1,06	1,19	0,48	0,18	-	0	
ASN + Glutamine	7,43	2,81	9,99	3,49	-	+	>
Proline	5,65	3,02	5,57	7,55	-	0	
Acide glutamique	0,36	0,16	0,52	0,30	-	+	>
Citrulline	0,18	0,22	0,20	0,19	-	0	
Glycine	3,18	1,62	6,68	2,31	-	++	>
α alanine	2,22	0,77	6,13	2,84	-	++	>
Acide α butyrique	0,21	0,19	0,15	0,12	-	0	
Valine	0,79	0,73	0,55	0,22	+	0	
Cystine	0,28	0,14	0,25	0,10	-	0	
Méthionine	0,65	0,61	0,10	0,05	+	++	Λ
Isoleucine	0,57	0,76	0,38	0,14	+	0	
Leucine	0,89	0,97	0,51	0,17	+	0	
Tyrosine	0,53	1,02	0,33	0,22	-	0	
Phénylalanine	0,27	0,42	0,27	0,11	+	0	
Ethanolamine	0,22	0,10	0,20	0,10	-	0	
Ornithine	0,19	0,26	0,19	0,08	-	0	
Tryptophane	0,20	0,14	0,32	0,40	+	0	
Lysine	0,32	0,23	0,16	0,11	+	+	Λ
1 Méthylhistidine	0,03	0,03	0,08	0,05	-	++	>
Histidine	0,24	0,16	0,15	0,06	+	+	Λ
3 Méthylhistidine	0,18	0,17	0,12	0,16	-	0	
Arginine	2,63	1,39	4,23	1,80	-	++	>
Quantité totale	35,37		51,82				
Quantité totale d'acides aminés « essentiels »	4,64		2,96				
Quantité totale d'acides aminés « non essentiels »	30,73		48,86				

cystéique, aspartique et glutamique, la taurine, la glycine, l'alanine, la méthionine, la 1-méthyl-histidine, l'arginine, l'ASN + glutamine, la lysine et l'histidine dont trois sont considérés comme « essentiels » (méthionine, lysine et histidine) (Fig. 1).

Les acides aminés sont fréquemment séparés en « essentiels » et « non essentiels », les acides aminés « essentiels » étant ceux qui ne sont pas

synthétisés par l'organisme à partir de la nourriture ou par le transfert entre acides aminés de chaînons carbonés ou de radicaux azotés.

A l'examen des listes dans les différents groupes zoologiques et, en particulier, chez les Arthropodes (Golberg et De Meillon, 1948 ; Singh et Brown, 1957 ; Deuchar, 1962 ; Cowey et Forster, 1971 ; Regnault, 1971), nous retiendrons arbitrairement la liste de Zandee (1966) à laquelle nous ajouterons la méthionine et le tryptophane (c'est-à-dire la liste de Harduin 1961 en y joignant l'histidine) (Tableau 1).

Les acides aminés « essentiels » voient leur teneur diminuer dans les animaux pollués. Par contre, à l'exception de l'hydroxylo-

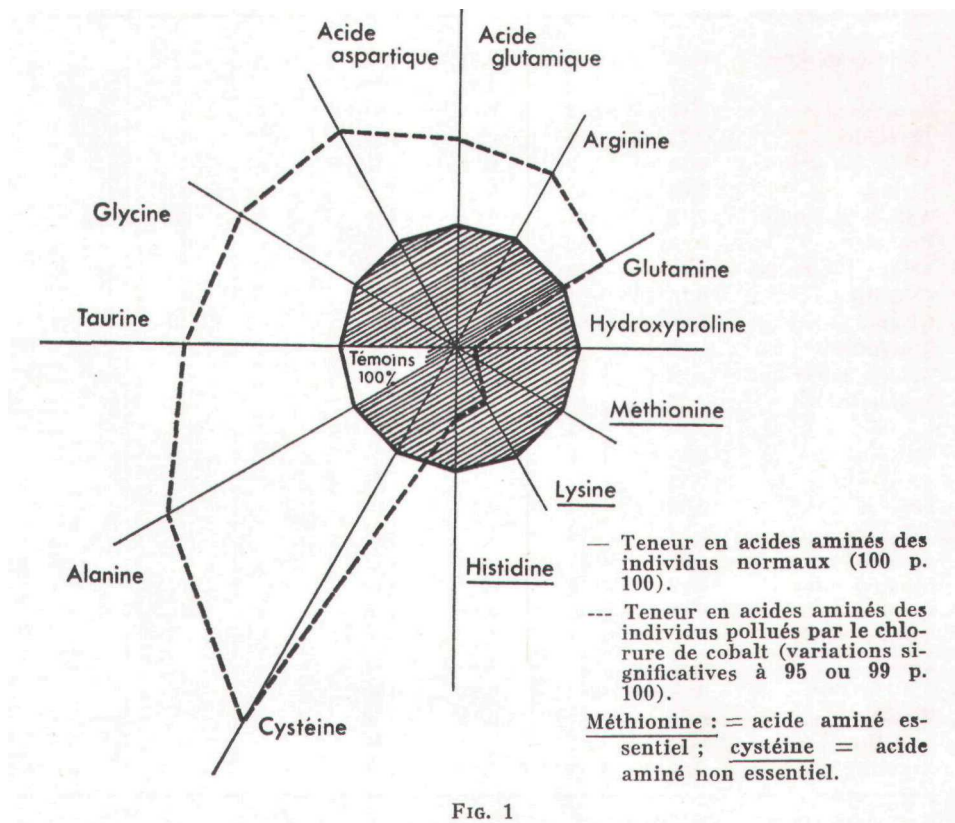


FIG. 1

Influence de la pollution par le chlorure de cobalt sur la teneur de l'hémolymphe de *Carcinus maenas* en acides aminés.

prine, la teneur des acides aminés « banaux » augmente chez les individus pollués (Fig. 1).

En recherchant dans la littérature le rôle attribué aux divers acides aminés, en particulier chez les Crustacés, nous nous apercevons que la majorité des acides aminés dont la teneur varie entre les deux lots a des fonctions bien précises et importantes tandis que la plupart des autres n'ont aucun rôle connu ou des fonctions mineures. Ainsi, la glycine et la taurine (auxquels Briceux-Grégoire et coll., 1962, ajoutent l'alanine, l'acide glutamique, la proline et l'arginine), qui ont un rôle dans l'osmorégulation et qui, par là même, doivent

combattre la surcharge en chlorure de cobalt, voient leur teneur augmenter chez les organismes pollués (Duchateau et coll., 1959). Il en est de même des acides aminés qui interviennent dans la synthèse d'autres acides aminés : acide aspartique et acide glutamique (Emerson, 1967) et de ceux qui ont un rôle énergétique non négligeable : alanine, arginine et acide glutamique (Regnault, 1971). La méthionine a un rôle dans la détoxification (Harduin, 1971) et voit sa teneur diminuer chez les animaux pollués. Nous devons signaler trois exceptions : la proline dont la concentration demeure inchangée dans les deux lots malgré son rôle connu dans les processus d'osmorégulation ; la lysine dont la teneur est affectée par la pollution alors qu'on lui connaît un rôle dans le métabolisme énergétique de l'embryon d'oursin (Kavanau, 1953) ; l'histidine qui, bien que n'ayant pas de rôle connu, présente une variation significative.

La présence de polluant dans le milieu expérimental n'entraîne pas de variations significatives de la concentration des acides aminés dont le rôle est inconnu ou mineur : leucine, isoleucine, thréonine, cystéine ; qui ont un rôle dans les processus de mues : sérine et tyrosine (Guttowa, 1969) ou dans la formation de protéines : valine.

Signalons également que la majorité des acides aminés qui présentent des variations significatives sont susceptibles d'établir des liaisons avec les ions métalliques (Platk, 1970).

En tenant compte de tous les acides aminés (significativement différents ou non), nous constatons que, dans la majorité des cas, les teneurs en acides aminés des individus pollués sont plus importantes que celles des individus témoins sauf en ce qui concerne les acides aminés « essentiels ». Cela se constate très nettement avec les quantités totales (Tableau 1). Nous pouvons rapprocher ce phénomène de celui observé par Le Bras et coll. (1973) qui constatent qu'une intoxication par le Lindan, la Thiourée ou l'Hempa (pesticides) provoquent une baisse importante de la protéinhémie.

Les teneurs en acides aminés de nos individus témoins sont différentes des valeurs disparates trouvées par d'autres auteurs, pour diverses espèces de Crustacés adultes, larves ou embryons (Tableau 2) (Evans, 1972 ; Smalton, 1973 ; Lynch et Webb, 1973 ; Lin et Cohen, 1973 ; Florkin, 1960 ; Camien et coll., 1951 ; Stewart et coll., 1966 et Torres, 1973). Cela n'a rien d'étonnant car la composition en acides aminés est considérablement influencée par les facteurs écologiques, physiologiques et spécifiques. Par ailleurs, Harduin (1971) constatait que les mesures des concentrations en acides aminés chez l'Homme variaient fortement d'un auteur à l'autre suivant les techniques utilisées et le nombre de sujets sur lequel portent les mesures. Ce nombre est en général faible et inférieur à 7, sauf dans notre cas où il atteint 15.

Comme la plupart des auteurs, nous constatons que les acides aminés les plus abondants sont la glycine, la proline et la taurine ainsi que l'ensemble ASN + glutamine puis viennent ensuite l'arginine, l'alanine et la sérine qui seuls présentent des concentrations supérieures à 1 mg/100 ml, les acides aminés essentiels ayant des concentrations « moyennes » comprises entre 0,20 et 0,90 mg/100 ml.

Nous devons également signaler que l'ion cobalt peut remplacer activement un certain nombre de métaux (Zn, Cu, Ni, etc.) dans la composition des métalloenzymes et que ces dernières ont un grand rôle dans l'anabolisme et le catabolisme des acides aminés (Yon, 1970 ;

Javilliers et coll., 1962 ; Boulanger et coll., 1972 ; Fruton et Simmonds, 1958 ; Hughes, 1972). Le cobalt peut également former des complexes avec certains acides aminés tels que l'histidine et la glycine (Williams, 1971).

L'étude des cycles de biosynthèse des métabolites et, en particulier, des acides aminés (Harper, 1965) ne donne pas de résultats très nets. De même, en raison de la complexité des interactions entre les diverses voies du catabolisme des acides aminés, nous ne pouvons pas expliquer complètement les différences de concentrations que nous observons entre les individus témoins et pollués.

Conclusions

La composition en acides aminés libres de l'hémolymphe est influencée par la surcharge en chlorure de cobalt (10 mg/l) que nous avons effectuée dans le milieu expérimental et se révèle ainsi être un bon test d'étude de toxicité sub-léthale et de détection des effets des pollutions métalliques. Rappelons que l'eau de mer contient en moyenne 0,03 µg/l de cobalt dans la Manche (Robertson, 1970) et que nous avons constaté que, chez *Carcinus maenas*, le chlorure de cobalt entraîne 50 p. 100 de léthalité en 96 h, pour des concentrations comprises entre 500 et 1.500 mg/l (Amiard, 1975).

Les concentrations des acides aminés sont affectées dans presque la moitié des cas chez les individus pollués, les acides aminés « essentiels » voyant leur concentration diminuer tandis que les concentrations en acides aminés « non essentiels » augmentent chez les individus contaminés par le cobalt. La majorité des acides aminés influencés par cette pollution a un rôle dans l'osmorégulation, la synthèse d'autres acides aminés ou dans le métabolisme énergétique. Par contre, ceux dont la teneur est inchangée n'ont généralement pas de rôles connus ou des fonctions mineures.

Il semble que le crabe lutte contre la surcharge en chlorure de cobalt :

- en cherchant à maintenir constante sa composition en acides aminés essentiels sans toutefois y parvenir parfaitement ;
- en accumulant les acides aminés ayant un rôle énergétique ou une fonction osmorégulatrice.

Dans cette hypothèse, plusieurs points restent obscurs : la relative stabilité de la proline, les baisses de concentration de la lysine et surtout de la méthionine qui serait un agent de détoxication.

Zusammenfassung

Studie über den Einfluss auf die Zusammensetzung der freien Amino-Säure der Hämolymphe von Zehnfüssler-Schaltieren : *Carcinus maenas* L., durch eine Übermenge an Kobaltchlorid.

Die mittlere Konzentration von 13 freien Amino-Säuren der Hämolymphe von Zehnfüssler-Schaltieren : *Carcinus maenas* L. zeigt bedeutsame Unterschiede (Student Test), wenn die Tiere unter dem Einfluss einer Übermenge von 10 mg/l von Kobaltchlorid gehalten werden.

Zehn « unbedeutende » Aminosäuren (Cysteinsäure, Asparaginsäure, Glutamin-

säure, Taurin, Glycin, Alanin, 1-methyl-Histidin, Arginin, ASN+Glutamin) erhöhen ihre Konzentration bei den verseuchten Tieren während die Konzentration für 3 « bedeutende » Aminosäuren (Methionin, Lysin, Histidin) siehe bei den Tieren Vermindert.

Diese Aminosäuren haben bekannte Aufgaben im Stoffwechsel : Osmo-Regulierung, Aminosäuren-Synthese, Energetische Funktionen...

Summary

Influence of an overload of cobalt chloride on the haemolymph composition of the Decapod Crustacea: *Carcinus maenas* L. in free amino acids.

Significant differences (Student's test) were found in the average concentration of thirteen free amino acids of the hemolymph of the Decapod Crustacea: *Carcinus maenas* L., when the animals were maintained in an environment overloaded with 10 mg/l of cobalt chloride.

In « polluted » animals the concentration of ten « non essential » amino acids (cysteic, aspartic and glutamic acids, glycine, alanine, 1-methylhistidine, arginine and ASN + glutamine) increased whereas the concentration of three « essential » amino acids (methionine, lysine and histidine) decreased.

The functions of these amino acids on metabolism (osmoregulation, amino acid synthesis, energetic function,...) are well known.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- AMIARD, J.-c., 1975. — Etude expérimentale de la toxicité aiguë de sels de cobalt, d'antimoine, de strontium et d'argent chez quelques Crustacés et leurs larves et chez quelques Téléostéens (en préparation).
- AMIARD, J.-C. et AMIARD-TRIQUET, C., 1975. — The different methods for studying the biological consequences of metallic pollutions in the aquatic environment. 1st World Congress of Environmental Medicine and Biology, 1-5 juillet 1974, Paris. Elsevier Publishing Company éd., Amsterdam (sous presse).
- BOULANGER, p., POLONOVSKI, J., TAYEAU, F., MANDEL, p. et BISERTE, G., 1972. — Biochimie médicale. 1. - Les constituants des organismes vivants. Masson éd., Paris. 373 pp.
- BRICTEUX-GRÉGOIRE, S., DUCHATEAU-BOSSON, G., JEUNIAUX, C. et FLORKIN, M., 1962. — Constituants osmotiquement actifs des muscles du crabe chinois *Eriocheir sinensis*, adapté à l'eau douce ou à l'eau de mer. *Arch. Intern. Physiol. Bioch.* 70 (2), pp. 273-286.
- CAMIEN, M.N., SARLET, H., DUCHATEAU, G. et FLORKIN, M., 1951. — Non-protein amino acid in muscle and blood of marine and freshwater Crustacea. *J. Biol. Chem.* 193, pp. 881-885.
- COWEY, c.B. et FORSTER, J.R.M., 1971. — The essential amino acid requirements of the prawn *Palaemon serratus*. The growth of prawns on diets containing protéins of different amino acid composition. *Mar. Biol.* 10, pp. 77-81.
- DANIELI, G., GAJDOS, A. et GAJDOS-TOROK, M., 1961. — Un nouveau test biologique du saturnisme : augmentation du taux urinaire et plasmatique de l'acide delta-aminolévulinique. *Pathol. Biol.* 9, pp. 1481-1486.
- DAVIS, J., ABRAHAMS, R., FISHBEIN, w. et FABREGA, E., 1968. — Urinary delta aminolevulini acid levels in lead poisoning. *Arch. environ. Health* 17, pp. 164-171.
- DEUCHAR, EM., 1962. — The roles of amino-acids in animal embryogenesis. *Biol. Rev.* 37, pp. 378-421.
- DRACH, p., 1939. — Mue et cycles d'intermue chez les Crustacés Décapodes. *Ann. Inst. océanogr., Monaco* 19, pp. 103-391.
- DUCHATEAU, G., FLORKIN, M. et JEUNIAUX, C., 1959. — Composante amino-acide des tissus chez les Crustacés. I. - Composante amino-acide des muscles de *Carcinus maenas* L. lors du passage de l'eau de mer à l'eau saumâtre et au cours de la mue. *Arch. Intern. Physiol. Bioch.* 67, pp. 489-500.
- EMERSON, D.N., 1967. — Some aspects of free amino-acid metabolism in developing encysted embryos of *Artemia salina*, the brine shrimp. *Comp. Biochem. Physiol.* 20, pp. 245-261.
- EVANS, P.D., 1972. — The free amino acid pool of the haemocytes of *Carcinus maenas* L. *J. exp. Biol.* 56, pp. 501-507.

- FLORKIN, M., 1960. — Blood chemistry. The physiology of Crustacea, Waterman, T.H. ed., Academic Press, New York, 1, pp. 141-159.
- FRUTON, J.S. et SIMMONS, s., 1958. — General Biochemistry 2nd éd. Wiley & Sons éd., New York, 1077 pp.
- GOLBERG, L. et DE MEILLON, B., 1948. — The nutrition of the larva of *Aedes aegypti* L. 4. Protein and amino-acid requirements. *Biochem. J.* 43, pp. 379-387.
- GUTOWA, A., 1969. — Amino acid in coelomic fluids of Copepoda, hosts of pseudo phyllidean proceroids. *Acta parasitol. pol.* 16 (26), pp. 239-248.
- MAEGER-AHONSEN, B., 1957. — Increased content of a delta amino levulinic acid like substance in urine from workers in lead industry. *Scand. J. din. Lab. Invest.* 9, pp. 211-212.
- HAEGER-ARONSEN, B., 1960. — Studies on urinary excretion of delta amino levulinic acid and other haem precursors in lead workers and lead-intoxicated rabbits. *Scand. J. din. Lab. Invest.* 12, suppl. 47, 128 pp.
- HARDUIN, J.-C., 1971. — Surveillance biotoxicologique des travailleurs exposés à un risque de saturnisme. Etude systématique des amino-acides urinaires et plasmatiques. Rapport CEA-R-4249, 190 pp.
- HARPER, H., 1965. — Précis de Biochimie. Collection U, Armand Colin éd., Paris, 470 pp.
- HUGGINS, A.K., 1969. — The metabolism of 2-¹⁴C sodium acetate by the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of alterations in salinity. *Comp. Biochem. Physiol.* 29, pp. 439-445.
- HUGHES, M.N., 1972. — The Inorganic Chemistry of Biological Processes. Wiley & Sons éd., New York, 300 pp.
- JAVILLIERS, M., POLONOSKI, M., FLORKIN, M., BOULANGER, P., LEMOIGNE, M., ROCHE, J. et WURMSER, R., 1962. — Traité de Biochimie générale. Masson éd., Paris.
- KAVANAU, J.L., 1953. — Metabolism of free amino-acids, peptides and proteins in early sea-urchin development. *J. exp. Zool.* 122 (2), pp. 285-338.
- LE BRAS, s., ECHAUCHARD, M. et RAMADE, F., 1973. — Variations de la protéinémie chez *Musca domestica* au cours d'un cycle gonotrophique dans les conditions normales et après action d'agents toxiques. *Bull. Soc. zool. France* 98 (3), pp. 385-403.
- LIN, s. et COHEN, H.P., 1973. — Crayfish ventral nerve cord and hemolymph content of free amino acids and other metabolites. *Comp. Biochem. Physiol.* 45 B, pp. 249-263.
- LYNCH, M.P. et WEBB, K.L., 1973. — Variations in serum constituents of the blue crab *Callinectes sapidus*: free amino acids and total ninhydrin positive substances. *Comp. Biochem. Physiol.* 45 B, pp. 407-418.
- PLAK, M., 1971. — Généralités sur les interactions entre les ions métalliques et les macromolécules biologiques. Ecole d'été de Roscoff, 19-24 mai 1970, p. 47. Editions du C.N.R.S., Paris.
- REGNAULT, M., 1971. — Acides aminés libres chez les larves de *Crangon septemspinosa* (Caridae). Variation de leur taux de l'éclosion à la métamorphose. Leur rôle au cours du développement et leur importance dans la nutrition. *Afar. Biol.* 11, pp. 35-44.
- ROBERTSON, D.E., 1970. — The distribution of cobalt in oceanic waters. *Geochim. Cosmochim. Acta* 34, pp. 553-567.
- SINGH, K.R.P. et BROWN, A.w.A., 1957. — Nutritional requirements of *Aedes aegypti* L. *J. Ins. Physiol.* 1, pp. 199-220.
- SMALDON, O., 1973. — Free pool amino acids in the developing embryos of *Pisidia longicornis* L. (Decapoda, Anomura). *Comp. Biochem. Physiol.* 44 B, pp. 711-714.
- STEWART, J.E., DINGLE, JR. et ODENSE, P.H., 1966. — Constituents of the hemolymph of the Lobster, *Homarus americanus* Milne-Edwards. *Can. J. Biochem.* 44, pp. 1447-1459.
- TORRES, c., 1973. — Variations du pool des acides aminés libres du muscle abdominal de *Penaeus kerathurus* au cours du cycle d'intermue et au cours du jeûne. *Comp. Biochem. Physiol.* 45 B, pp. 1-12.
- VATSIS, K.p. et SCHATZLEIN, p.c., 1972. — Tricarboxylic acid cycle enzymes of the striped shore crab, *Pachygrapsus crassipes*. *Comp. Biochem. Physiol.* 42 B, pp. 591-610.
- WILLIAMS, DR., 1971. — The metals of life. The solution chemistry of metal ions in biological systems. Van Nostrand Reinhold éd. Belgique, 275 pp.
- YON, v., 1971. — Action des ions métalliques sur les protéines. Ecole d'été de Roscoff, 19-24 mai 1970, p. 85. Editions du C.N.R.S., Paris.
- ZANDEE, D.I., 1966. — Metabolism in the crayfish *Astacus astacus* (L.). I. - Biosynthesis of amino acid. *Arch. Intern. Physiol. Bioch.* 74 (1), pp. 35-44.