

ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DES FRACTIONS SÉRIQUES DE *MACROPIPUS PUBER* (LINNÉ) MÂLE SÉPARÉES PAR ÉLECTROPHORÈSE DE ZONE.

par

Walter Ghidalia, Marcelle Vicomte et King Bien Tan

Laboratoire de Zoologie, Faculté des Sciences de Paris
et Institut de Recherches scientifiques sur le Cancer, Villejuif.

Résumé

Les fractions protéiques, séparées par électrophorèse de zone sur support sélectif, à partir de l'hémolymph de *Macropipus puber* (L.) mâle ont été étudiées du point de vue de leurs propriétés enzymatiques. Six activités différentes ont été mises en évidence.

Soumises à électrophorèse en gel de Sephadex-G.200-agarose-amidon (Ghidalia, Vendrely, Coirault, 1970a) et en système de tampons discontinus tris-glycine, les protéines sériques de *M. puber* se répartissent en quatorze fractions (Ghidalia, Vendrely, Coirault, 1970b) dont certaines de nature cuproprotéique. Afin de pouvoir, sinon les identifier, du moins les distinguer entre elles, l'étude de leurs activités enzymatiques a été entreprise. Le but de cette recherche fut de retrouver, au niveau de ces différentes fractions, les principales activités déjà signalées dans la littérature à propos du sérum des Crustacés. Huit activités ont ainsi été recherchées.

I. - ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DES FRACTIONS CUPRIQUES.

Elles sont au nombre de trois et ont été traditionnellement attribuées à l'hémocyanine.

A. Activité oxydasique.

Une activité oxydasique du sérum de Langouste et d'Ecrevisse envers la teinture de gaïac et le réactif de Rohman et Spitzer (Nadi) avait été signalée dès 1897 (Abelous et Biarnes a et b). Des recherches plus récentes ont montré que le sérum de Crabe présente la même activité (Pinhey, 1930 ; Bhagvat et Richter, 1938 ; Zuckerkandl, 1953).

1. Conditions expérimentales.

a. Les substrats.

Divers substrats ont été utilisés dont :

- des phénols :
un monophénol : le chlorhydrate de tyramine ;
deux diphénols : l'adrénaline et le pyrocatechol ;
- des amines :
la paraphénylènediamine (1-4 Diaminobenzène) ;
l'orthodiansidine (3-3' Dimethoxybenzidine).

b. Composition des solutions.

- Phénols :
 - réactifs normaux : solution à 4 p. 100 dans du tampon phosphate pH 6,7 ; M = 0,1 ;
 - réactifs plus l'activateur : id. plus de l'oléate de sodium dans une proportion de 6 p. 100 ;
 - réactifs plus l'inhibiteur : id. plus azothydrate de sodium à 1,6 p. 100.
- Amines :
 - réactifs normaux :
paraphénylènediamine : 21,6 mg de substrat dans 100 ml de tampon acétate pH 5,7 ; M = 0,1 (Uriel, 1958a) ;
dianisidine : 100 mg de substrat plus 30 ml d'alcool à 95°, plus 70 ml de tampon acétate pH 5,7 ; M = 0,1 (Owen et Smith, 1961, composition légèrement modifiée) ;
 - réactifs plus l'inhibiteur : id. plus azothydrate de sodium à 1,6 p. 100.

c. Mode opératoire.

Les électrophorégrammes sont immergés pendant deux heures dans les solutions des réactifs, puis ils sont soigneusement rincés afin d'éliminer le substrat en excès. Avec les amines, il est recommandé de laisser les réactions s'effectuer à 37°.

2. Résultats.

a. Avec les phénols.

Une réaction diphénoloxydasique très nette caractérise les fractions 1, 2, 3, 6, 7 et 8. L'intensité de leur coloration dépend du substrat utilisé. Les réactions, discrètes mais perceptibles avec l'adrénaline, deviennent intenses avec le pyrocatechol. Dans ce dernier cas, une très légère coloration apparaît sur l'emplacement des bandes 10 et 11 (Planche I, 1).

Aucune activité monophénoloxydasique n'a pu être décelée avec le chlorhydrate de tyramine comme substrat.

L'addition à ces différents réactifs d'oléate de sodium, qui est un activateur efficace des polyphénoloxydases des Insectes, ne détermine aucune intensification de l'activité enzymatique des fractions.

b. Avec les amines.

Paraphénylènediamine et O. dianisidine mettent toutes deux en évidence l'existence d'une activité aminooxydasique qui apparaît liée aux fractions 1, 2, 6 et 8.

La seconde fraction réagit de manière constante, la troisième fréquemment, la première et la quatrième occasionnellement.

Mais, que le substrat soit constitué par des phénols ou des amines, l'aspect des préparations demeure sensiblement le même lorsqu'un inhibiteur des oxydases, l'azothydrate de sodium, est ajouté à la solution du réactif. Bien plus, il arrive souvent, assez paradoxalement,

que cette substance agisse comme activateur. La comparaison entre électrophorégrammes témoins traités par le réactif à la paraphénylène-diamine et électrophorégrammes soumis à l'action du même réactif additionné d'azothydrate de sodium, est de ce point de vue significative. On constate, en effet, dans le second cas, une intensification de la réactivité des bandes et parfois l'apparition d'une réaction positive au niveau de fractions qui ne réagissent pas sur les électrophorégrammes témoins. Une dialyse du sérum, préalable à l'électrophorèse, produit des effets semblables. Un phénomène analogue avait déjà été signalé par Bhagvat et Richter (cf. § 3). Toutefois, ni l'azothydrate de sodium, ni la dialyse ne provoque l'apparition d'une réaction positive au niveau des fractions qui ne sont pas réactives dans les conditions normales d'expérimentation.

3. Conclusions.

Toutes les activités oxydasiques observées sont le fait de fractions cupriques. La réactivité de ces dernières dépend du substrat utilisé ; elle est notable avec le pyrocatechol, mais très atténuée avec l'adrénaline. Enfin, quatre fractions seulement réagissent avec la paraphénylènediamine.

Ces caractéristiques, lorsqu'on les confronte avec celles des deux types d'activité oxydasique définis par Bhagvat et Richter, situent la réactivité de la plupart des fractions de *Macropipus puber* à mi-chemin entre celle de l'hémocyanine et celle de la phénoloxydase leucocytaire de *Cancer pagurus* (tableau ci-dessous).

Substrats	E S P È C E S							
	Cancer pagurus		Macropipus puber mâle					
	F r a c t i o n s							
	Hémocyanine	Phénoloxydase leucocytaire	1	2	3	6	7	8
Pyrocatéchol	+	+	+	+	+	+	+	+
Adrénaline	ε	+	ε	ε	ε	ε	ε	ε
Paraphénylène-diamine	+	—	+	+	—	+	—	+

Réactivité des fractions sériques de *Macropipus puber* mâle présentant une activité oxydasique envers différents substrats. Comparaison avec les deux types de réaction oxydasique mis en évidence chez *Cancer pagurus*.

Il n'y a identité avec l'un des types, en l'occurrence le type hémocyanique, que dans le cas des quatre fractions 1, 2, 6 et 8 dont la réactivité envers la paraphénylènediamine est manifeste. Toutefois, deux objections sérieuses font qu'il est difficile de leur attribuer, en toute certitude, une nature hémocyanique. En effet, d'une part, le pouvoir oxydant de ce pigment ne serait pas spontané, il n'apparaît que lors de la dénaturation de celui-ci (Burk, 1940 ; Bodine et Allen, 1941 ; Zuckerkandl, 1953). Or, sur les électrophorégrammes examinés, cette activité se manifeste sans dénaturation préalable de l'hémocyanine. La possibilité qu'un tel phénomène se réalise, ne serait-ce

que partiellement, en cours d'électrophorèse ne peut toutefois être écartée à priori.

D'autre part, l'hémocyanine n'est pas la seule substance qui réagisse avec la paraphénylènediamine, une autre cuproprotéine au moins est dans ce cas, c'est la céruloplasmine qui appartient au groupe des α_2 globulines. En fait, ce substrat est couramment utilisé pour détecter cette protéine sur les électrophorégrammes de sérum de Mammifères (Uriel, 1958 a et b) ; il en est de même de la dianisidine (Owen et Smith, 1961). Or, en utilisant ce dernier produit, Manwell et Baker (1963) pensent avoir mis en évidence dans le sérum de certains Crustacés dont *Callinectes sapidus*, *Emerita talpoida*, *Menippe mercenaria* et *Penaeus* sp. entre autres, une « dianisidine-oxydase », qui serait, selon eux, de nature voisine sinon identique à celle de la céruloplasmine des Mammifères.

L'existence dans le sérum de Crustacé d'une telle « dianisidine-oxydase » qui réagit également avec la paraphénylènediamine, rend problématique toute identification des fractions hémocyaniques, basée sur ce seul et dernier critère.

L'activité oxydasique des fractions 3 et 7, qui ne se distingue de celle de la phénoloxydase leucocytaire de *C. pagurus* que par une moindre réactivité envers l'adrénaline, n'a pu être jusqu'ici rapportée à un type de protéine déterminé.

Les résultats exposés diffèrent au moins sur deux points de ceux cités dans la littérature :

- aucune réaction monophénoloxydasique n'a pu être détectée ;
- l'activité oxydasique s'est toujours manifestée spontanément, sans nécessité d'activation préalable.

Le premier de ces faits est d'autant plus surprenant qu'une activité monophénoloxydasique a été trouvée dans le sérum d'une Ecrevisse du genre *Cambarus* (Bodine et Allen, 1941) et dans le plasma d'un Crabe de l'espèce *Uca pugnax* (N.M. Summers Jr, 1967). Il est toutefois vrai que la phénoloxydase de *Calliphora erythrocephalus* est également inactive envers les monophénols (Karlson et Liebau, 1961).

La seconde divergence est, par contre, plus aisément explicable. Plusieurs travaux ont montré que, chez *Cancer pagurus*, la phénoloxydase présente dans l'hémolymph, se trouve normalement sous une forme inactive qualifiée de prophénoloxydase ou phénoloxydase latente (Decleir et Vercauteren, 1965) à l'intérieur de certains leucocytes granulaires (Decleir, Aerts et Vercauteren, 1960). Elle n'apparaît dans l'hémolymph que lors de la lyse de ces cellules (Pinhey, 1929). Elle peut être facilement extraite de celles-ci et activée par l'action de différents agents chimiques ou physiques. En fait, lorsque cette opération n'est pas réalisée dans des conditions très rigoureuses de température, une partie de l'extrait obtenu se trouve déjà activée. Il est possible qu'un phénomène analogue se produise lorsque la coagulation de l'hémolymph s'effectue à la température du laboratoire. Cette activation naturelle de l'enzyme, lorsqu'elle se répand dans le sang après éclatement des cellules qui la renfermaient jusqu'alors, expliquerait les résultats positifs constatés par Pinhey, Bhagvat et Richter, ainsi que par les auteurs de la présente étude et cela sans qu'aucun activateur n'ait été introduit dans le milieu de réaction.

Deux autres facteurs, inhérents cette fois aux conditions expérimentales, ont peut-être suscité cette activation spontanée :

— la basse température à laquelle s'effectue l'électrophorèse ; Lewis (1962) a montré qu'à 0°, la dopaoxydase contenue dans les extraits de divers tissus de Crustacés et d'autres Invertébrés devenait progressivement réactive avec le temps. Il attribue ce fait à l'action d'une enzyme activatrice de la dopaoxydase, qui, présente à basses températures, serait détruite par des enzymes protéolitiques à des températures plus élevées ;

— la grande dilution par le tampon que subissent les protéines sériques en cours d'électrophorèse ; Bhagvat et Richter ont signalé qu'il se produisait après dialyse, une intensification de l'activité phénoloxydasique du sérum, tout se passant comme si un inhibiteur était éliminé au cours de cette opération. La dilution exercerait peut-être le même effet.

Enfin, il est également possible que cette activité enzymatique soit le fait d'une phénoloxydase analogue à celle que Summers (1967) a mise en évidence dans l'hémolymphe d'*Uca pugnax*. Essentiellement localisée dans le plasma, cette enzyme ne nécessite pas d'activation préalable.

Mais, à l'arrière-plan de toutes ces hypothèses et tentatives d'explication, se profile la question du crédit qu'il convient d'accorder à des réactions qui se produisent même en présence d'inhibiteurs. Il en résulte une forte probabilité pour que les activités oxydasiques constatées au cours de la présente étude soient dépourvues de toute signification physiologique réelle et qu'il s'agisse en fait de réactions pseudophénoloxydasiques.

Decleir et Veucateren (1967) avaient déjà émis une suggestion analogue à propos de la phénoloxydase leucocytaire de *Cancer pagurus*. Considérant que l'activation de cette enzyme requiert des doses considérables d'oléate de sodium, ces auteurs en viennent à se demander si l'activité oxydasique qu'ils constatent à propos de cette substance n'est pas un épiphénomène présenté par des protéines qui pourraient être des éléments constitutifs de la molécule d'hémocyanine.

Le problème des oxydases cupriques du sérum de Crustacés demeure donc entier.

B. Activité peroxydasique.

Le sérum de Crustacé mis en présence de peroxyde d'hydrogène et d'un accepteur d'oxygène, manifeste une activité peroxydasique marquée qui a souvent été attribuée à l'hémocyanine (Ghiretti, 1956 ; Manwell et Baker, 1963).

1. Conditions expérimentales.

a. Les substrats.

Il existe de nombreux substrats permettant la mise en évidence de cette activité. Leur rôle consiste à fixer l'oxygène libéré par la peroxydase à partir du peroxyde d'hydrogène. Cette phase de la réaction est peu spécifique et peut s'effectuer avec de très nombreux produits : polyphénols, amines ou leucodérivés.

Au cours de cette étude, on a utilisé les substrats suivants :

- Amines : la paraphénylènediamine ; la benzidine (Diaminodiphényl) ; l'orthodianisidine.
- Leuco-dérivés : zinc leuco de la fuchsine acide.

b. Composition des solutions.

- Paraphénylènediamine : 21,6 mg du substrat dans 98 ml de tampon acétate pH 4,7 ; M = 0,1. Chauffage à 37° jusqu'à dissolution complète, puis on ajoute 2 ml d'eau oxygénée à 3 p. 100. La solution doit être utilisée immédiatement.
- Orthodianisidine (Owen, Silberman et Got, 1958, composition légèrement modifiée) : 100 mg du substrat + 70 ml de tampon acétate pH 4,7 ; M = 0,1, + 28 ml d'alcool à 95° + 2 ml d'eau oxygénée à 3 p. 100.
- Benzidine : 100 mg du substrat dans 100 ml d'une solution d'acide acétique à 10 p. 100 + 2 ml d'eau oxygénée à 3 p. 100.
Il est recommandé d'ajouter à ces solutions quelques ml d'une solution d'azothydrate de sodium à 0,1 M afin d'inhiber les réactions oxydasiques qui pourraient éventuellement se produire.
- Leuco-dérivé (Lison, 1953) : la décoloration de la fuchsine acide est obtenue par chauffage en présence de zinc en poudre et d'acide acétique glacial. L'eau oxygénée est ajoutée au moment de l'emploi.

c. Mode opératoire.

Les électrophorégrammes sont mis à incuber quinze à vingt minutes dans la solution de réactif, puis rincés à l'eau distillée. Dans le cas des plaques traitées par la benzidine, le rinçage est effectué avec une solution d'acide acétique à 2 p. 100. La couleur bleue des protéines qui ont réagi positivement passe alors au marron.

2. Résultats.

La plupart des substrats donnent des résultats concordants. Le cas du zinc leuco de la fuchsine acide est à réserver. En effet, en dépit de modifications notables apportées dans sa composition, les différences sont peu importantes et uniquement d'ordre quantitatif. Que la fuchsine ait été décolorée préalablement ou utilisée telle quelle, que le peroxyde d'hydrogène ait été ajouté ou non à la solution du réactif, ce sont toujours les mêmes bandes qui réagissent.

Avec les trois autres réactifs, une réaction peroxydasique, plus ou moins intense selon les fractions considérées, se manifeste en plusieurs endroits de l'électrophorégramme. Ce sont toujours les fractions 1, 2, 3, 6, 7 et 8 qui présentent la réaction la plus accusée (Planche I, 2). Dans certains cas, une réaction positive mais discrète est également perceptible sur l'emplacement de la fraction 11. L'intensité de la coloration présentée par ces différentes fractions varie sensiblement en fonction du substrat employé et de l'état physiologique de l'animal donneur. D'une façon générale, avec la paraphénylènediamine, le fond de l'électrophorégramme se colore assez intensément. Cet inconvénient peut être facilement évité avec la dianisidine et la benzidine, les fractions ayant réagi positivement se détachent alors nettement sur le gel presque incolore ou légèrement teinté, en dépit d'une coloration peut-être moins intense que celle provoquée par le premier substrat.

La réactivité des diverses fractions ne demeure pas immuable tout au long du cycle d'intermue ; elle varie au cours des différents stades. C'est dans la seconde moitié de ce cycle, durant les étapes C et D, que cette activité est la plus marquée.

3. Conclusions.

L'activité peroxydasique présentée par le sérum de Crustacé est manifestement en rapport avec la présence de cuivre. Toutes les fractions qui répondent de façon positive sont des cuproprotéines. De plus, lorsque le cuivre lié aux protéines est éliminé par dialyse contre une solution de cyanure de potassium, on note une disparition concomitante de cette activité (Planche I, 3 et 4). L'addition d'acide acétique dont l'action démasquante sur le cuivre est bien connue, perturbe également le déroulement des expériences. Les bandes présentant une activité peroxydasique sont moins nombreuses et le temps de latence qui s'écoule entre le début de l'expérience et les premières manifestations de l'activité enzymatique est considérablement accru : deux heures en moyenne, alors que les réactions sont pratiquement instantanées dans les conditions normales. Cette relation indiscutable et maintes fois constatée entre cuproprotéines et activité peroxydasique fit que cette dernière fut très souvent imputée à l'hémocyanine. Mais la nature du métal associé à cette activité enzymatique n'est pas sans soulever quelques problèmes, car jusqu'à présent toutes les peroxydases connues, peroxydases du raifort ou du foie, myéloperoxydase ou lactoperoxydase, sont des ferroprotéines dérivées d'hèmes. C'est également le cas des protéines qui manifestent une activité pseudo-peroxydasique comme l'hémoglobine ou la chlorocruorine. En conséquence, l'activité peroxydasique de l'hémoglobine et celle de l'hémocyanine, au cas où cette dernière serait confirmée, ne semblent pas ressortir du même phénomène.

C. Recherche de l'activité catalasique.

L'activité catalasique du sérum de Crustacé peut être décelée par une expérience fort simple et très facile à réaliser. Il suffit de déposer une petite quantité de sérum dans un tube à essai et d'y ajouter quelques gouttes d'une solution de peroxyde d'hydrogène pour constater l'apparition d'un abondant dégagement d'oxygène.

1. Conditions expérimentales.

Les électrophorégrammes sont immergés dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 3 p. 100. Un dégagement de petites bulles d'oxygène révèle l'emplacement de l'enzyme (Uriel, 1958c).

2. Résultats.

L'étude n'a pu être réalisée qu'avec un gel et un tampon différents de ceux utilisés pour la mise en évidence des autres activités enzymatiques. En effet, la présence d'amidon dans le support semble perturber le déroulement de l'expérience ; le dégagement n'est plus localisé et s'effectue par tous les côtés de l'électrophorégramme. Presque instantanément, la surface du gel se couvre d'une pellicule bulleuse qui rend impossible la détection des emplacements correspondant aux sites d'activité enzymatique. Très rapidement, le gel apparaît comme truffé de bulles dans toute son épaisseur. Sa consistance devient gélatineuse et il en résulte une grande fragilité des électrophorégrammes.

En gel de Sephadex G 200-agarose et en tampon véronal, par contre, les résultats sont spectaculaires. Une dizaine de minutes environ après que l'électrophorégramme ait été mis en contact avec la solution de peroxyde, on remarque un dégagement d'oxygène nettement localisé qui s'intensifie progressivement. Très rapidement, l'accumulation des bulles finit par constituer deux bandes assez épaisses orientées parallèlement au réservoir de dépôt des sérums. Lorsqu'on disperse les bulles, le dégagement gazeux qui se poursuit reconstitue les bandes disloquées, aux mêmes endroits que précédemment. La délimitation de ces bandes par des encoches latérales, préalablement à la coloration de l'électrophorégramme, par le Noir Amido 10 B et la dithiooxamide, permet de constater que le dégagement d'oxygène se produit sur l'emplacement exact des deux principales fractions cupriques. Compte tenu de la différence de composition du support utilisé, celles-ci ne peuvent être rapportées à l'une ou l'autre des fractions cupriques individualisées en Sephadex G 200-agarose-amidon. Mais le fait demeure que le sérum de *M. puber* renferme des cuproprotéines présentant une activité catalasique.

3. Conclusions.

L'activité catalasique, quand elle a pu être observée, a toujours été trouvée associée à des fractions cupriques. Le rôle des cuproprotéines dans la décomposition catalytique du peroxyde d'hydrogène par le sérum de Crustacés avait déjà été signalé par Ghiretti (1956) en conclusion de recherches effectuées sur *Palinurus elephas* et *Maia squinado*. Il ressort des travaux de cet auteur que cette activité du sérum disparaît après que celui-ci ait été mis à dialyser contre une solution de cyanure de potassium, opération qui provoque essentiellement une remise en liberté du métal des cuproprotéines. L'addition de cuivre qui réintègre ces protéines dans leur état initial, amène sa réapparition. Ghiretti en déduisait que c'était l'hémocyanine, seule cuproprotéine dont la présence dans le sérum soit reconnue, qui agissait comme catalase.

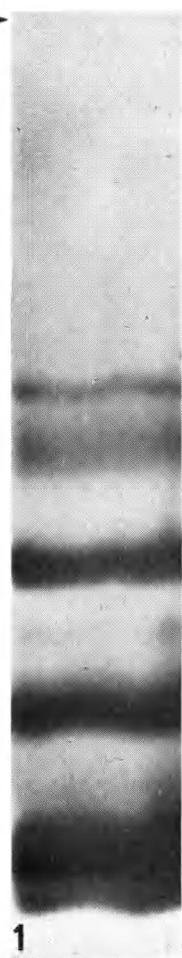
Aucune confirmation ni infirmation de cette hypothèse n'a pu être apportée au cours de la présente étude, étant donné qu'il n'a pas été possible de localiser avec certitude l'emplacement de la ou des fractions hémocyaniques. Il n'en reste pas moins que l'existence d'une activité catalasique déterminée par des cuproprotéines est pour le moins déconcertante, et cela sans même préjuger de la nature exacte de la protéine qui en est responsable. En effet, toutes les catalases connues, qu'elles soient d'origine bactérienne (*Micrococcus lysodeikticus*), animale (sang) ou végétale (épinard) sont des ferroprotéines.

PLANCHE I

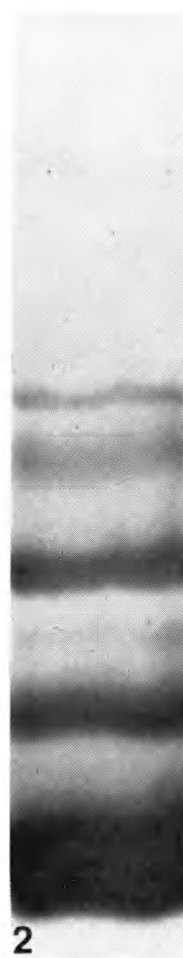
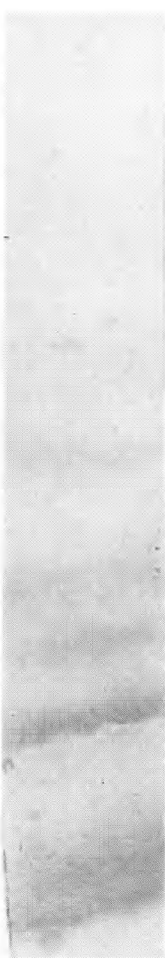
1. Activité phénoloxidasique d'un sérum de *M. puber* (stade D0). Réactif : pyrocatechol ; à gauche, témoin coloré au Noir Amido 10 B.
2. Activité peroxydasique d'un sérum de *M. puber* (stade D0). Réactif : paraphénylènediamine ; à gauche, témoin coloré au Noir Amido 10 B.
3. Activité peroxydasique d'un sérum normal de *M. puber* (stade D0) (a) et d'un sérum dont le cuivre a été ôté par dialyse contre le cyanure de potassium (b).
4. Electrophorégrammes des mêmes sérums, colorés par un réactif du cuivre.

R.S. Réservoir de dépôt des sérums.

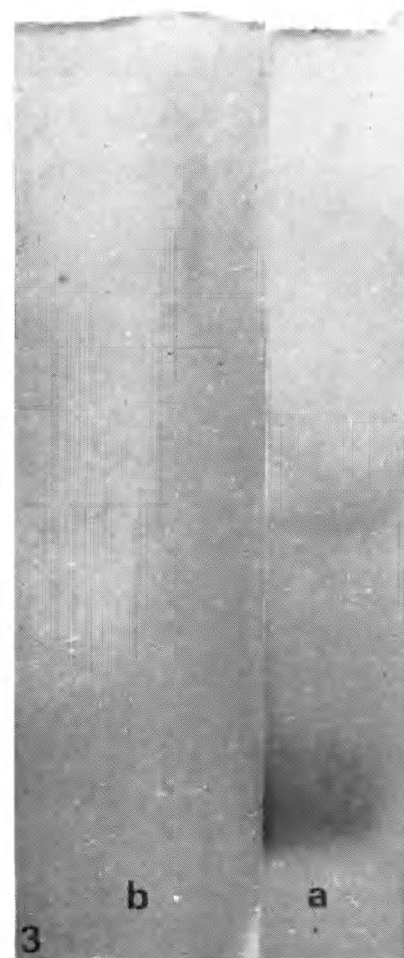
→
RS



1



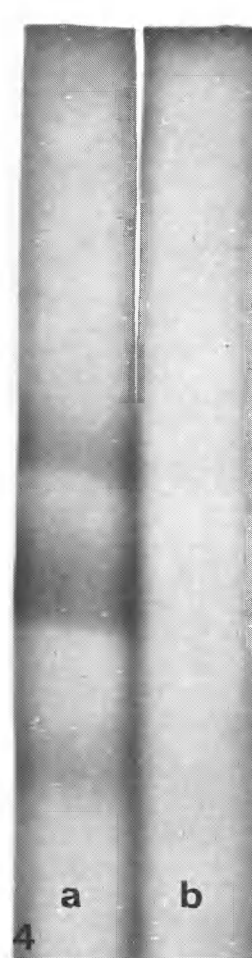
2



3

b

a



4

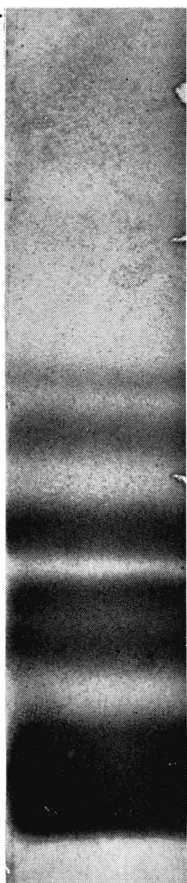
a

b

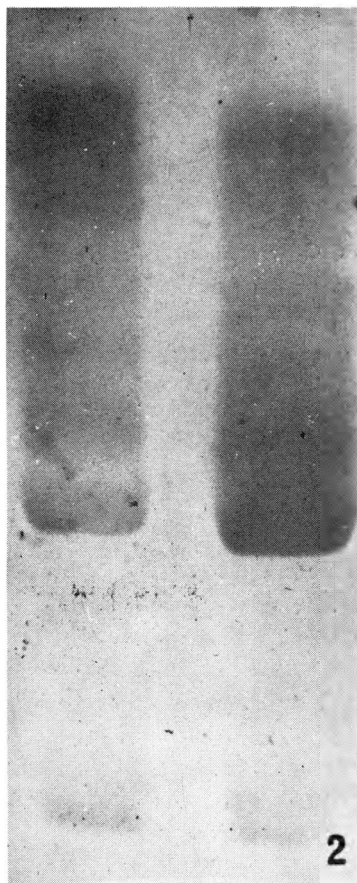
WALTER GHIDALIA

PLANCHE I

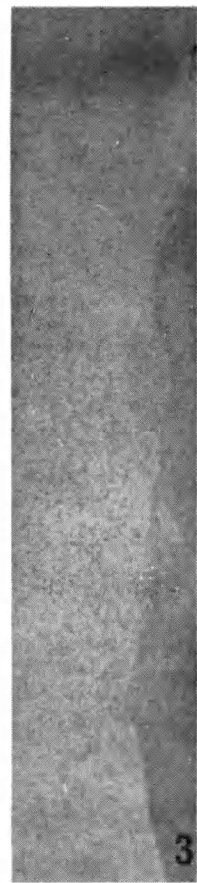
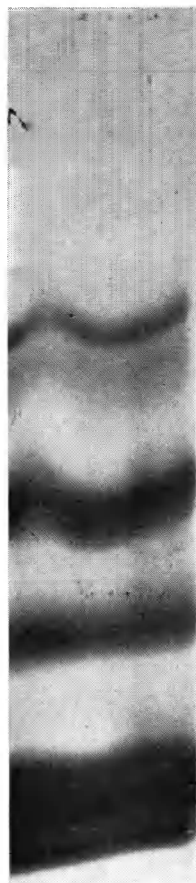
→
RS



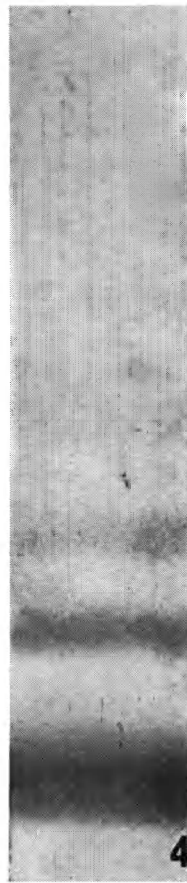
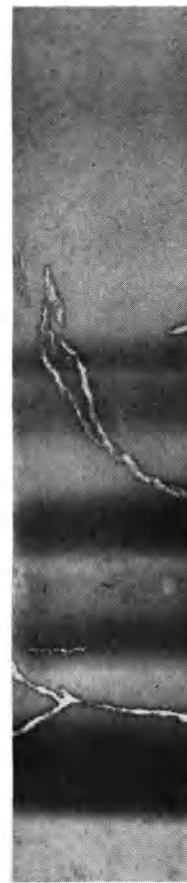
1



2



3



4

WALTER GHIDALIA

PLANCIE II

On retrouve donc, à propos de la catalase du sérum des Crustacés, les ambiguïtés précédemment signalées au sujet des peroxydases de même origine.

II. - ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DES FRACTIONS NON CUPRIQUES.

A. Activité phosphatasique.

Les travaux de Roche et Latreille (1934) ont montré qu'il existait dans le sérum de Crabe une phosphatase qui présente les caractéristiques d'une phosphatase acide. En plus de cette dernière, on a également recherché dans le sérum de *M. puber*, une éventuelle activité alcalinophosphatasique.

1. Conditions expérimentales.

Dans les deux cas, la méthode aux azoïques a été préférée à celle utilisant le glycérophosphate de sodium (Gomori, 1941). Le principe en est fort simple ; le radical naphtol libéré par action de l'enzyme est couplé à un sel de diazonium approprié. Il se constitue ainsi un composé coloré dont l'apparition atteste que la réaction a eu lieu et permet de localiser l'enzyme.

a. *Phosphatase acide.*

- Réactif : sel sodique du « Naphtol AS biphosphoric acid » Sigma 25 mg ; tampon acétate pH 4,8, M = 0,1 100 ml ; Garnet GBC 50 mg.
- Mode opératoire : les plaques sont mises à incuber pendant 3 à 4 heures à l'obscurité puis lavées dans une solution d'acide acétique à 2 p. 100 contenant 1 p. 100 de chlorure mercurique.

b. *Phosphatase alcaline.*

- Réactif : sel sodique du « Naphtol AS Mx phosphoric acid » Sigma 25 mg ; diméthylformamide 0,5 ml ; tampon tris pH 8,7, M = 0,05 100 ml ; Garnet GBC 50 mg.
- Mode opératoire : après deux ou trois heures d'incubation, les plaques sont traitées comme précédemment.

D'autres méthodes ont également été utilisées ; elles ne diffèrent de celles qui viennent d'être décrites que par des détails accessoires tels que la nature du sel de diazonium employé ou l'addition de certains produits destinés à améliorer la réactivité des enzymes : chlorure de magnésium, polyvinylpyrrolidone, etc.

2. Résultats.

Une réaction phosphatasique acide très nette apparaît sur tous les électrophorégrammes traités. Elle se manifeste par le développe-

PLANCHE II

1. Activité acido-phosphatasique d'un sérum de *M. puber* (stade D0). A gauche, témoin coloré au Noir Amido 10 B.
2. Activité estérasique de deux sérums de *M. puber* (stades D1 et D0).
3. Activité lactico-déshydrogénasique d'un sérum de *M. puber* (stade D0). A gauche, témoin coloré au Noir Amido 10 B.
4. Electrophorégrammes d'un sérum de *M. puber* (stade D0). A gauche, témoin coloré au Noir Amido 10 B ; à droite, traité par le réactif de Micheli et Buzzi.

R.S. Réservoir de dépôt des sérums.

ment d'une intense coloration pourpre au niveau de la fraction 11 (Planche II, 1).

Par contre, lorsqu'au cours de ces expériences on utilise un tampon de pH 6,9, valeur considérée par Roche et Latreille comme optimale pour l'activité de cette enzyme, la réaction positive ne se produit plus.

Aucun indice de la présence d'une phosphatase alcaline n'a pu être décelé. La réaction de mise en évidence utilisée n'est pas en cause car, lorsqu'au cours d'expériences témoins, sérums de Crabe et échantillons de phosphatase alcaline, extraits d'intestin de veau sont soumis conjointement à l'électrophorèse, une réaction positive accusée se développe au niveau de ces derniers, après traitement des plaques par le réactif.

3. Conclusions.

Les résultats qui viennent d'être exposés sont conformes à ceux de Roche et Latreille en ce qui concerne aussi bien l'existence d'un seul type d'activité phosphatasique que la nature de celle-ci. La seule différence constatée porte sur la valeur du pH optimum d'activité.

L'absence d'activité alcalinophosphatasique dans le sérum, alors que cette enzyme a été trouvée dans de nombreuses espèces de Crustacés, étonne un peu, à première vue. En effet, pour la seule espèce *Cambarus virilis*, Kugler et Birkner (1948) l'ont mise en évidence dans le tégument, la glande digestive, les organes excréteurs et l'enveloppe des gastrolithes. Pourtant, il est probable que cette absence traduit une répartition différenciée de l'enzyme au sein de l'organisme. Que celle-ci soit très abondante dans les tissus et inexistante dans le sérum n'a rien d'exceptionnel et des faits du même ordre seront retrouvés plus loin à propos d'une autre enzyme, l'anhydrase carbonique.

B. Activité estérasique.

Les aliestérases sont les seules estérases que l'on ait recherchées. Il s'agit d'enzymes peu spécifiques qui déterminent l'hydrolyse d'une grande variété d'esters d'acides gras. Plusieurs protéines sériques de Crustacés possèdent une telle faculté (Cowden et Coleman, 1962 ; Laufer et McNamara, 1962).

1. Conditions expérimentales.

L'activité estérasique a été mise en évidence par une méthode utilisant les sels de diazonium. Le principe est identique à celui des réactions de caractérisation des phosphatases.

a. Réactif : acétate de β naphthyle : 20 mg ; acétone : 2 ml ; tampon phosphate pH 7,4, M = 0,05 : 100 ml ; diazo bleu : 40 mg.

Le tampon phosphate a été préféré au tampon véronal car les colorations obtenues avec ce dernier sont fugitives et s'estompent très rapidement.

b. Mode opératoire : incubation : 1 heure à la température du laboratoire ; fixation : 1 heure dans une solution d'acide acétique à 2 p. 100.

Les sites d'activités aliestérasiques apparaissent intensément colorés en rouge pourpre.

2. Résultats.

Six fractions au moins présentent une réaction positive (Planche II, 2). Ce sont les bandes 8, 9, 11, 12, 13 et 14. Une coloration moins accusée est parfois perceptible sur l'emplacement des fractions 1 et 2. L'intensité de ces réactions varie au cours du cycle d'intermue. C'est durant l'étape D que celles-ci sont les plus marquées.

3. Conclusions.

Deux faits importants se dégagent de cette étude :

— l'activité estérasique est généralement associée aux fractions terminales parmi lesquelles les cuproprotéines sont rares. Si l'on exclut les bandes 1 et 2 dont l'activité demeure sujette à caution, deux seulement des fractions qui réagissent positivement manifestent simultanément les deux caractéristiques : présence de cuivre et pouvoir estérasique. Mais il n'est pas exclu qu'il s'agisse de fractions composites et que chacune de ces propriétés s'applique à des protéines différentes. Une telle hypothèse, si elle se révélait exacte, permettrait d'interpréter de manière plus logique les observations de Cowden et Coleman. Pour ces auteurs, en effet, l'activité estérasique est essentiellement liée aux fractions hémocyaniques. Or, le nombre total des fractions qui apparaissent sur leurs électrophorégrammes de sérum n'excède jamais trois. Il est donc vraisemblable que la corrélation qu'ils constatent entre hémocyanine et activité estérasique est une conséquence de la séparation sommaire des constituants sériques. Cela est d'ailleurs confirmé par les nombreuses exceptions rapportées à ce sujet par les mêmes auteurs. Enfin, une justification supplémentaire de cette hypothèse peut être trouvée dans un fait signalé par Cowden et Coleman et retrouvé au cours de cette étude. Il arrive souvent qu'une réaction positive apparaisse en un endroit où aucune concentration protéique ne peut être décelée par coloration au *Noir Amido*. Cela est particulièrement net dans le cas de la fraction 14, au niveau de laquelle se produit toujours une réaction estérasique alors que l'existence d'une fraction protéique sur cet emplacement n'est révélée par ce colorant qu'à certains stades seulement du cycle d'intermue. L'intensité de l'activité enzymatique évaluée en fonction de la coloration développée, demeurant sensiblement la même, que cette fraction apparaisse ou non sur les électrophorégrammes traités par le *Noir Amido*, la probabilité est grande pour que deux protéines, différentes au moins, entrent dans la constitution de celle-ci ;

— de nombreuses bandes possèdent un pouvoir estérasique : environ la moitié du nombre total des fractions protéiques présentes sur les électrophorégrammes.

Un tel fait ne doit pas surprendre car il existe de nombreuses variétés de cette enzyme qui ne se différencient entre elles qu'en fonction de critères tels que la charge électrique (isoenzyme), la nature du substrat sur lequel elles opèrent ou la valeur de leur pH optimum d'activité. C'est en se fondant sur de telles caractéristiques qu'Allen, Eränkö et Hunter (1958) dans la medulla de capsules surrénales, Markert et Hunter (1959) sur trente-deux types de tissus différents de la Souris adulte, Allen et Hunter (1960) dans l'épididyme

de Souris normales ou castrées, ont pu distinguer, suivant le cas, entre sept et dix variétés d'estérases.

La multiplicité des fractions sériques de *Macropipus puber* possédant un pouvoir estérasique constitue peut-être une illustration de ces faits.

C. Activité lactico-déshydrogénasique.

Des travaux relativement anciens ont montré que, chez les Crustacés, lors de la contraction musculaire, de l'acide lactique se formait aux dépens du glycogène. La probabilité était donc forte pour qu'existât dans le sérum, une enzyme opérant sur ce substrat.

1. Conditions expérimentales.

a. *Réactif* : lactate de sodium 1 M : 4,5 ml ; tampon tris pH 7,4, M = 0,05 : 70 ml ; D.P.N. : 50 mg ; cyanure de potassium : 6 mg ; nitro BT : 35 mg ; phénazine méthosulfate : 2 mg.

b. *Mode opératoire* : l'incubation s'effectue à l'obscurité et à la température ambiante pendant une à deux heures. Il est de la plus haute importance que le pH ne dépasse pas la valeur de 7,6 car, à des valeurs supérieures, de nombreuses substances peuvent donner lieu à des réactions non enzymatiques.

2. Résultats.

Une coloration violette très nette apparaît sur l'emplacement de la fraction 14. Une réaction très atténuée est également visible au niveau des trois premières fractions de l'électrophorégramme (Planche II, 3).

3. Conclusions.

Si la première réaction correspond indubitablement à une véritable activité enzymatique, celle des autres fractions semble plus problématique. Compte tenu de la faible intensité de leur coloration, l'éventualité d'une pseudo-réaction positive à leur niveau reste des plus probables. Elle pourrait être inhérente à la nature des protéines constituant ces fractions. Plusieurs substances, polyphénols, composés sulfhydriques, sont, en effet, susceptibles de donner, dans certaines conditions de milieu, des réactions faussement positives. Enfin, l'existence au niveau de la fraction 14 de deux activités enzymatiques de natures différentes, l'une estératique, l'autre lactico-déshydrogénasique, confirme l'hypothèse avancée au paragraphe précédent au sujet de l'hétérogénéité de cette fraction et de l'intervention d'au moins deux protéines, de nature distincte dans leur constitution.

D. Activité anhydraso-carbonique.

Les premières expériences entreprises pour détecter l'anhydrase carbonique dans l'hémolymphe des Crustacés se sont toujours soldées par des résultats négatifs (Florkin, 1935 ; Robertson et Ferguson, 1936 ; van Goor, 1937). Des travaux ultérieurs devaient toutefois permettre de la déceler dans le sérum de certains d'entre eux : *Homarus vulgaris*

et *Libinia emarginata* (Ferguson, Lewis et Smith, 1937), *Palinurus argus* (Sabotka et Kann, 1941), *Cambarus clarkii* (Maluf, 1940). Mais dans tous les cas, les teneurs détectées furent infimes.

1. Conditions expérimentales.

Les techniques dont on dispose présentement pour déceler ce type d'activité font appel à un enchaînement de réactions chimiques complexes qui ne permettent qu'une mise en évidence indirecte. Dans ces conditions, il était prévisible que les résultats recueillis fussent des plus problématiques.

a. Méthode de Hausler.

- *Réactif* :

- solution de sulfate de cobalt :
sulfate de cobalt $\text{SO}_4\text{Co} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 197 mg ; eau distillée : 1 ml ; acide sulfurique 0,05 M : 6 ml.
- solution de sulfate de sodium 0,1 M :
sulfate de sodium $\text{SO}_4\text{Na}_2 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$: 1,61 g ; eau distillée : 50 ml ; bicarbonate de soude 0,24 M : 10 g.

Les deux solutions sont mélangées juste avant l'emploi.

- *Mode opératoire* : les plaques sont mises à incuber pendant deux heures environ à la température ambiante, rincées à l'eau distillée, puis immergées dans une solution à 1 p. 100 de sulfite d'ammonium qui révèle l'activité enzymatique. En raison des propriétés absorbantes du Sephadex, les électrophorégrammes apparaissent entièrement colorés en noir après ce dernier traitement, aussi est-il nécessaire de les rincer pendant un temps assez long : un à deux jours avant que le gel ne s'éclaircisse ; les fractions ayant réagi positivement se détachent alors nettement sur le fond incolore.

b. Méthode de Micheli et Buzzi.

- *Réactif* :

- sulfate de cobalt 0,1 M : 10 ml ; acide sulfurique 0,05 M : 60 ml ; carbonate acide de sodium : 4 g ; sulfate de sodium 0,1 M : 20 ml.

- *Mode opératoire* : les électrophorégrammes sont trempés dix minutes dans la solution de réactif puis exposés vingt minutes à l'air libre. Cette suite d'opérations est répétée trois fois en tout. Au terme de ce traitement, les plaques, préalablement séchées au papier filtre, sont immergées dans une solution diluée de sulfure d'ammonium. Un rinçage prolongé à l'eau distillée permet d'apercevoir les fractions qui ont réagi positivement et qui se distinguent par leur coloration noire.

2. Résultats.

Toutes les fractions protéiques visibles sur les électrophorégrammes colorés par le Noir Amido donnent une réaction positive avec les deux réactifs utilisés (Planche II, 4). L'addition à ces derniers d'un inhibiteur spécifique de l'activité anhydrique, le para-amino-benzène-sulphonamide (Mann et Keilin, 1940), n'empêche pas les mêmes réactions de se manifester. L'aspect des électrophorégrammes demeure le même, que les réactifs employés renferment ou non cet inhibiteur.

Les réactions constatées sont probablement dépourvues de toute spécificité et ne correspondent pas, pour la plupart d'entre elles tout au moins, à l'activité enzymatique recherchée.

3. Conclusions.

La présence de l'anhydrase carbonique dans le sérum des Crustacés est des plus vraisemblables car, chez les animaux à squelette

calcifié, cette enzyme est susceptible d'assumer en plus de sa fonction dans les phénomènes respiratoires, un rôle important dans le métabolisme du carbonate de calcium. Lorsque la teneur en gaz carbonique devient un facteur limitant, le développement des structures calcifiées est accéléré en sa présence. Le fait a été nettement établi chez les Mollusques par Wilbur et Jodrey (1955) sur *Crassostrea virginica*, Stolkowski (1951) sur *Helix aspersa* et Abolins-Krogis (1958) sur *Helix pomatia*. Benesch et Benesch (1951) pensent avoir trouvé des faits analogues chez un Crabe du genre *Uca*.

Pourtant, il n'a pas été possible au cours de cette étude, de prouver de façon irréfutable son existence dans le sérum de *Macropipus puber* et encore moins de la situer sur les électrophorogrammes. Cela tient à deux difficultés majeures : d'une part les faibles quantités d'anhydrase carbonique présentes dans le sérum avec, en corollaire, une mise en évidence malaisée ; d'autre part l'absence d'une réaction véritablement spécifique qui permette de détecter et de localiser en toute certitude les sites d'activités enzymatiques et faute de laquelle, tous les résultats obtenus demeurent sujets à caution.

La première de ces difficultés est irrémédiable car elle est inhérente à la nature des choses. Déjà, dès 1936, Robertson et Ferguson avaient signalé l'inégale répartition de cette enzyme entre le sang et les tissus des Invertébrés et, constatant sa rareté dans le premier et son abondance dans les seconds, ils remarquaient qu'une telle distribution était exactement inverse de celle rencontrée chez les Vertébrés.

Résoudre la seconde est par contre plus aisé, car il est possible de recourir à d'autres disciplines que l'enzymologie ; l'anhydrase carbonique étant une métalloprotéine à base de zinc (Mann et Keilin, 1940), on peut la localiser en détectant le métal qui lui est associé. Plusieurs techniques ont permis de parvenir à ce résultat. Le procédé utilisé lors de cette étude consista à mettre en évidence le zinc par formation d'un composé coloré. Il s'est malheureusement révélé inefficace quels qu'aient été les réactifs employés. Ceux-ci sont au nombre de quatre : dithizone, diphénylcarbazon, diphénylcarbazine et nitroprussiate de soude (technique de Mendel et Bradley). Avec les trois premiers produits, les résultats étaient semblables à ceux obtenus lors des expériences de détection du cuivre. Avec le quatrième, les essais ont été franchement négatifs.

Le procédé basé sur l'emploi du zinc radioactif (Zn^{65}) s'est révélé plus fructueux. Bryan a pu, par cette technique, démontrer la présence de ce métal dans le sérum de Homard (1964) et d'Ecrevisse (1967). Il a également pu constater que, lorsque le sérum d'un Crabe ayant préalablement reçu une injection de zinc marqué était passé en électrophorèse, le métal se retrouvait associé à trois fractions protéiques situées à mi-longueur de l'électrophorogramme. Bryan admet que deux d'entre elles sont de nature hémocyanique.

III. - CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

La plupart des fractions protéiques manifestent, on l'a vu, une ou plusieurs activités enzymatiques de nature définie. Mais leur nombre même soulève le problème de leur validité car, si certaines d'entre elles sont indiscutablement d'origine enzymatique, d'autres, par contre, sont plus sujettes à caution. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de critères qui, en présence d'une réaction positive, permettent de savoir si elle est imputable à une enzyme ou au contraire à des substances réagissant de manière non spécifique dans les conditions de l'expérience. On a longtemps admis que l'emploi d'inhibiteurs spécifiques permettrait de résoudre ce problème. En fait, de tels inhibiteurs sont très rares et, de plus, le fait qu'une substance empêche une réaction de se produire ne prouve pas nécessairement, loin de là, que celle-ci soit de nature enzymatique. Ainsi, la céruloplasmine est bien inhibée par l'azothydrate de sodium mais, actuellement, c'est la légitimité de cette activité enzymatique elle-même qui est contestée. De toutes récentes observations cliniques réalisées sur des malades atteints de la maladie de Wilson, affection qui se caractérise par des anomalies du métabolisme cuprique, donnent à penser que la véritable fonction physiologique de cette cuproprotéine consiste dans le maintien à zéro de la balance en cuivre des organismes.

Aussi, Scheinberg (1966), emboitant le pas à plusieurs auteurs, en vient-il à se demander si cette activité oxydasique modérée, manifestée par la céruloplasmine, a plus de rapport avec sa fonction physiologique réelle que l'activité peroxydasique de l'hémoglobine avec la fonction respiratoire de ce pigment.

Dans l'interprétation des zymogrammes (1), la certitude ne peut résulter que de l'observation d'un certain nombre de faits concordants. Cela explique que les conclusions tirées de cette étude enzymologique s'apparentent plus à des tentatives d'explications qu'à des affirmations catégoriques.

Les activités enzymatiques signalées par différents auteurs à propos du sérum de Crustacés ont été, pour la plupart, retrouvées et situées sur les électrophorégrammes. Seul demeure en suspens le cas de l'anhydrase carbonique. Sa présence dans l'hémolymph est des plus probables et les travaux de Bryan apportent des arguments sérieux à l'appui de cette opinion. Mais, l'absence d'une réaction de caractérisation vraiment spécifique de cette enzyme ne permet pas d'affirmer son existence dans le sérum de façon formelle.

En ce qui concerne les autres réactions mises en évidence, il est vraisemblable que les activités estérasiques, phosphatasique acide et lactico-déshydrogénasique, sont véritablement de nature enzymatique. On remarquera que les fractions qui les manifestent sont constituées par des protéines dans la constitution desquelles le cuivre n'entre pas.

(1) ZYMOGRAMMES = électrophorégrammes sur lesquelles les sites d'activités enzymatiques ont été révélés par des techniques histochimiques (Hunter et Burston 1958).

Les rares fois où ces activités semblaient associées à des cuproprotéines, un examen approfondi des conditions dans lesquelles elles apparaissaient, n'a jamais démontré qu'il existait une relation de causalité entre les deux faits. Ainsi, dans le cas de la fraction 11, il n'y a pas simultanéité entre l'activité de phosphatase acide qui la caractérise et la présence de cuivre qui est occasionnelle. Les deux phénomènes semblent donc indépendants et doivent être, en conséquence, rapportés à des protéines de nature différente.

Par contre, le doute subsiste lorsque l'on considère les réactions enzymatiques des fractions cupriques. Celles-ci sont au nombre de trois : activités oxydasique, peroxydasique et catalasique. La première, la seule plausible de la part de cuproprotéines, est manifestement de nature non enzymatique et il doit en être de même des deux autres qui sont généralement le fait de ferroprotéines.

Il est pourtant indubitable que toutes trois sont associées à la présence de cuivre, car l'élimination de ce métal par dialyse contre le cyanure de potassium entraîne leur disparition. Aussi est-il vraisemblable que toutes trois relèvent de la même cause et manifestent, dans une certaine mesure, l'activité catalytique intrinsèque de ce métal. Mais la partie protéique ou, plus exactement, la configuration structurale de celle-ci et la nature des composants qui la constituent doivent aussi intervenir. Zuckerkandl (1953) a ainsi montré que l'apparition d'un pouvoir pseudophénoloxydasique était conditionnée, dans le cas de l'hémocyanine, par l'activation préalable du cuivre présent dans cette protéine et que cette opération consistait en une modification plus ou moins importante de la structure de la molécule. Enfin, Ghiretti (1956) a pu observer que, parmi tous les acides aminés qu'il avait testés, seule l'arginine donnait avec le cuivre des complexes capables de décomposer le peroxyde d'hydrogène.

Il s'agit donc, dans le cas de ces trois activités, de propriétés apparemment communes à un groupe, sinon à toutes les cuproprotéines, et qu'elles présentent soit spontanément soit après modification de leurs structures. Ainsi, leur attribution exclusive à l'hémocyanine constitue-t-elle une restriction abusive. Une telle façon de voir est d'ailleurs confirmée, ne serait-ce qu'en partie, par le comportement ambivalent de la céruloplasmine qui, selon la présence ou l'absence de peroxyde d'hydrogène dans le milieu de réaction, se comporte soit en peroxydase soit en oxydase.

On retrouverait ainsi une idée, déjà émise par Prenant (1924) il y a près de cinquante ans, et selon laquelle : « Les phénomènes peroxydasiques et sans doute aussi certains phénomènes oxydasiques ne sont probablement que des aspects à nous apparents, mais sans importance générale du métabolisme des métaux lourds à l'état colloïdal. » Il semble que l'activité catalasique doive également être considérée de cette façon.

Summary

The enzymatic properties of the protein fractions isolated from *Macropipus puber* (L.) male hemolymph by electrophoresis on filtrating medium have been investigated. Six different activities have been so revealed.

Zusammenfassung

Die enzymatischen Eigenschaften der verschiedenen Proteinfractionen des *Macropipus puber* (L.) ♂ Blut studiert wurden. Sechs Aktivitäten wurden so beobachtet.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ABELOUS, J.E. et BIARNES, G., 1897 a. — Sur l'existence d'une oxydase chez l'Ecrevisse. *C.R. Soc. Biol.*, IV, pp. 173-175.
- ABELOUS, J.E. et BIARNES, G., 1897 b. — Oxydase des Crustacés. *C.R. Soc. Biol.*, IV, pp. 249-251.
- ABOLINS-KROGIS, A., 1958. — The morphological and chemical characteristics of organic crystals in the regenerating shell of *Helix pomatia*. *Acta Zool.*, 39, p. 19.
- ALLEN, J., ERANKÖ, O. and HUNTER, R., 1958. — Histochemical study of the esterases of the adrenal medulla of the rat. *Am. J. Anat.*, 102, pp. 93-116.
- ALLEN, J.M. and HUNTER, R.L., 1960. — A histochemical study of enzymes in the epididymis of normal castrated and hormone replaced castrated mice separated by zone electrophoresis in starch gels. *J. Histochem. Cytochem.*, 8, 1, pp. 50-57.
- BENESCH, R. and BENESCH, R.E., 1951. — Carbonic anhydrase and calcification in the fiddler crab (*Uca*). *Biol. Bull.*, 101, p. 273.
- BHAGVAT, K. and RICHTER, D., 1938. — Animal phenolases and adrenaline. *Bioch J.*, 32, pp. 1397-1406.
- BODINE, J.H. and ALLEN, T.H., 1941. — Enzymes in ontogenesis (Orthoptera) XV. Some properties of protyrosinases. *J. Cell Comp. Physiol.*, 18, pp. 151-160.
- BRYAN, G.W., 1964. — Zinc regulation in the lobster *Homarus vulgaris*. I. Tissue zinc and copper concentrations. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 44, pp. 549-563.
- BRYAN, G.W., 1967. — Zinc regulation in the freshwater crayfish (including some comparative copper analyses). *J. exp. Biol.*, 46, 2, pp. 281-296.
- BURK, N.F., 1940. — Osmotic pressure, molecular weight and dissociation of *Limulus* hemocyanin. *J. Biol. Chem.*, 133, pp. 511-520.
- COWDEN, R.R. et COLEMAN, J.R., 1962. — A Starch-Gel Electrophoretic Study of the Hemolymph Proteins of some Bermuda Crustacea. *Experientia*, XVIII, 6, pp. 265-266.
- DECLEIR, W., AERTS, F. et VERCAUTEREN, R., 1960. — The localisation of polyphenoloxylase in hemocytes. *XI Intern. Kongr. Entomol.* III. Symp. 3 Chem. Insekten Wien 1960 - Pavia Ist. Entom. Agraria 1960, pp. 176-179.
- DECLEIR, W. et VERCAUTEREN, R., 1965. — Activité phénoloxylasique dans les leucocytes de crabe au cours du cycle d'intermue. *Cah. Biol. Mar.*, 4, 2, pp. 163-172.
- DECLEIR, W. et VERCAUTEREN, R., 1967. — Etude comparative de la phénoloxylase chez les Insectes et chez les Crustacés. *Cah. Biol. Mar.*, 8, 2, pp. 101-111.
- FERGUSON, J.K.W., LEWIS, L. et SMITH, J., 1937. — The distribution of carbonic anhydrase in certain marine invertebrates. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 10, pp. 395-400.
- FLORKIN, M., 1935. — Sur l'activité anhydrique du milieu intérieur des Invertébrés. *Arch. Intern. Physiol.*, 40, 3, pp. 283-290.
- GHIDALIA, W., VENDRELY, R. et COIRAULT, Y., 1970a. — Un nouveau support mixte pour électrophorèse de zone : le gel de Sephadex-agarose-amidon. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 52, 1, pp. 110-112.
- GHIDALIA, W., VENDRELY, R. et COIRAULT, Y., 1970b. — Use of different filtrating media for the electrophoretic analysis of Crustacean sera. *Comp. Biochem. Physiol.*, 35, pp. 597-606.
- GHIRETTI, F., 1956. — The decomposition of hydrogen peroxyde by hemocyanin and by its dissociation products. *Arch. Biochem. Biophys.*, 63, pp. 165-176.
- GOMORI, G., 1941. — The distribution of phosphatase in normal organs and tissues. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 17, pp. 71-83.
- HUNTER, R. et BURSTONE, M., 1958. — The zymogram as a tool for the characterization of enzyme substrate specificity. *J. Histochem. Cytochem.*, 6, p. 396.
- KARLSON, P. et LIEBAU, H., 1961. — Zum Tyrosinstoffwechsel der Insekten. V. Rein-darstellung, Kristallisation und Substratspezifität der O-Diphenoloxylase aus *Calliphora erythrocephala*. *Heppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 326, pp. 135-143.

- KUGLER, O.E. et BIRKNER, M.L., 1948. — Histochemical observations of alkaline phosphatase in the integument, gastrolith sac, digestive gland and nephridium of the crayfish. *Physiol. Zool.*, 21, pp. 105-110.
- LAUFER, H. et MCNAMARA, T., 1962. — Blood protein changes in Crustacea. *Biol. Bull.*, 123, p. 519.
- LEWIS, H.W., 1962. — A comparative study of dopaoxydase systems in marine invertebrates. *Biol. Bull.*, 123, p. 503.
- LISON, L., 1953. — Histochimie et cytochimie animales. *Gauthier-Villars* éd.
- MALUF, N.S.R., 1940. — The uptake of inorganic electrolytes by the crayfish. *J. gen. Physiol.*, 24, pp. 151-167.
- MANN, T. et KEILIN, D., 1940. — Sulphanilamide as a Specific Inhibitor of Carbonic Anhydrase. *Nature*, 146, pp. 164-165.
- MANWELL, C. et BAKER, C.M., 1963. — Starch gel electrophoresis of sera from some marine arthropods: studies on the heterogeneity of hemocyanin and on a "ceruloplasmin-like protein". *Comp. Biochem. Physiol.*, 8, pp. 193-208.
- MARKERT, C.L. et HUNTER, R.L., 1959. — The distribution of esterases in Mouse tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 7, pp. 42-47.
- OWEN, J.A., SILBERMAN, H.J. et GOT, C., 1958. — Detection of haemoglobin, haemoglobin-haptoglobin complexes and other substances with peroxydase activity after zone electrophoresis. *Nature*, 182, p. 1373.
- OWEN, J.A. et SMITH, H., 1961. — Detection of ceruloplasmin after zone electrophoresis. *Clin. Chim. Acta*, 6, pp. 441-443.
- PINHEY, K.G., 1930. — Tyrosinase in crustacean blood. *J. exp. Biol.*, 7, pp. 19-36.
- PRENANT, M., 1924. — Etudes histologiques sur les peroxydases animales. *Arch. Morph. gén. exp.*, 21, 155 pp.
- ROBERTSON, K. et FERGUSON, J.K.W., 1936. — The distribution of carbonic anhydrase in some invertebrates. *Amer. J. Physiol.*, 116, p. 130.
- ROCHE, J. et LATREILLE, M., 1934. — Sur les phosphatases du sang et de l'hémolymphe. *C.R. Soc. Biol.*, 116, pp. 1033-1034.
- SABOTKA, H. et KANN, S., 1941. — Carbonic anhydrase in fishes and invertebrates. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 17, pp. 341-347.
- SCHEINBERG, H.I., 1966. — Ceruloplasmin, a review. In *The Biochemistry of the copper*, Acad. Press, New York, London.
- STOLKOWSKI, J., 1951. — Essai sur le déterminisme des formes minéralogiques du calcaire chez les êtres vivants (calcaires coquilliers). *Ann. Inst. Océan.*, 26, pp. 1-113.
- SUMMERS, N.M. Jr, 1967. — Cuticle sclerotization and blood phenol oxidase in the fiddler crab *Uca pugnax*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 23, pp. 129-138.
- URIEL, J., 1958a. — Colorimetric detection of human ceruloplasmin oxydase activity after electrophoresis in agar plates or after immuno-electrophoresis. *Nature*, 181, pp. 999-1000.
- URIEL, J., 1958b. — Etude de l'activité enzymatique de la céruloplasmine du sérum humain après électrophorèse et immunoélectrophorèse en gélose. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 39, pp. 105-118.
- URIEL, J., 1958c. — Détection des activités catalasiques et peroxydasiques de l'hémoglobine après électrophorèse en gélose. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 40, pp. 277-280.
- VAN GOOR, H., 1937. — La répartition de l'anhydrase carbonique dans l'organisme des animaux. *Arch. intern. Physiol.*, 45, pp. 491-509.
- WILBUR, K.M. et JODREY, L.H., 1955. — Studies on shell formation. V. The inhibition of shell formation by carbonic anhydrase inhibitors. *Biol. Bull.*, 108, pp. 359-365.
- ZUCKERKANDL, E., 1953. — La position stérique du cuivre dans l'hémocyanine et dans les oxydases cupriques. *C.R. Soc. Biol.*, 147, pp. 629-632.