

ACTIVITÉ PHÉNOLOXYDASIQUE DANS LES LEUCOCYTES DE CRABE AU COURS DU CYCLE D'INTERMUE

par

W. Declair et R. Vercauteren (1)

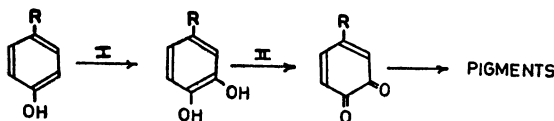
Laboratoire de Chimie Physiologique, Université de Gand.

Résumé

La phénoloxydase est un enzyme généralement répandu dans les leucocytes de Crabe. On l'y trouve, cependant, sous la forme inactive. L'enzyme peut être mis en évidence dans l'hépatopancréas, les leucocytes et la cuticule. Son activité dans ces organes est différente suivant le stade d'intermue étudié. L'hémocyanine donne une réaction pseudophénoloxydasique mais, dans nos conditions de travail, cette réaction n'interfère pas avec la véritable réaction phénoloxydasique. Le rôle de l'enzyme est discuté.

INTRODUCTION

La phénoloxydase est un enzyme cuprique qui catalyse deux réactions différentes. La première est une o-hydroxylation de phénols (activité monophénoloxydasique ou crésolasique), la seconde, une déshydrogénation d'o-diphénols (activité diphénoloxydasique ou catécholasique).



Les produits de ces réactions sont en général des pigments. Ainsi, l'apparition d'une couleur brune chez les pommes et les champignons est attribué à l'oxydation enzymatique de mono- ou diphénols par la phénoloxydase. L'enzyme a été isolé à partir d'Insectes (cf. par ex. Karlson, 1961 ; Aerts et Vercauteren, 1964). Furth a démontré, pour la première fois en 1903, que le noircissement de l'hémolymph de certains Crustacés au contact de l'air est dû à une phénoloxydase.

(1) Ce travail fait partie du programme « Enzymologie » du CFWO, Belgique.

Pinhey (1929) a étudié l'activité de l'enzyme dans l'hémolymph de Crabe en suivant la variation d'intensité de couleur du pigment formé par l'oxydation de la tyrosine à $\text{pH} = 8,8$. Cet auteur attribua l'activité phénoloxidasique de l'hémolymph à l'explosion d'une partie des leucocytes. Il semble donc que l'enzyme ne se trouve pas à l'état libre dans le sang, mais qu'il est localisé dans les leucocytes. Elle ne put expliquer les grandes différences individuelles de l'activité enzymatique. Bhagvat et Richter (1938), enfin, ont mesuré l'activité phénoloxidasique des leucocytes de *Cancer pagurus*, au moyen d'une méthode manométrique à $\text{pH} = 7,4$. Ils ont trouvé une activité dans les leucocytes et dans le sérum. Cette dernière est due à l'hémocyanine et est appelée réaction pseudophénoloxidasique par comparaison avec la réaction pseudoperoxydasique de l'hémoglobine.

Nos expériences permettent de confirmer cette localisation de la phénoloxydase dans les leucocytes. Les résultats divergents obtenus par Pinhey et par Bhagvat et Richter, en ce qui concerne l'intensité de la réaction, sont dus au fait qu'ils ont omis de la suivre au cours des différents stades d'intermue. Nous avons démontré que l'enzyme se présente dans les leucocytes sous une forme inactive, nommée prophénoloxydase ou phénoloxydase latente. Les recherches de Bodine et autres (1941) nous ont appris que la phénoloxydase inactive de *Tenebrio molitor* peut être activée par le chloroforme, l'acétone, le taurocholate de soude, l'oléate de soude et les agents tensio-actifs anioniques, ainsi que par des agents physiques comme la température. Un historique général sur le problème de la phénoloxydase jusqu'en 1955 a été rédigé par Mason (1955).

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Afin d'obtenir une quantité suffisante de leucocytes, nous avons choisi comme objet d'étude le Crabe *Cancer pagurus*. La plupart des Crabes que nous avons étudiés proviennent de la Station Biologique de Den Helder (Pays-Bas). Les expériences ont été effectuées en partie à la Station Biologique de Roscoff. A titre de comparaison, nous avons également étudié quelques exemplaires des espèces suivantes : *Carcinus maenas*, *Maia squinado* et *Portunus puber*. Nous avons classé les Crabes en stades d'intermue suivant le système de Drach (1939). Pour la détermination de l'activité phénoloxidasique, nous avons choisi la méthode manométrique. Dans chaque expérience, les fioles contiennent :

- 0,1 ml enzyme (voir plus loin pour la préparation),
- 1 micromole d'oléate de soude,
- 1 ml tampon phosphate M/10 $\text{pH} = 6,7$,
- 20 micromoles substrat (tyramine-hydrochloride pour la détermination de l'activité monophénolasique et 4-méthylcatéchol pour l'activité diphénoloxidasique),
- 0,1 ml KOH 20 p. 100 dans la cuvette centrale.

Le volume total du liquide est toujours de 2 ml et la température 30°C . Pour déterminer le rapport phénoloxydase inactive/phénoloxydase active, un blanc sans oléate de soude est toujours inclus dans chaque groupe d'observation.

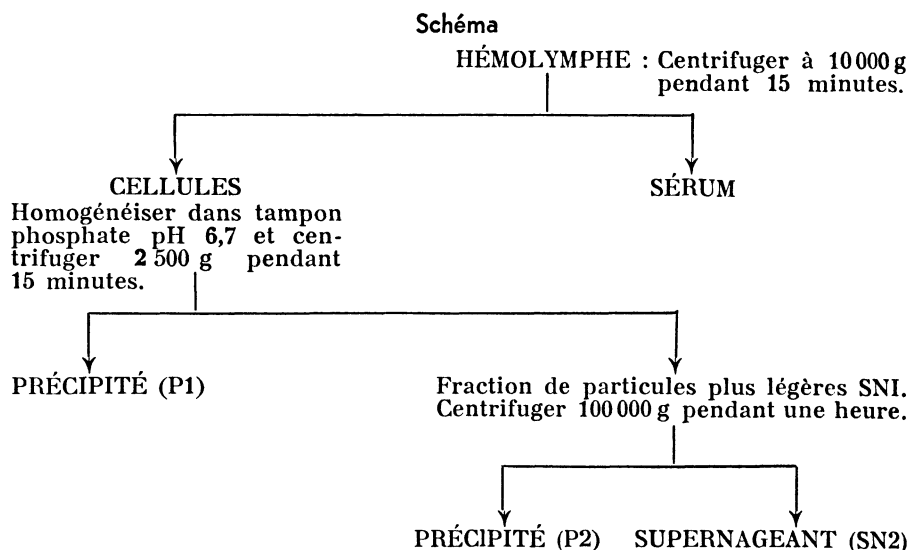
MISE EN ÉVIDENCE DE LA PHÉNOLOXYDASE DANS LES LEUCOCYTES DE *CANCER PAGURUS*

Nous avons trouvé une forte réaction mono- et diphénolasique dans les leucocytes de *Cancer pagurus* pendant les stades d'intermue C3 et C4, ainsi que chez les adultes. A la fin du stade C4, lorsque le sang est fortement concentré et riche en protéines et en cellules, la réaction devient plus faible pour devenir négative, bien avant le début du stade D1. Dans la période d'activité phénoloxidasique positive qui s'étend du commencement du stade C3 au stade C4, nous avons étudié 16 Crabes. Dans cette période, nous n'avons pas trouvé de grandes divergences dans les résultats. Nous donnerons les résultats pour un individu représentant l'animal moyen des Crabes étudiés.

MODE DE TRAVAIL

Le Crabe est refroidi à une température de 0° C. Après amputation d'un des péréopodes, le sang qui s'écoule est recueilli dans un tube à centrifugation porté à 0° C. Le sang est immédiatement centrifugé dans la centrifugeuse Spinco. Après lavage au tampon phosphate pH 6,7, les cellules précipitées sont homogénéisées dans le même tampon. La proportion dans laquelle le tampon est ajouté est de 7 ml par gramme de cellules. Après centrifugation, nous obtenons ainsi un précipité (P1) et un supernageant constitué par une suspension de petites particules (SN1). L'activité enzymatique est indiquée sur la figure 1.

Afin de voir si l'enzyme est attaché aux particules ou non, nous avons centrifugé la fraction SN1 pendant une heure à 100.000 g dans l'ultracentrifugeuse Spinco. Toutes les particules en suspension précipitent (P2) et le supernageant (SN2) contient les enzymes qui ne sont pas (ou qui ne sont plus) liées aux particules.



Résultats

Comme le montre la figure 1, nous trouvons une forte activité mono- et diphénolasique dans la fraction SN1, après addition d'oléate de soude. La proportion enzyme activité/enzyme latent varie fortement suivant le mode opératoire. Différents facteurs comme une augmentation de la température, une forte homogénéisation et une agitation ont pour effet une activation partielle de l'enzyme. Les manipulations faites à basse température (0 à 4°), l'homogénéisation faible pendant un temps très court et immédiatement suivie d'une centrifugation, nous permettent d'obtenir des fractions SN1 dans lesquelles l'activité sans oléate de soude est nulle. Après activation, elle remonte à 0,4 micromole par minute. Après 1 à 2 jours, l'enzyme est partiellement activé. Il s'agit d'une activation spontanée. Dans la fraction P1, l'activité est toujours très faible.

Pour répondre à la question de savoir si l'enzyme est lié ou non à des particules, nous avons aussi examiné plusieurs fractions P2 et SN2. Les résultats variant dans une mesure considérable, nous ne pouvons pas encore donner une réponse décisive à ce sujet. Dans certains cas, toute l'activité se retrouve dans la fraction SN2, dans d'autres, par contre, nous retrouvons une répartition égale d'activité entre P2 et SN2. Dans un seul cas, toute l'activité se retrouve dans la fraction P2. Ces résultats nous permettent d'affirmer que la phénoloxydase sort facilement des cellules et qu'elle n'y est pas liée à des particules. Dans le cas où elle y serait liée, elle en serait, en tous cas, très facilement libérée. Parfois, l'enzyme semble lié plus fortement à des particules. Il nous reste à établir si les propriétés de l'enzyme changent au cours des stades C3 et C4 ou, par contre, si la nature elle-même des particules varie au cours de ces divers stades d'intermue.

L'ACTIVITÉ PSEUDOPHÉNOLOXYDASIQUE DANS LE SÉRUM DE CANCER PAGURUS

A plusieurs reprises, les différents auteurs ont attiré l'attention sur le fait qu'on retrouve dans le sang de Crabes une activité pseudophénoloxydase due à la présence d'hémocyanine (Bhagvat et Richter, 1938 ; Pinhey, 1930). En effet, l'hémocyanine subit, sous l'influence de facteurs physiques et chimiques, certaines modifications moléculaires. La molécule protéinique ainsi modifiée catalyse les oxydations de phénols (Zuckermandl, 1953).

Nous devons tenir compte du fait que les homogénats de leucocytes peuvent être contaminés par des quantités assez importantes d'hémocyanine. Ainsi, l'activité pseudophénoloxydase pourrait intervenir dans la véritable réaction phénoloxydase.

Nos recherches ont démontré qu'une telle intervention n'est pas à craindre. En effet, dans nos conditions expérimentales, nous n'avons jamais vu une réaction positive due à l'hémocyanine, même en

essayant d'activer l'hémocyanine à l'oléate de soude ou à l'urée. La pseudoréaction se manifeste seulement quand nous augmentons le pH du milieu de 6,7 à 7,7. Dans ces conditions, nous devons introduire,

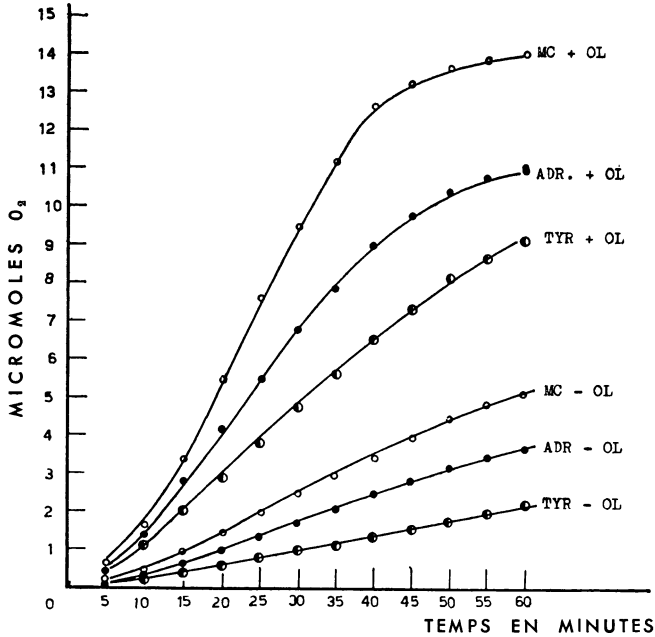


FIG. 1

Activité phénoxydase dans la fraction SNI, avec et sans oléate de soude. Les substrats utilisés sont les suivants : méthylcatéchol, adrénaline et tyramine-hydrochloride.

en outre, une correction due à l'autooxydation des phénols utilisés. Tout en tenant compte de cette correction, nous avons retrouvé une adsorption d'oxygène importante au pH 7,7.

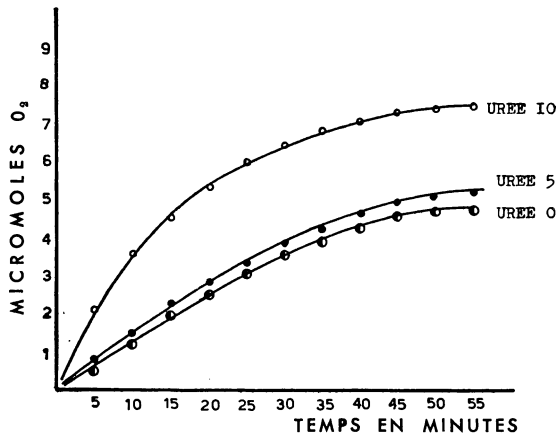


FIG. 2

Activité pseudophénoxydase d'hémocyanine de *Cancer pagurus* en absence d'urée (0 p. 100) et en présence d'urée (5 p. 100 et 10 p. 100). Le substrat utilisé est le méthylcatéchol (taux d'urée en pourcentage).

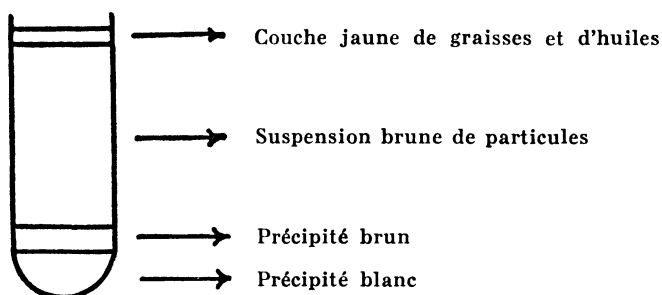
Les différences entre l'activité pseudophénoloxydasique et l'activité phénoloxydasique vraie sont résumées dans le tableau suivant :

ACTIVITÉ PSEUDOPHÉNOLOXYDASIQUE	ACTIVITÉ PHÉNOLOXYDASIQUE VRAIE
<ol style="list-style-type: none"> 1. Non décelable au pH 6,7, même pas en présence d'oléate de soude ou d'urée. 2. Aisément décelable au pH 7,7. Même à forte concentration d'hémocyanine, elle est beaucoup plus faible qu'une véritable réaction phénolasique. 3. Absence de courbe en S. La réaction débute immédiatement à une vitesse de réaction maximale, diminuant après une dizaine de minutes. 4. L'oléate de soude n'influence pas ou très peu la réaction. L'urée à 10 p. 100 influence la réaction (voir Fig. 2). 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Forte réaction au pH 6,7. 2. La réaction au pH 7,7 est un peu plus forte qu'au pH 6,7, mais les résultats obtenus à ce pH sont moins nets parce qu'il faut tenir compte de l'autooxydation du substrat, ainsi que des produits de réaction. 3. Courbe typique en S due à une période d'induction. La réaction s'affaiblit après 30 à 40 minutes. 4. L'oléate de soude influence la réaction quand l'enzyme se trouve au moins partiellement sous la forme inactive. L'urée à 10 p. 100 affaiblit la réaction par dénaturation de l'enzyme.

MISE EN ÉVIDENCE DE LA PHÉNOLOXYDASE DANS L'HÉPATOPANCRÉAS DE CANCER PAGURUS

Mode opératoire

Une partie de l'hépatopancréas est prélevée et séchée entre du papier filtre afin d'éliminer l'excès d'hémolymphe. Après lavage, l'organe est homogénéisé dans un tampon phosphate pH 6,7 dans la proportion de 5 ml par gramme de tissu. Après centrifugation à 2.500 g pendant 15 minutes on obtient 4 couches bien séparées, dont le volume et la couleur peuvent changer au cours des stades d'intermue.



Résultats

Chez quelques animaux, nous trouvons une réaction positive. Dans ce cas, il s'agit de Crabes se trouvant au stade C2 et au début du stade C3. L'activité se retrouve toujours dans la suspension brune de particules. Cet activité phénoloxidasique pendant une période si courte de la vie du Crabe n'est pas en corrélation avec les résultats de Zuckerkandl qui a constaté, dans le cas de *Maia squinado*, une activité enzymatique dans l'hépatopancréas augmentant jusqu'au moment de la mue (Zuckerkandl, 1959).

**ACTIVITÉ PHÉNOLOXYDASIQUE
DANS LES HÉMOCYTES ET DANS L'HÉPATOPANCRÉAS
AU COURS DU CYCLE D'INTERMUE**

Durant notre séjour à la Station Biologique de Roscoff, nous avons eu l'occasion d'étudier des *Cancer* à d'autres stades que C3 et C4. Cela nous a permis une étude de l'activité phénoloxidasique au cours du cycle d'intermue entier. Il s'agit ici d'animaux de différentes tailles. Dans cette première série d'observations, nous avons utilisé les termes conventionnels : fort (pour une consommation d'oxygène supérieure de 0,1 micromole par minute à vitesse de réaction maximale), faible (pour une consommation d'oxygène inférieure à 0,1 micromole par minute) et absent (quand la réaction est nulle).

Stade	Activité dan les hémocytes	Activité dans l'hépatopancréas	Nombre d'animaux analysés
A1	fort	absent	3
A2	fort	absent	2
B1	fort	absent	3
B2	faible	absent	2
C1	faible	absent	1
C2	fort	fort	2
Début C3	fort	fort	2
C3	fort	absent	7
C4	fort	absent	7
C4 (fn)	faible	absent	6
D	absent	absent	5

Il va de soi qu'une étude plus poussée sur un plus grand nombre d'animaux est nécessaire pour connaître le sort exact de l'enzyme dans les périodes B2-C1 et C4-D.

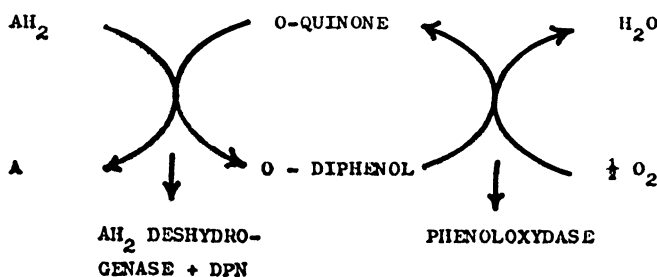
DISCUSSION

Cette étude préliminaire sur la présence de phénoloxydase chez les Crustacés Décapodes Brachyours démontre que dans les leucocytes de Crabes une phénoloxydase, qui s'y trouve dans une forme

inactive, peut être mise en évidence comme chez les Insectes (Jones, 1962 ; Vercauteren et Aerts, 1958 ; Rizki et Rizki, 1959). L'enzyme peut être activé par l'oléate de soude. L'activateur naturel est inconnu. Contrairement à ce que l'on rencontre chez les Insectes où l'enzyme est localisé dans les oenocytoïdes, l'enzyme ne peut être localisé dans des cellules fortement différenciées. Comme nous l'avons déjà montré pour *Carcinus maenas* (Decleir et autres, 1960), l'enzyme se retrouve dans une certaine proportion des leucocytes granulaires des Crabes. Nous n'avons jamais vu une réaction positive dans les leucocytes hyalins.

Cette présence de phénoloxydase dans les leucocytes de Crabe semble être une caractéristique générale puisque nous l'avons retrouvée dans toutes les espèces que nous avons examinées, c'est-à-dire : *Cancer pagurus*, *Carcinus maenas*, *Maia squinado* et *Portunus puber*. L'enzyme ne peut toutefois pas être mis en évidence à chaque stade du cycle d'intermue. Il n'est pas ou très peu décelable durant deux périodes, notamment B2-C1 et fin C4-D. Nous pouvons expliquer ce phénomène de deux manières. On peut se demander en premier lieu si, dans ces périodes d'activité affaiblie, les leucocytes n'accumulent pas des substances qui ralentissent ou arrêtent la réaction. Une deuxième possibilité est que l'enzyme, comme dans le cas des Insectes, est transporté vers l'épiderme et la cuticule à l'approche de la mue. Dans ce dernier cas, l'absence de l'enzyme serait vraiment responsable de la réaction négative. La réapparition de l'enzyme après la mue et en C2 pourrait s'expliquer alors par l'apparition de nouvelles générations de leucocytes. La signification de la présence de l'enzyme dans l'hépatopancréas durant un laps de temps très court n'est pas connue. Nous présumons que l'enzyme pourrait se former dans l'hépatopancréas et être transporté ensuite vers les leucocytes.

Le rôle et la présence de l'enzyme dans la cuticule ont été discutés par Dennell (1947). Comme pour les Insectes (Dennell, 1958), l'enzyme pourrait intervenir dans le tannage et la pigmentation, lors de la formation de la nouvelle cuticule. La présence de l'enzyme dans les leucocytes, durant la plus grande partie de la vie du Crabe, ainsi que chez les Crabes adultes, nous suggère que la phénoloxydase pourrait avoir d'autres fonctions que le tannage et la pigmentation de la nouvelle cuticule. L'enzyme peut en effet intervenir dans les oxydations terminales des cellules en transportant l'hydrogène de DPNH ou un autre donneur d'hydrogène à l'oxygène sans intervention des cytochromes suivant, par exemple, le schéma ci-joint :



A ce sujet, il est intéressant de remarquer que nous n'avons jamais retrouvé dans les leucocytes de Crabe une réaction peroxyda-

sique. Peut-être la phénoloxydase des leucocytes d'Invertébrés a-t-elle un rôle plus ou moins analogue à la peroxydase des leucocytes de Vertébrés. Les deux enzymes, en effet, peuvent oxyder plusieurs substrats communs.

Summary

Crab leucocytes are proved to contain a phenoloxydase in the inactive form. The enzyme can also be found in the hepatopancreas and the cuticle. Its activity varies with the intermoult stage. Hemocyanine shows a pseudophenoloxydase reaction but in our working conditions, this reaction does not interfere with the true phenoloxydase reaction. The significance of the enzyme is discussed.

Zusammenfassung

Es ist bewiesen worden, dass die Leukozyten der Krabben Phenoloxydase in einer inaktiven Form enthalten. Dieses Enzym findet man aber auch in der Mitteldarmdrüse und in der Cuticula. Die Wirkung des Enzyms ändert sich nach den verschiedenen, untersuchten Häutungsstufen. Die Hämocyanine gibt eine Pseudophenoloxydaserreaktion, aber unter unseren Untersuchungsbedingungen hat sich erwiesen dass sie keinen Einfluss auf die wahre Phenoloxydaserreaktion ausübt. Die Bedeutung des Enzyms wird diskutiert.

Nous désirons exprimer toute notre gratitude au professeur G. Teissier, directeur de la Station Biologique de Roscoff, qui a permis à l'un de nous (W. D.) de poursuivre ses recherches dans les laboratoires de Roscoff. Nous remercions également tout le personnel de la Station pour l'aide dont nous avons joui durant ce séjour. A la direction des Relations Culturelles et du Centre National de la Recherche Scientifique, qui nous ont délivré une bourse de recherches, nous adressons nos plus vifs remerciements.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- AERTS, F. et VERCAUTEREN, R., 1964. — Specificity and mode of action of phenoloxydase from larvae of *Tenebrio molitor*. *Enzymologia* : à paraître.
- BHAGVAT, K. et RICHTER, D., 1938. — Animal phenolases and adrenaline. *Biochem. J.*, 32, p. 1397.
- BODINE, J. et ALLEN, T., 1941. — Enzymes in ontogenesis XV. Some properties of protyrosinases. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 18, pp. 151-160.
- DECLEIR, W., 1961. — The localisation of copper in agar gel electrophoretic patterns of crustacean blood. *Naturwiss.*, 48, pp. 102-103.
- DECLEIR, W., AERTS, F. et VERCAUTEREN, R., 1960. — The localisation of polyphenoloxydase in hemocytes. *11th Int. Congr. Entomol. Vienna*, B 3, pp. 176-179.
- DENNELL, R., 1947. — The occurrence and significance of phenolic hardening in the newly formed cuticle of Crustacea Decapoda. *Proc. Roy. Soc. London*, Ser B 134, p. 485.
- DENNELL, R., 1958. — The hardening of Insect cuticles. *Biol. Rev.*, 33, pp. 178-196.
- DRACH, P., 1939. — Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes. *Ann. Inst. Océanogr.*, 19, pp. 103-388.
- JONES, J.C., 1962. — Current concepts concerning Insect hemocytes. *American Zoologist*, 12, pp. 209-246.
- KARLSON, P. et LIEBAU, H., 1961. — Reindarstellung, Kristallisation und Substratspezifität der o-diphenoloxydase aus *Calliphora erythrocephala*. *Hoppe Seyler's Zeitschr. Physiol. Chemie*, 326, pp. 135-143.
- MASON, H.S., 1955. — Comparative biochemistry of the phenolase complex. *Adv. Enzymol.*, 16, pp. 105-184.
- PINHEY, K.G., 1930. — Tyrosinase in crustacean blood. *J. Exp. Biol.*, 7, pp. 19-36.

- RIZKI, M.T.M. et RIZKI, R.M., 1959. — Functional significance of the crystal cells in the larva of *Drosophila melanogaster*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 5, pp. 235-240.
- VERCAUTEREN, R. et AERTS, F., 1958. — On the cytochemistry of the hemocytes of *Galleria mellonella* with special reference to polyphenoloxylase. *Enzymologia*, 3, pp. 167-172.
- ZUCKERKANDL, E., 1953. — La position stérique du cuivre dans l'hémocyanine et dans les oxydases cupriques. *C.R. Soc. Biol.*, 147, p. 629.
- ZUCKERKANDL, E., 1959. — L'oxydation d'un diphénol par des extraits d'hétopancréas de *Maia squinado* au cours du cycle d'intermue. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 249, pp. 466-467.