

ÉTUDE COMPARATIVE DE LA PHÉNOLOXYDASE CHEZ LES INSECTES ET CHEZ LES CRUSTACÉS.⁽¹⁾

par

W. Decleir⁽²⁾ et R. Vercauteren

Laboratoire de Chimie physiologique, Université de Gand (3).

Résumé

Les leucocytes des Crustacés et des Insectes contiennent une phénoloxydase inactive. En approfondissant l'étude des propriétés de l'enzyme, nous constatons qu'il existe de grandes différences entre ces deux groupes d'animaux. Il s'ensuit que cet enzyme a probablement une signification différente chez les Crustacés et chez les Insectes. Nous avançons une hypothèse qui tient compte de ces faits.

INTRODUCTION

On admet généralement que la phénoloxydase leucocytaire des Crustacés est comparable à celle du sang des Insectes et qu'elle intervient dans le tannage et la pigmentation de la nouvelle cuticule après chaque mue (Florkin 1960). Si les propriétés et le rôle de l'enzyme ont été bien établis chez les Insectes, il n'en va pas de même pour les Crustacés. Une étude préliminaire des Décapodes (Decleir et Vercauteren 1965) a démontré que l'enzyme est généralement répandu dans les leucocytes de Crabe et qu'on l'y trouve sous forme inactive comme chez les Insectes. Nous avons fait une étude comparative de l'enzyme chez les Insectes et chez les Crustacés afin d'établir si son rôle est le même pour ces deux groupes animaux.

I. LA PHÉNOLOXYDASE CHEZ LES CRUSTACÉS.

Les travaux sur la phénoloxydase chez les Crustacés sont très rares. Pinhey (1930) a démontré que l'activité phénoloxidasique dans le sang de *Cancer pagurus* est localisée dans les hémocytes. Bhagvat et Richter (1938) ont confirmé ce résultat par une méthode manométrique plus sûre et ils ont trouvé, de plus, une activité phénoloxidasique due à l'hémocyanine du sérum. Ils l'appelèrent activité pseudophénol-

(1) Etude effectuée dans le cadre du programme n° 76 « Enzymologie » du CFWO, Belgique.

(2) Bénéficiaire d'une bourse de recherches de l'accord culturel franco-belge et du Centre National de la Recherche Scientifique pour un séjour à l'Institut de Biologie maritime et régionale de Wimereux.

(3) Adresse : Casinoplein 21, Gent, Belgique.

oxydase. Enfin, l'enzyme a été localisé dans un certain type d'hémoocytes (Decler, Aerts et Vercauteren 1960) et nous avons pu démontrer qu'il se manifeste sous une forme inactive (Decler et Vercauteren 1965). Les expériences présentées ici montreront que l'activité de l'enzyme varie fortement au cours du cycle d'intermue.

Matériel et méthode.

Nous avons choisi comme objet d'étude le Crabe *Cancer pagurus* dont la taille à l'état adulte permet la récolte d'une quantité suffisante d'hémoocytes. Nous avons obtenu des Crabes de grande taille par l'intermédiaire de pêcheurs de la région de Boulogne et nous avons fait la plupart de nos recherches à l'Institut de Biologie maritime et régionale de Wimereux.

La préparation de l'enzyme et la mesure de l'activité enzymatique ont été décrites en détail (Decler et Vercauteren 1965). Pour les expériences présentées ici, nous avons toujours utilisé la méthode manométrique.

Chaque fiole contient toujours :

- 0,1 ml enzyme,
- 4 ou 20 micromoles d'oléate de soude,
- 1 ml tampon phosphate M/10 pH = 6,7,
- 20 micromoles de 4-méthylcatéchol,
- 0,1 ml KOH 20 p. 100 dans la cuvette centrale.

Le volume total du liquide est toujours 2 ml et la température 30° C.

Nous avons classé les Crabes en stades d'intermue suivant le système de Drach (1939) qui permet de diviser le temps, entre deux mues successives, en une série de périodes de durées inégales, en se basant sur des caractéristiques morphologiques. Pour établir les diagrammes, comparant les animaux aux différents stades d'intermue, nous avons choisi une série de huit animaux par stade étudié ayant à peu près 9 cm de largeur céphalothoracique. Ainsi, il nous a été possible de suivre certains phénomènes chez ces Crabes au cours de tout le cycle d'intermue. Malheureusement on ne peut obtenir, chez ces animaux de taille réduite, une quantité suffisante d'hémoocytes pour une étude plus approfondie de la phénoloxydase. Nous avons donc dû réunir une seconde série d'exemplaires ayant une largeur de 16 cm. Quand la mue approche, ces animaux de grande taille se cachent au fond de la mer, parmi les rochers et, dans ces conditions, il est presque impossible de les pêcher. Nos expériences sur les échantillons de la seconde série se limitent donc aux stades C1 et D1. En effet, ce sont les seuls stades d'intermue que nous avons pu trouver pendant notre séjour à Wimereux. Quant à la série des grands Crabes de 16 cm, nous avons pu y analyser les exemplaires ainsi répartis :

- stade C1 : 3,
- stade C2 : 4,
- stade C3 : 11,
- stade C4 : 16 (subdivisés en C4a : 9 et C4b : 7),
- stade D1 : 2.

Nous avons été obligés, au cours de notre travail, de partager le stade C4 en deux sous-stades C4a et C4b. En effet, nous avons constaté que les animaux de grande taille du stade C4 se subdivisent toujours en deux groupes. Pour le premier groupe, le volume de liquide cavitaire est deux ou trois fois plus grand et la quantité de protéines précipitées soit par l'acide nitrique concentré, soit par l'acide trichloracétique à 20 p. 100 est beaucoup moins importante. De plus, l'aspect général de la carapace semble presque toujours plus « neuf » pour le premier groupe. Tous ces faits nous ont amenés à conclure que le premier groupe, que nous avons appelé C4a, représente des animaux au début de C4 et le deuxième, que nous avons appelé C4b, à la fin du stade C4. Chez les animaux de la série de 16 cm, on trouve toujours les deux groupes réunis, car leur stade C4 dure environ deux ans. Il est bien connu (Drach 1939) que le liquide cavitaire est dilué environ 10 fois par l'absorption d'eau au moment de la mue et que, pendant l'intermue, il y a une diminution du volume occupé par le liquide cavitaire, due à la croissance des tissus.

Nous ne connaissons pas d'autres auteurs ayant essayé de subdiviser la période d'intermue des Crustacés en se basant sur des propriétés physiologiques ou biochimiques plutôt que morphologiques.

Résultats.

1° Localisation de l'enzyme dans les leucocytes.

La mise en évidence de l'activité phénoloxydase sur des frottis de sang fixés dans des vapeurs de formol, se fait par incubation d'une heure dans la solution suivante (Decler et al. 1960) :

- 20 ml catéchol 0,15 M,
- 20 ml oléate de soude 0,01 M,
- 20 ml tampon phosphate 0,1 M pH = 7,2,
- 5 ml méthanol.

Le cytoplasme d'un certain nombre de leucocytes est d'un ton brun uniforme. Les granules ne se colorent pas ou très peu. Cette coloration se manifeste seulement au pH neutre. Des températures élevées et des agents comme le cyanure de potassium (0,01 M final) et l'éthylxanthate (0,06 M final) empêchent la réaction. Les leucocytes à réaction positive sont toujours du type marqué P (Pl. I, 1). Ce sont des cellules très réfringentes au contraste de phase. Elles sont boursées de granules de taille différente et ont un noyau central. Ce type de leucocyte représente environ 45 p. 100 de la totalité des hémocytes de *Cancer pagurus* en C4 et est considéré comme le stade final de la différenciation morphologique des autres leucocytes (Cuénot 1895 ; Lochhead et Lochhead 1941).

Cependant, il faut remarquer qu'un certain pourcentage seulement de ce type leucocytaire donne une réaction positive. Il varie suivant le stade d'intermue étudié (par exemple, 70 à 90 p. 100 en C3 ; 30 p. 100 en C4a et 0 p. 100 en C4b). Ce résultat est en corrélation avec les mesures quantitatives indiquées plus loin.

2° Variation de l'activité phénoloxydasic au cours du cycle d'intermue.

Pinhey (1930), puis Bhagvat et Richter (1938) ont attiré l'attention sur le fait que le taux de l'enzyme varie fortement d'un animal à l'autre. Une grande partie des animaux étudiés ne montrait même pas d'activité du tout. Nous avons résolu le problème des grandes différences individuelles en matière d'activité enzymatique, en tenant compte des divers stades du cycle d'intermue. En effet, quand on subdivise les Crabes suivant le système de Drach, il n'y a plus de grands écarts entre les animaux au même stade d'intermue (maximum 20 p. 100). Ainsi, il nous a été possible de suivre l'activité phénoloxydasic au cours de tout le cycle d'intermue, au moins pour les animaux de la première série, comme nous le montre la figure 1. Toutes les mesures ont été effectuées sur le surnageant obtenu après

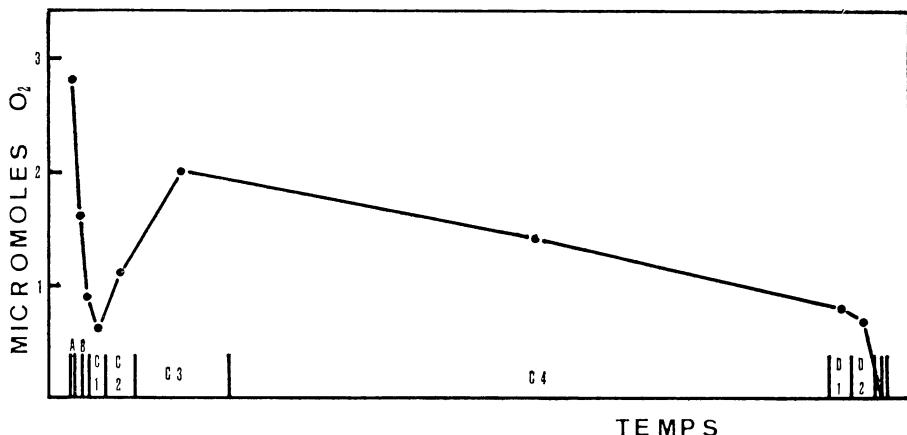


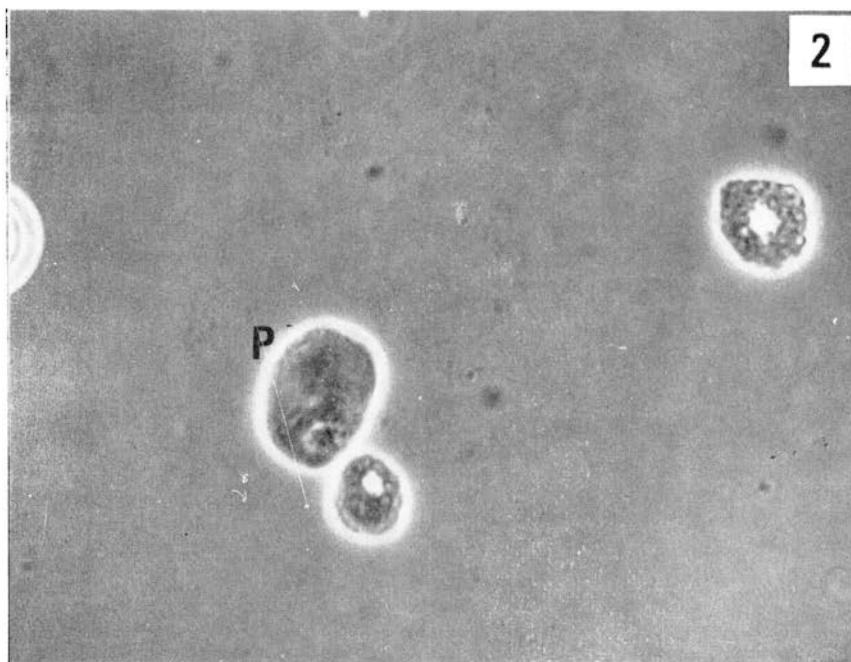
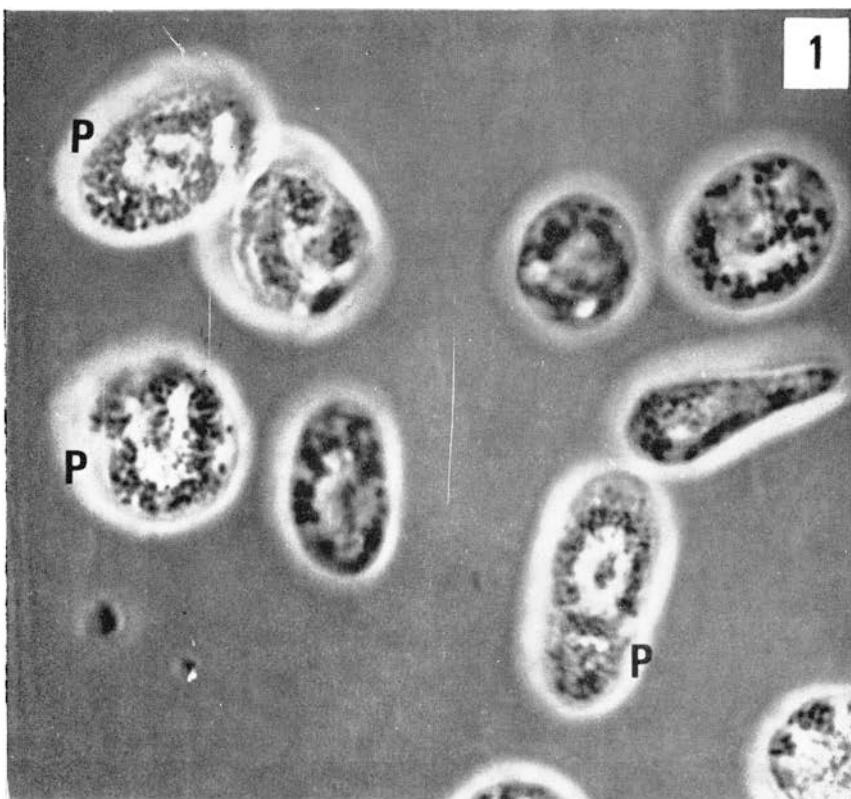
FIG. 1

Variation de l'activité phénoloxydasic au cours du cycle d'intermue. Les points du diagramme représentent les moyennes d'analyse de huit animaux par stade (première série : animaux de 9 cm).

L'activité est donnée en micromoles $\text{O}_2/\text{minute}/\text{ml}$.

centrifugation à 2.500 g des homogénats de leucocytes en tampon phosphate pH = 6,7. Comme nous l'avons déjà décrit antérieurement (Decleir et Vercauteren 1965), l'activité du précipité est nulle ou très faible.

Le diagramme (Fig. 1) présente deux maximums, un premier juste après la mue en A1 et un second en C3. Nous ne pouvons pas encore expliquer avec certitude la cause de l'existence de ces deux périodes d'activité élevée, mais nous pensons qu'il existe une corrélation entre nos résultats et ceux de Marrec (1944). Cet auteur a mis en évidence, chez les Crabes, deux périodes pendant lesquelles le taux de leucocytes augmente dans le liquide cavitaire. La première se situe au moment de la mue proprement dite, lorsque les leucocytes, formés dans la glande lymphocytogène de la paroi de l'estomac, sont amenés par l'eau qui entre et arrivent brusquement et en grand nombre dans le sang ; la seconde, au début de la période C, lorsque les leucocytes

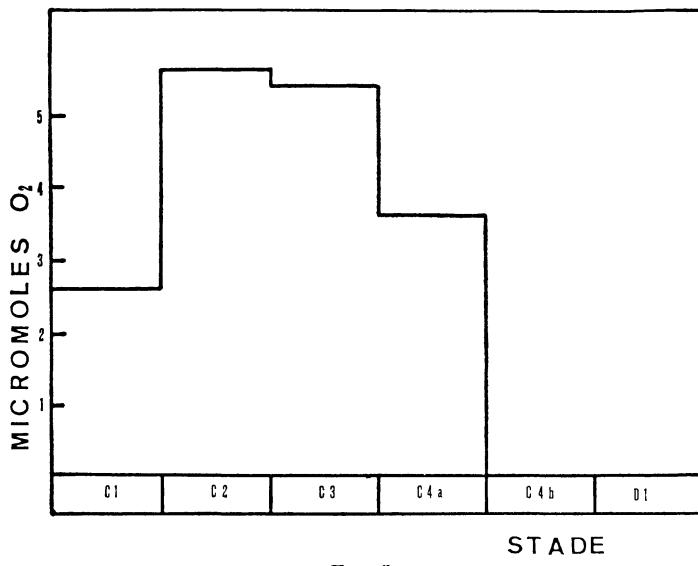


W. DECLERI ET R. VERCAUTEREN PLANCHE I

1. - Leucocytes de *Cancer pagurus* (stade C4). Les leucocytes à réaction positive sont du type indiqué par un P.
2. - Leucocytes de *Galleria mellonella* (dernier stade larvaire). Au milieu, indiqué par un P un œnocytoïde.

pénètrent dans le liquide cavitaire, au fur et à mesure de leur formation.

La figure 2 nous montre la variation d'activité phénoloxydase pour les animaux de 16 cm. Comme il a déjà été expliqué plus haut, nous avons pu subdiviser le stade C4 de ces animaux, à cause de sa longue durée, en deux stades intermédiaires, C4a et C4b. L'activité s'est entièrement interrompue à partir du stade C4b (Fig. 2).



Variation de l'activité phénoloxydase au cours du cycle d'intermue (deuxième série : animaux de 16 cm).

L'activité est donnée en micromoles O_2 /minute/ml.

3° Influence de la concentration de l'oléate de soude sur l'activité enzymatique.

Comme nous l'avons déjà démontré (Decleir et Vercauteren 1965), nous pouvons retrouver dans les homogénats de leucocytes de Crabe une forte activité mono- et diphenoloxydase après addition d'oléate de soude comme activateur. L'activité est toujours nulle en l'absence d'activateur, si l'on prend soin de faire toutes les manipulations à basse température et si l'on effectue une homogénéisation ménagée et de courte durée.

Nous avons constaté qu'il est possible de retrouver une activité phénoloxydase dans le second groupe d'animaux (16 cm) au stade C4b, en augmentant le taux d'activateur. Ainsi, nous avons mis en évidence une activité phénoloxydase qui exige une concentration d'oléate de soude beaucoup plus élevée que celle des stades antérieurs. Nous appellerons activité 1, l'activité des premiers stades et activité 2, celle du stade C4b (ou enzymes 1 et 2). L'activité optimale est obtenue pour l'enzyme 1 à un taux d'activateur de 4 micromoles par fiole (2mM) et, pour l'enzyme 2, à un taux de 20 micromoles par fiole

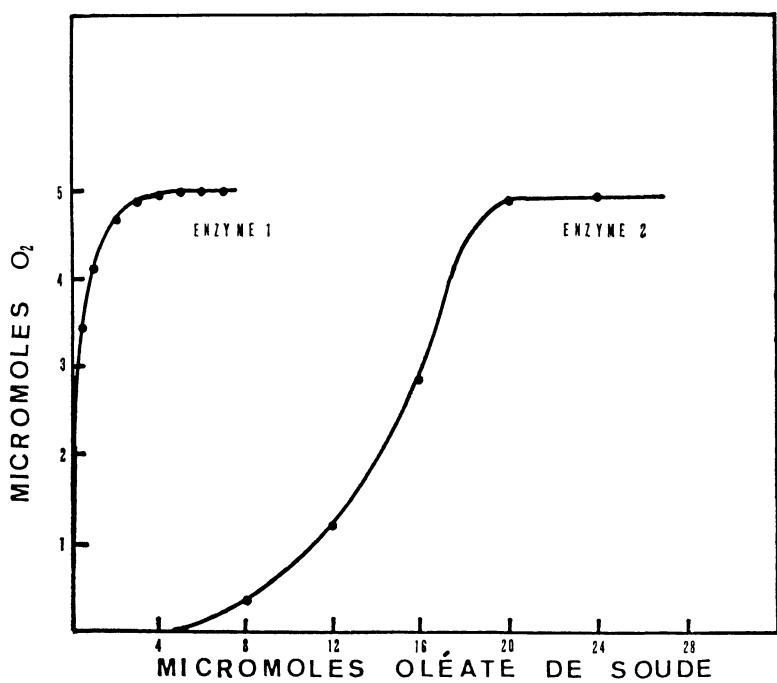


FIG. 3

Influence de la concentration de l'oléate de sodium sur l'activité enzymatique. L'activité est donnée en micromoles O_2 /minute/ml.

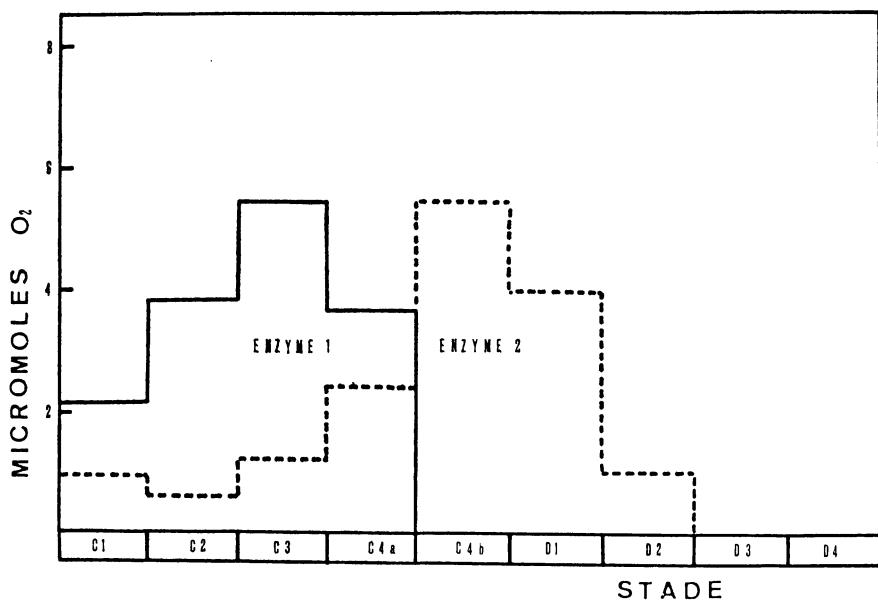


FIG. 4

(10mM). L'aspect des courbes d'activation est différent pour les deux enzymes. Dans le cas de l'activation de l'enzyme 1, nous obtenons une courbe hyperbolique et, dans le cas de l'enzyme 2, une courbe en forme de S (Fig. 3).

4° Etude de deux activités phénoloxydasiques au cours du cycle d'intermue.

La figure 4 représente l'évolution de l'activité enzymatique au cours du cycle d'intermue, obtenue pour l'enzyme 1 (avec 4 micromoles d'activateur) et l'enzyme 2 (avec 20 micromoles d'activateur). Les valeurs de l'activité de l'enzyme 1 pour les stades où nous les trouvons ensemble, ont été calculées en soustrayant l'activité obtenue avec 4 micromoles de celle qu'on obtient avec 20 micromoles d'oléate de soude.

L'aspect général des deux courbes d'activité nous amène à conclure que l'activité de l'enzyme 1, qui disparaît avant C4b, est remplacée par l'activité de l'enzyme 2.

II. LA PHÉNOLOXYDASE CHEZ LES INSECTES.

Chez les Insectes, l'enzyme se trouve sous une forme inactive, nommée prophénoloxydase ou phénoloxydase latente (Bodine et Allen 1941 ; Aerts et Vercauteren 1964 ; Karlson et Schweiger 1961). L'activateur naturel n'est pas connu. Karlson et Schweiger (1961) ont démontré que, dans le cas de *Calliphora*, l'enzyme latent peut être activé par un activateur peptidique, localisé dans l'épiderme. La synthèse et l'activité de cet activateur dépendent de l'hormone de mue, l'ecdysone. Cependant, Aerts et Vercauteren (1964) ont prouvé que l'activation de l'enzyme de *Tenebrio molitor* peut être effectuée par des agents tensio-actifs anioniques comme l'oléate de soude. En outre, on a pu, dans la cuticule de *Tenebrio molitor*, mettre en évidence une variété d'acides gras qui est capable d'activer la phénoloxydase latente et qui pourrait se former sous l'action d'une lipase (R. Heyneman : communication personnelle).

Finalement, Mitchell (1966) et Geiger et Mitchell (1966) ont trouvé, dans le cas de *Drosophila melanogaster*, un complexe protéinique partiellement dérivé des glandes salivaires et agissant comme activateur de la phénoloxydase. Cette activation semble donc un processus très compliqué dans lequel plusieurs hormones et enzymes pourraient jouer un rôle très important. Fraenkel et Hsiao (1965) ont trouvé une hormone qu'ils ont appelée bursicon, responsable du tannage chez les Insectes et sécrétée par le ganglion abdominal terminal (Mills et al. 1965). Le fonctionnement exact de cette hormone n'est pas encore connu.

Chez les Insectes, la phénoloxydase latente est transportée dans l'hémolymphe par des hémocytes très différenciés. Chez les Diptères, l'enzyme est localisé dans les « spherule cells » (Dennell 1947 ; Jones 1956). Chez *Galleria* (Pl. I, 2), *Tenebrio*, *Bombyx*, etc., ce sont les

oenocytoïdes qui contiennent l'enzyme (Vercauteren et Aerts 1958 ; Decler et al. 1960 ; Rizki et Rizki 1959 ; Kawase 1960).

Tous ces hémocytes contenant l'enzyme, sont des cellules très différenciées et bien distinctes des autres leucocytes. Ils ne représentent qu'un petit pourcentage de la totalité des globules du sang. Pour *Tenebrio molitor*, par exemple, nous avons trouvé que le pourcentage des oenocytoïdes, après chaque mue larvaire monte de 0 p. 100 après l'exuviation, à 4 p. 100 avant la mue suivante. On ne les retrouve plus chez les adultes.

L'activité enzymatique dans le sang des larves d'Insectes monte très lentement après chaque mue, beaucoup plus vite à l'approche de la mue, passe par un maximum au moment de l'exuviation et réapparaît quelque temps après la mue (Karlson et Schweiger 1961). Ainsi la variation en activité phénoloxydase reflète le taux en oenocytoïdes dans le sang.

La façon dont l'enzyme est incorporé dans la cuticule n'est pas encore connue. Poyarkoff (1910) et Wigglesworth (1933) ont décrit un processus suivant lequel les oenocytoïdes grandissent et deviennent plus nombreux juste avant la mue, puis émigrent vers les membranes basales du tégument où ils sont détruits.

III. ÉTUDE COMPARATIVE DE LA PHÉNOLOXYDASE CHEZ LES INSECTES ET CHEZ LES CRUSTACÉS.

Comme nous l'avons démontré, il est possible de mettre en évidence une activité phénoloxydase dans les leucocytes des Insectes et des Crabes. L'enzyme a été bien étudié chez les Insectes et son rôle a été bien établi. Au moment de la mue, les leucocytes émigrent vers les membranes basales du tégument où l'enzyme est incorporé dans la cuticule et jouera un rôle très important dans la pigmentation et le tannage de la nouvelle cuticule. La signification physiologique de l'activité phénoloxydase chez les Crustacés n'est pas encore connue. Nos résultats permettent déjà de faire une première comparaison entre l'activité enzymatique chez les Crabes et les Insectes. Il en ressortira que le rôle de l'enzyme est bien différent chez les Crabes.

1° Chez les Insectes, l'enzyme est lié à un type leucocyttaire très spécialisé et bien distinct des autres cellules. Ce type leucocyttaire ne représente qu'un faible pourcentage (0 à 4 p. 100) de la totalité des leucocytes, n'apparaît en quantité perceptible qu'à l'approche de la mue, après laquelle il a disparu. Il n'existe pas chez les adultes. Il montre toujours une réaction positive envers la phénoloxydase.

Chez les Crustacés, l'activité enzymatique est confiée au type leucocyttaire qui représente environ 40 p. 100 de la population cellulaire. Ce type existe aussi bien chez les jeunes que chez les adultes. Cependant, il ne montre pas toujours une réaction positive. Après le stade C3, quand il n'y a plus d'hémocytopoïèse, le pourcentage des leucocytes à réaction positive diminue pour devenir nul en C4b. Cela pourrait s'expliquer de deux façons : ou bien les propriétés de l'enzyme ont

changé, ou bien l'enzyme est sorti de la cellule. La possibilité que les deux phénomènes se produisent simultanément doit également être considérée.

2° L'activité de l'enzyme chez les Insectes augmente lentement au cours du cycle d'intermue, augmente fortement à l'approche de la mue et disparaît après l'exuviation.

Chez les Crustacés, l'évolution de l'activité au cours du cycle d'intermue se fait dans le sens opposé. Il y a très peu d'activité tout juste avant la mue, mais elle est très forte après celle-ci. L'activité passe alors par un minimum et remonte à partir du stade C1 quand l'animal recommence à se nourrir après le jeûne forcé lors de la mue. Après le stade C3, alors que la plus grande partie du cycle d'intermue commence, il y a une diminution constante de l'activité phénoloxidasique. Quand le cycle d'intermue est très long, comme c'est le cas pour les animaux de carapace large de 16 cm (durée du cycle entier : environ 2 années), l'activité disparaît entièrement en C4b, longtemps avant que les premiers signes d'une mue prochaine ne se manifestent.

3° La concentration optimale en activateur, pour l'activité phénoloxidasique retrouvée aux premiers stades d'intermue, est environ 2 mM et la courbe correspondante est hyperbolique. Ces résultats sont très analogues à ceux obtenus pour les Insectes (Heyneman et Vercauteren 1964 ; Aerts et Vercauteren 1964). Cependant, nous avons pu démontrer qu'au moment où l'activité enzymatique disparaît (en C4b), une autre se développe ayant des propriétés bien différentes. La concentration optimale de l'activateur est maintenant de 10 mM et la courbe est en forme de S. Une activité phénoloxidasique qui exige pareilles concentrations de l'activateur n'a pas encore été décrite et il nous semble peu probable que de pareilles conditions de concentration de l'activateur puissent se réaliser chez l'animal. Néanmoins, l'activité phénoloxidasique exigeant 2 mM d'oléate de soude pour son fonctionnement est remplacée ou modifiée au cours du cycle d'intermue de sorte que l'activité ne se manifeste qu'à partir de 10 mM du même activateur. Ce phénomène n'est pas en corrélation avec la mue puisqu'il se manifeste pendant une période très éloignée de cette dernière.

IV. DISCUSSION.

Nous avons étudié l'activité phénoloxidasique dans les leucocytes de Crabe au cours du cycle d'intermue. Chez les Crustacés, comme chez les Insectes, l'enzyme se présente sous une forme inactive et l'oléate de soude est un activateur très efficace. Cependant, quand on compare les propriétés de l'activité enzymatique, sa variation au cours d'une mue à l'autre et le taux d'activateur nécessaire, on doit conclure que la signification physiologique de cette activité est tout à fait différente chez les Crustacés et chez les Insectes.

La baisse de l'activité à partir du stade C3 suggère que l'enzyme que nous avons retrouvé aux premiers stades d'intermue ne joue aucun rôle lors de la mue elle-même. En outre, le tannage de la cuticule,

si important dans le cas des Insectes, n'a qu'une importance secondaire pour les Crustacés dont le squelette tégumentaire est calcifié. L'enzyme que nous avons retrouvé à partir de C4b et qui semble remplacer l'activité des premiers stades, a des propriétés extraordinaires. Le taux d'activateur nécessaire nous amène à supposer que l'activité enzymatique de la substance en question ne joue aucun rôle dans la nature. L'explication du rôle physiologique des deux activités enzymatiques au cours du cycle d'intermue ne peut être donnée avec certitude. Des recherches supplémentaires restent à faire, comme par exemple la purification et l'identification chimique des facteurs responsables des activités phénoloxydases.

Une explication plausible de nos résultats pourrait nous être donnée par l'étude d'une autre métalloprotéine à base de cuivre, qu'on trouve dans le sérum des Crabes, notamment le pigment respiratoire hémocyanine. La structure de cette protéine, qui forme de 80 à 100 p. 100 de la totalité des protéines du sérum, est déjà assez bien connue, sa propriété de lier réversiblement les molécules d'oxygène l'est aussi, mais son origine et sa biosynthèse sont totalement inconnues. Il a déjà été démontré que cette protéine présente une réaction pseudo-phénoloxydase comparable à la réaction pseudo-peroxydase de l'hémoglobine (Bhagvat et Richter 1938 ; Decleir et Vercauteren 1965). En outre, nous avons pu démontrer que l'hémocyanine peut donner une réaction phénoloxydase après activation par l'oléate de soude. La concentration activante est encore plus élevée que celle que nous avons retrouvée pour l'enzyme 2 dans les leucocytes. Tous ces résultats nous amènent à supposer que l'activité phénoloxydase, que nous retrouvons dans les leucocytes de Crabe et qui ne semble pas jouer un rôle lors de l'exuviation, est en vérité une réaction pseudo-phénoloxydase d'une métalloprotéine à base de cuivre. Il se peut que les protéines, qui donnent une activité phénoloxydase avec les différentes concentrations d'oléate de soude, soient des phases de la construction de ce polymère à poids moléculaire élevé qu'est l'hémocyanine.

Tout cela n'est qu'une hypothèse pour expliquer les résultats de nos recherches. Des expériences plus poussées sont nécessaires pour connaître les propriétés et la signification des activités phénoloxydases que nous avons pu montrer dans les leucocytes de *Cancer pagurus*.

Summary

Leucocytes of crustaceans and insects contain an inactive phenoloxidase. A comparative study of this enzyme shows that there are considerable differences in both groups of invertebrates. Hence it follows that the enzyme in crustaceans has not the same signification as in insects. One hypothesis on this subject has been worked out.

Zusammenfassung

Die Blutzellen der Krustentiere und der Insekten enthalten eine inaktive Phenoloxidase. Wenn wir aber die Eigenschaften des Enzyms etwas näher betrachten entdecken wir dass es für diese zwei Tiergruppen bedeutende Unterschiede gibt. Daraus ergibt sich dass dieses Enzym für die Krustentiere eine andere Bedeutung hat als für die Insekten. In dieser Hinsicht wurde eine Hypothese aufgestellt.

Nous sommes tout particulièrement reconnaissants envers le Professeur R. Defretin, qui a permis à l'un de nous (W.D.) de poursuivre son travail pendant quatre mois à l'Institut de Biologie maritime et régionale de Wimereux. Nous remercions également le personnel de l'Institut pour l'aide qu'il nous a apportée. Tous nos remerciements vont également à la direction des Relations Culturelles et du Centre National de la Recherche Scientifique pour la bourse de recherches dont nous avons bénéficié.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- AERTS, F. et VERCAUTEREN, R., 1964. — The specificity and mode of action of phenol-oxidase from larvae of *Tenebrio molitor*. *Enzymologia*, 28, pp. 1-20.
- BHAGVAT, K. et RICHTER, D., 1938. — Animal phenolases and adrenaline. *Biochem. J.* 32, pp. 1397-1406.
- BODINE, J. et ALLEN, T., 1941. — Some properties of tyrosinases. *J. Cell. Comp. Physiol.* 18, pp. 151-160.
- CUÉNOT, L., 1895. — Etudes physiologiques sur les Crustacés Décapodes. *Arch. Biol.* 13, pp. 245-303.
- DECLEIR, W., AERTS, F. et VERCAUTEREN, R., 1960. — The localisation of polyphenol-oxidase in hemocytes. *11th Int. Congr. Entomol. Vienna B3*, pp. 176-179.
- DECLEIR, W. et VERCAUTEREN, R., 1965. — L'activité phénoloxydase dans les leucocytes de crabes au cours du cycle d'intermue. *Cah. Biol. Mar.* VI, pp. 163-172.
- DENNELL, R., 1947. — A study of an insect cuticle: the formation of the puparium of *Sarcophaga falculata* Pand. *Proc. Roy. Soc. London Ser. B* 134, pp. 79-110.
- DRACH, P., 1939. — Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes. *Ann. Inst. Océanogr.* 19, pp. 103-388.
- FLORKIN, M., 1960. — Dans « The physiology of Crustacea » édité par T.H. Waterman A.P., I, p. 152.
- FRAENKEL, G. et HSIAO, C., 1965. — Bursicon, a hormone which mediates tanning and cuticle in the adult fly and other insects. *J. Insect Physiol.* 11, pp. 513-556.
- GEIGER, H. et MITCHELL, H., 1966. — Salivary gland function in phenoloxidase production in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 12, pp. 747-754.
- HEYNEMAN, R. et VERCAUTEREN, R., 1964. — Activation of the latent phenoloxidase of *Tenebrio molitor*. *Enzymologia*, 28, pp. 85-88.
- JONES, J., 1956. — The hemocytes of *Sarcophaga bullata* Parker. *J. Morphol.* 99, pp. 233-257.
- KARLSON, P. et SCHWEIGER, A., 1961. — Das Phenoloxidasesystem von *Calliphora* und seine Beeinflussung durch das Hormon Ecdysone. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie* 323, pp. 199-210.
- KAWASE, S., 1960. — Tyrosinase in the silkworm during the pupation period. *J. Insect Physiol.* 5, pp. 335-340.
- LOCHHEAD, J. et LOCHHEAD, M., 1941. — Studies on the blood and related tissues in *Artemia salina*. *J. Morphol.* 68, pp. 593-632.
- MARREC, M., 1944. — L'organe lymphocytogène des Crustacés Décapodes. Son activité cyclique. *Bull. Inst. Océanogr.* 41, pp. 1-4.
- MILLS, R., MATHUR, R. et GUERRA, A., 1965. — Release of an activation factor from the terminal abdominal ganglion. *J. Insect Physiol.* 11, pp. 1047-1053.
- MITCHELL, H., 1966. — Phenoloxidases and *Drosophila* development. *J. Insect Physiol.* 12, pp. 755-765.
- PINHEY, K., 1930. — Tyrosinase in crustacean blood. *J. Exp. Biol.* 7, pp. 19-36.
- POYARKOFF, E., 1910. — Recherches histologiques sur la métamorphose d'un Coléoptère. *Arch. Anat. microsc.* 12, pp. 333-474.
- RIZKI, M. et RIZKI, R., 1959. — Functional significance of the crystal cells in the larva of *Drosophila melanogaster*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5, pp. 235-240.
- VERCAUTEREN, R. and AERTS, F., 1958. — On the cytochemistry of the hemocytes of *Galleria mellonella* with special reference to polyphenoloxidase. *Enzymologia* 3, pp. 167-172.
- WIGGLESWORTH, V., 1933. — The physiology of the cuticle and of ecdysis in *Rhodnius prolixus*. *Quat. J. Micr. Sc.* 76, pp. 269-318.