

L'HÉMOCYANINE ET LA GLANDE BRANCHIALE DE *SEPIA OFFICINALIS* L. (MOLLUSQUE CEPHALOPODE)

par

W. DECLEIR (1), A. RICHARD (2), J. LEMAIRE (3) et G. WOLF (1)

RÉSUMÉ

La glande branchiale de la seiche (Mollusque Céphalopode) est formée d'un tissu abondamment irrigué. L'ultrastructure des cellules atteste la possibilité de sécrétion protéique : nucléole très actif, ergastoplasme très abondant, golgi actif. Les résultats biochimiques soutiennent l'hypothèse que la glande branchiale serait un organe de synthèse de l'hémocyanine.

INTRODUCTION

Depuis la description de JOUBIN (1885) on connaît la morphologie de ces glandes paires, étroitement associées à la branchie, dénommées glandes branchiales. Diverses fonctions ont été proposées pour ces organes abondamment vascularisés : fonction hématopoïétique (JOUBIN, 1885) niée par CUENOT (1891), fonction endocrine (GRIMPE 1913 et TURCHINI, 1923) intervenant dans la croissance (HUTCHINSON, 1928; SERENI, 1932) ou dans la régulation de la pression artérielle (MITOLO, 1938) ou encore analogue dans son action, à celle des surrénales des vertébrés (TAKI, 1940, 1943, 1964).

Les premiers résultats en microscopie électronique (RICHARD, 1968) nous permettaient de constater l'abondance de l'ergastoplasme, du golgi ... et de considérer cette glande comme « lieu possible de biosynthèse des protéines sanguines » (RICHARD, 1971). Les recherches entreprises depuis cette date (RICHARD et DECLEIR, 1969; DECLEIR et coll. 1969, 1970, 1971) nous ont permis de préciser les mécanismes d'ontogenèse de l'hémocyanine chez les céphalopodes. En nous appuyant sur les observations ultrastructurales (RICHARD, 1973, RICHARD et DECLEIR, 1973) nous précisons les rôles respectifs du foie et de la glande branchiale dans les mécanismes d'élaboration du pigment sanguin.

Les résultats de DILLY et MESSENGER (1972), SCHIPP et coll. (1973) confirmaient l'hypothèse de biosynthèse de l'hémocyanine dans la glande branchiale.

En plus de ces divers résultats, il nous est apparu nécessaire d'étayer l'observation cytologique par des analyses biochimiques. Nous nous limiterons dans cette note à l'exposé de ces résultats préliminaires.

(1) Laboratorium voor biochemie — R.U.C.A., Slachthuislaan 68, B 2000 Antwerpen, Belgique.

(2) Laboratoire de biologie et écologie marines — SN3, Université de Lille I, B.P. 36, F 59650 Villeneuve d'Ascq, France.

(3) Institut de biologie maritime et régionale, Boite postale 41, F 62930 Wimereux, France.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Les glandes branchiales ont été prélevées sur des seiches récoltées par chalutages effectués en Manche ou provenant de lots d'élevage selon la technique mise au point par RICHARD (1966, 1975).

L'étude histologique a été réalisée selon les méthodes classiques. Les fragments de glande destinés à l'étude au microscope électronique sont fixés au glutaraldéhyde à 6 % dans un tampon phosphate (SABATINI et coll., 1963) pendant 2 h à 4° C. ou à 3 % dans un tampon phosphate en solution d'eau de mer, suivi d'une post-fixation osmique dans les mêmes tampons. Après inclusion à l'épon 812 (LUFT, 1961), les coupes réalisées à l'ultracutome LKB, contrastées aux sels de plomb et colorées à l'acétate d'uranyle ont été examinées au Siemens Elmiskop I. Les coupes semi-fines pour la microscopie photonique ont été colorées au bleu de toluidine.

Les glandes branchiales destinées à l'analyse biochimique sont congelées à — 25° C immédiatement après leur prélèvement. Le sang utilisé pour cette étude est recueilli en ponctionnant les cœurs branchiaux *in situ* : il est ensuite centrifugé (800 g à 4° C), et congelé à — 25° C.

Nous avons procédé à une homogénéisation différentielle du tissu de la glande branchiale. Quatre grammes sont légèrement homogénéisés par broyage au mortier, dans 20 ml de tampon Tris-glycine 0,052 M, à pH 8,9. L'homogénat est centrifugé à 4° C, pendant 1 heure à 145.000 g (Ultracentrifugeuse Beckman avec rotor Ti-50). Le surnageant S1 est mis en dialyse dans 1 l. de tampon Tris-glycine (pH 8,9 à 4° C) successivement pendant 2 heures et 16 heures, puis centrifugé à 145.000 g.

Le surnageant obtenu est lyophilisé à sec et constitue ce que nous avons appelé l'extrait « mortier ».

Le précipité P1 est repris dans 20 ml de tampon Tris-glycine et homogénéisé par la technique de Potter-Elvehjem (Braun Melsungen) à 4° C, à raison de 1.000 tours/minute (10 mouvements de haut en bas). Après centrifugation à 145.000 g pendant 1 heure à 4° C de l'homogénat, le surnageant obtenu S2 subit le même traitement que S1 pour constituer l'extrait « POTTER ».

Enfin, le précipité P2 est homogénéisé dans 20 ml de tampon Tris-glycine avec un homogénéiseur VIRTIS (30.000 tours/min) pendant 2 minutes à 4° C. L'homogénat obtenu traité comme précédemment nous donne l'extrait « VIRTIS ».

Chromatographie sur colonne.

Les extraits lyophilisés sont dissous dans 5 ml d'eau bidistillée. 2,5 ml de chacune des solutions sont analysés sur colonne (2,6 cm/25 cm) d'agarose-acrylamide (A.C.A. 22, gel L.K.B., avec limites de séparation entre 60.000 et 1.000.000 P.M.).

L'élution de la colonne est effectuée avec un tampon Tris-glycine (pH = 8,9 à 4° C), à débit constant de 28 ml/h : des fractions de 1,60 ml sont récoltées. La densité optique de l'éluat a été enregistrée à 278 nm (Gilson-spectrochrom).

L'électrophorèse.

Les fractions récoltées après chromatographie sur colonne ont été analysées par électrophorèse sur gel d'acrylamide (6 mm/65 mm) : mélange des solutions A, B, P et H₂O dans les proportions suivantes :

1 volume de solution A (36 g Tris + 0,46 ml TEMED dans 100 ml de 0,5 N HCl).

2 volumes de solution B composée des solutions SAS (60 % acrylamide et 1,60 % bisacrylamide), $K_3Fe(CN)_6$ à 1,5 % et H_2O (33,3; 1; 50) d'après WAEHNELD et SHOOTER, 1973).

4 volumes de solution P (persulfate d'ammonium à 0,15 %).

1 volume d'eau.

Le tampon de cathode est un tampon Tris-glycine 0,052 M à pII 8,9 alors qu'à l'anode, nous avons utilisé un tampon Tris-HCl 0,01 M à pH 8,1. L'électrophorèse est effectuée à 4° C pendant 10 mn à 0,2 mA, puis 10 mn à 1 mA et enfin 60 mn à 3 mA par tube. Les bandes protéiniques ont été mises en évidence après incubation pendant 30 mn dans une solution à 0,2 % de noir d'amidon dans l'acide acétique à 10 %, suivie d'une décoloration par l'acide acétique à 10 %.

RÉSULTATS

Les glandes branchiales de la seiche sont des organes pairs situés dans l'axe de la branchie. Contrairement à la glande branchiale des Céphalopodes Octopodes (TAKI, 1964) où cette glande semble bien individualisée, la glande branchiale de la seiche (Pl. I, fig. 1,2), de forme tubulaire, est insérée dans l'axe dorsal de la branchie. Sur le vivant les tissus paraissent légèrement plus teintés de jaune que les pinnules branchiaux.

L'aspect des tissus glandulaires, isolés du tissu branchial par une basale, apparaît sur coupes semi-fines (Pl. I, fig. 3) conforme aux descriptions antérieures des cytologistes (YUNG KO CHING, 1930; CAZAL et BOGORAZE, 1949). La glande n'est pas reliée à d'autres conduits qu'aux vaisseaux sanguins. Le réseau vasculaire qui l'irrigue est d'ailleurs complexe : le sang, mélange artériel et veineux est repris par un vaisseau éfférent. Les cellules polygonales de 15 à 20 microns (Pl. I, fig. 3), plus ou moins groupées en acini, ont toujours une face en contact avec un capillaire ou une lacune sanguine. On doit noter que les techniques de fixation utilisées pour l'étude ultrastructurale donnent de bien meilleures images que celles obtenues en microscopie optique. Le fait marquant est la présence d'un noyau à nucléole très net (Pl. I, fig. 3) et d'un cytoplasme pourvu d'un réticulum abondant. C'est en effet l'abondance de l'ergastoplasme (Pl. I, fig. 4) qui permet de caractériser la cellule glandulaire branchiale. Suivant la densité et le diamètre des saccules du réticulum endoplasmique, on a pu parler (RICHARD, 1968) de cellule sombre et de cellule claire. Dans les cellules où la densité des membranes réticulaires pourvues de ribosomes est très forte (Pl. I, fig. 4; Pl. II, fig. 1) on peut parler de cellules sombres : celles-ci sont des images de cellules en début de phase d'activité sécrétoire tandis que dans les cellules dites claires (Pl. II, fig. 1) l'augmentation relative des diamètres des travées ergastoplasmiques donne au cytoplasme une teinte plus claire. Le contenu de ce réticulum est constitué d'un matériel où l'on identifie sur coupes des sections annulaires ou elliptiques de 250 à 300 Å de diamètre. Dans ces mêmes cellules, le réseau vasculaire s'ouvre et présente des aspects vacuolaires. On note également dans ces cellules quelques mitochondries (Pl. I, fig. 4) en nombre faible et sensiblement constant.

Un autre aspect marquant de ces cellules glandulaires est la présence d'un appareil de golgi très net (Pl. II, fig. 2). Les dictyosomes constitués de saccules étroits libèrent des grains de sécrétion au matériel dense qui atteignent 2.000 à 4.000 Å de diamètre. On peut suivre ces granules, bien individualisés par une enveloppe, jusqu'aux membranes plasmiques.

En nous limitant à cette description non exhaustive des quelques organites cellulaire on peut noter la finalité sécrétoire protéinique de ces cellules glandulaires avec un ergastoplasme à nombreux ribosomes et un golgi actif.

Pour tenter de préciser cette activité cellulaire, nous rendrons compte des résultats des analyses biochimiques rassemblées dans les figures 1 et 2.

Les taux en protéines et en cuivre des fractions obtenues après chromatographie sur colonnes du sang, des extraits « mortier », « Potter », et « Virtis » sont indiqués dans la figure 1. La figure 2 représente les électrophorégrammes de ces fractions.

L'analyse de la glande branchiale par chromatographie sur colonnes permet de mettre en évidence 5 fractions protéiniques (fig. 1 et tableau 1).

TABLEAU 1

Fractions protéiniques de la glande branchiale après chromatographie sur colonnes

Fraction protéinique	Fraction d'élution
a	30 à 38
b	40 à 50
c	50 à 80
d	82 à 90
e	92 à 105

Le sang montre deux fractions protéiniques : l'importance de la première (a) est assez faible, la deuxième (b) correspond par sa teneur élevée en cuivre à l'hémocyanine. L'extraction différentielle de la glande branchiale par des techniques d'homogénéisation de plus en plus destructives nous montre que cette fraction hémocyanique (b) diminue progressivement à chaque étape de l'analyse différentielle pour devenir très faible dans l'extrait « Virtis » de la glande.

Par contre la fraction « a » devient de plus en plus importante au fur et à mesure que les extractions sont plus poussées. Cette fraction se retrouve également dans le sang, bien que l'analyse électrophorétique montre que sa composition est moins homogène que celle de la glande.

Les fractions protéiniques c, d et e de la glande ne se retrouvent pas dans le sang. Ce sont donc des fractions protéiniques spécifiques de ces cellules glandulaires : elles contiennent, comme nous le montrent les électrophorèses, des protéines migrant relativement vite dans le champ électrique : elles sont par contre dépourvues de cuivre.

D'autre part, une fraction nouvelle apparaît après homogénéisation au « Virtis » : cette fraction de faible poids moléculaire, contient très peu de protéines, et relativement beaucoup de cuivre. Sur électrophorégramme on ne retrouve qu'une bande très faible migrant avec le front. Cette nouvelle fraction montre des propriétés d'élution comparables à la fraction e.

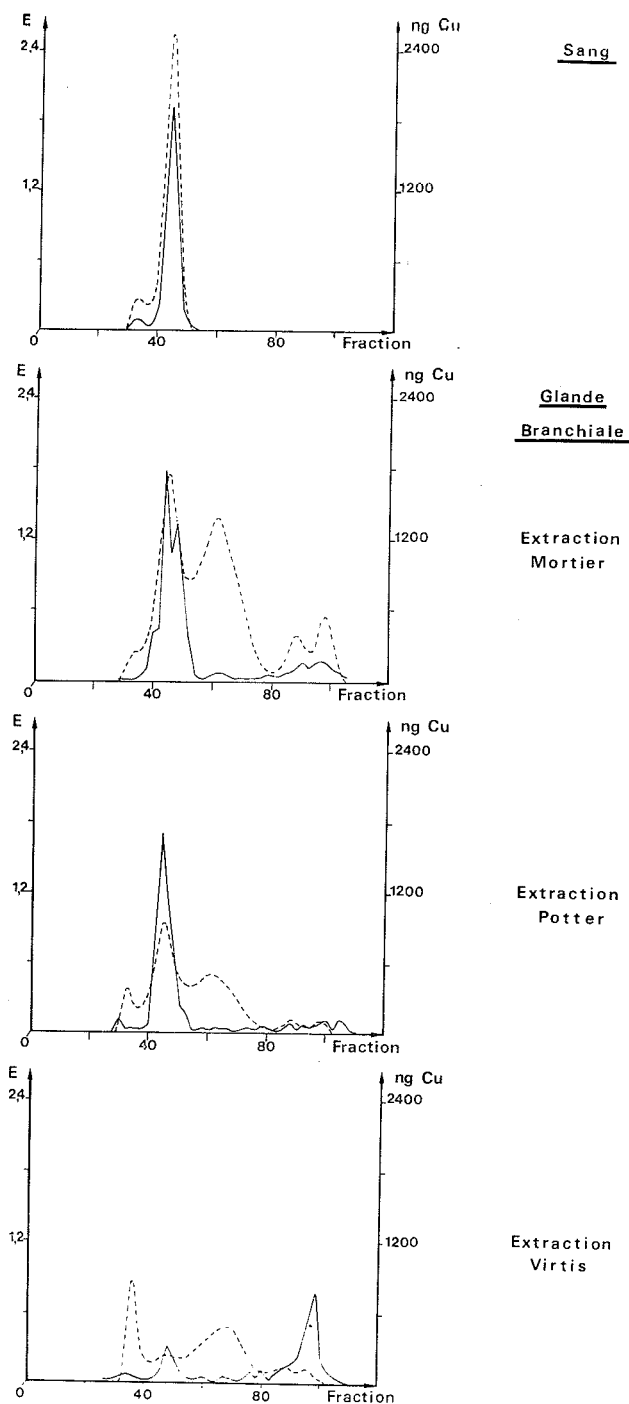


Fig. 1. — Analyse du sang et de la glande branchiale de *Sepia officinalis* L. par chromatographie sur colonnes.

Ligne pointillée = teneur en protéines évaluée par l'extinction E;
Ligne pleine = teneur en cuivre exprimée en ng.

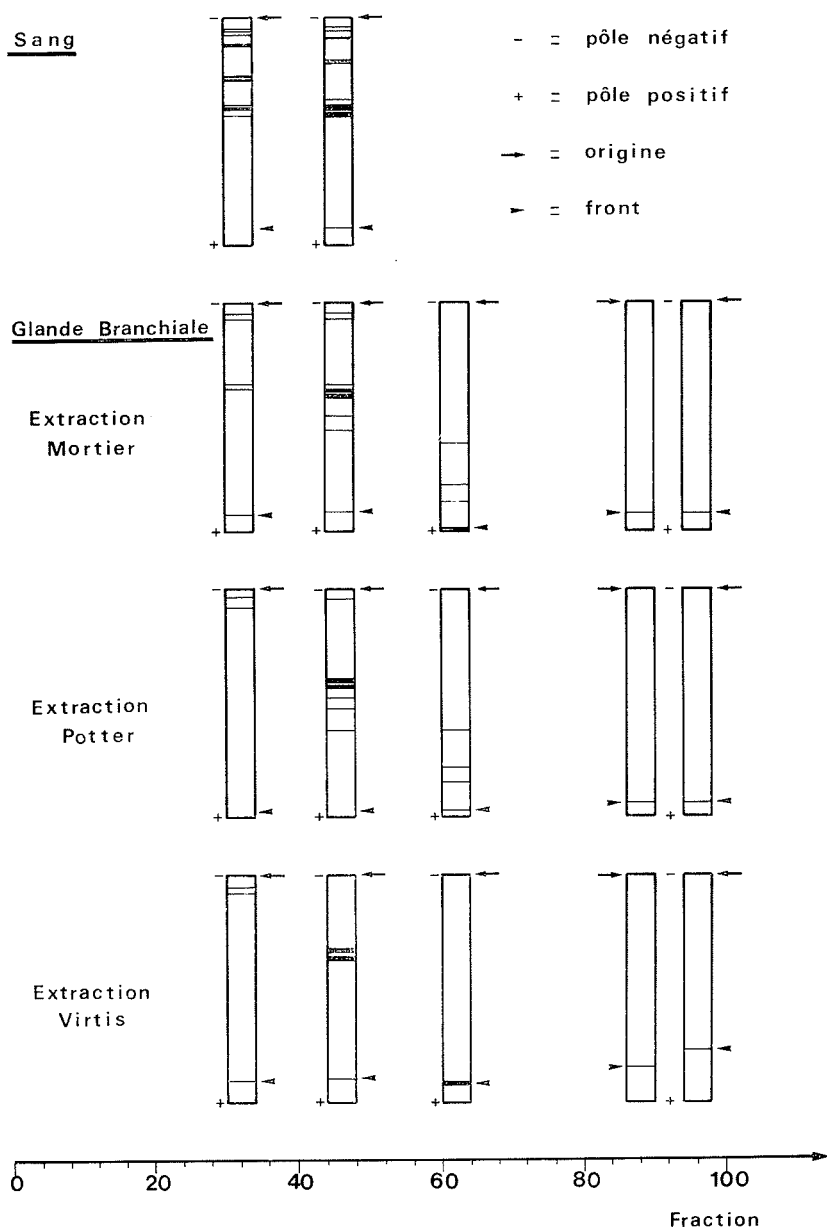


Fig. 2. — Analyse du sang et de la glande branchiale de *Sepia officinalis* L. par électrophorèse en gel d'acrylamide après chromatographie sur colonnes.

DISCUSSION

L'hypothèse qui consiste à considérer la glande branchiale comme lieu de biosynthèse de l'hémocyanine se justifie par les faits cytologiques. L'abondance de l'ergastoplasme, le nombre de ribosomes qui donnent le caractère basophile au cytoplasme (CAZAL et BOGORAZE, 1949; HUTCHINSON, 1928; YUNG KO CHING, 1930) peut s'expliquer par la nécessité d'élaborer la protéine constitutive du pigment sanguin des Céphalopodes. Indépendamment de ces faits, cette hypothèse permet par ailleurs d'expliquer (RICHARD, 1971) les résultats apparemment discordants des auteurs qui nous ont précédés. La sécrétion s'élimine bien dans le sang, d'où la nature « endocrine » des tissus (TURCHINI, 1928; CAZAL et BOGORAZE, 1949). Le manque de tonicité, la diminution de la pression sanguine et l'anémie consécutifs à l'ablation de la glande (MITOLO, 1938; TAKI, 1940, 1964) sont des troubles qui peuvent être justifiés quand on pense au rôle de capteur d'oxygène de l'hémocyanine. La nécrose ovarienne qui découle de la branchialectomie (TAKI, 1964) peut être une conséquence secondaire par manque d'irrigation des ponts vasculaires nourriciers des cellules folliculaires ovariennes (RICHARD, 1971). Il reste à interpréter les résultats cytologiques et les faits biochimiques.

Comme nous le montrent la figure 1 et le tableau 1, cinq fractions protéiniques sont obtenues avec des techniques d'extraction relativement douces (extraits « mortier » et « Potter »). Les deux fractions plus lourdes (fractions a et b) se retrouvent aussi dans le sang. Elles correspondent probablement au sang situé dans les lacunes et vaisseaux intercellulaires. Les autres fractions (c, d et e) contiennent le contenu protéinique cellulaire de structures plus fragiles comme l'ergastoplasme et les vacuoles intracellulaires. Une homogénéisation au Virtis, qui détruit aussi les structures cellulaires plus stables, comme les granules golgiens, produit deux fractions particulières. La première de ces fractions est une protéine à poids moléculaire élevé, qui ne contient que des traces de cuivre, qui ne migre que très lentement dans le champ électrique (figure 2) et qui correspond à la première fraction protéinique du sang. L'autre fraction contient très peu de protéines et beaucoup de cuivre. C'est très probablement un peptide à cuivre.

Dans l'hypothèse où la glande branchiale serait le site de biosynthèse de l'hémocyanine et où les sécrétions golgiennes formeraient un stade important dans l'hématopoïèse, ces deux protéines joueraient un rôle prépondérant dans l'élaboration de la molécule d'hémocyanine.

La participation des sécrétions granulaires de petite taille (45 à 65 Å) signalées par SCHIPP et coll. (1973) resterait à préciser. Ces auteurs, comme DILLY et MESSENGER (1972), ne semblent pas avoir observé de sécrétions golgiennes et interprètent la sécrétion ergastoplasmique comme un produit final pouvant être rejeté hors de la cellule glandulaire. Cette interprétation confirmée par la présence de cuivre dans la glande (SCHIPP et coll. 1973) est en effet une des possibilités d'explication de nos images ultrastructurales. Il reste à préciser la participation de l'appareil de golgi dans ces mécanismes d'élaboration.

Par ailleurs, il se pourrait que les 2 fractions protéiniques obtenues au Virtis ne soient que des portions de la molécule hémocyanique, qui apparaîtraient à la suite des divers traitements appliqués à la glande branchiale. Nous avons donc effectué sur le sang les différentes manipulations d'extraction différentielle telles que nous les avons pratiquées sur la glande branchiale. Les résultats obtenus avec l'extrait final (extrait « Virtis ») sont tout à fait comparables à ceux présentés pour le sang

dans les figures 1 et 2. Les 2 fractions protéiniques, mises en évidence après traitement au Virtis, sont donc propres aux cellules de la glande branchiale et ne dérivent en aucune façon de l'hémocyanine.

Il nous reste, par des méthodes biochimiques identiques à rechercher le site métabolique d'entrée du cuivre dans le pigment sanguin. ROCCA (1969) a pu montrer en effet que dans l'hépatopancréas d'*Octopus*, 50 à 60 % du cuivre était lié à une substance d'un poids moléculaire compris entre 5.000 et 30.000. Dans des publications préliminaires concernant la seiche, (DECLEIR, LEMAIRE et RICHARD 1971; RICHARD, 1973; LEMAIRE, RICHARD et DECLEIR, 1976) le rôle du foie a déjà été évoqué. La suite de nos recherches concernant le rôle de la glande branchiale comprendra d'autre part une étude biochimique des granules isolés.

REMERCIEMENTS

Nous voulons exprimer ici notre gratitude au Prof. Van Grieken et Paul Geladi (Université d'Anvers — U.I.A.) de leur aide pour la détermination du cuivre dont les détails seront publiés ultérieurement.

Nous remercions également Paul Stoppie et Andrea Vlaeminck (Université d'Anvers — R.U.C.A.) pour leur aide très efficace pour les travaux biochimiques et Françoise Bonet (LA C.N.R.S. Lille n° 148) pour les travaux à l'ultraviseur LKB.

Ce travail fait partie du programme belge n° 2.9010.75 du F.R.F.C.

Hemocyanin and the branchial gland in *Sepia officinalis* L

ENGLISH SUMMARY

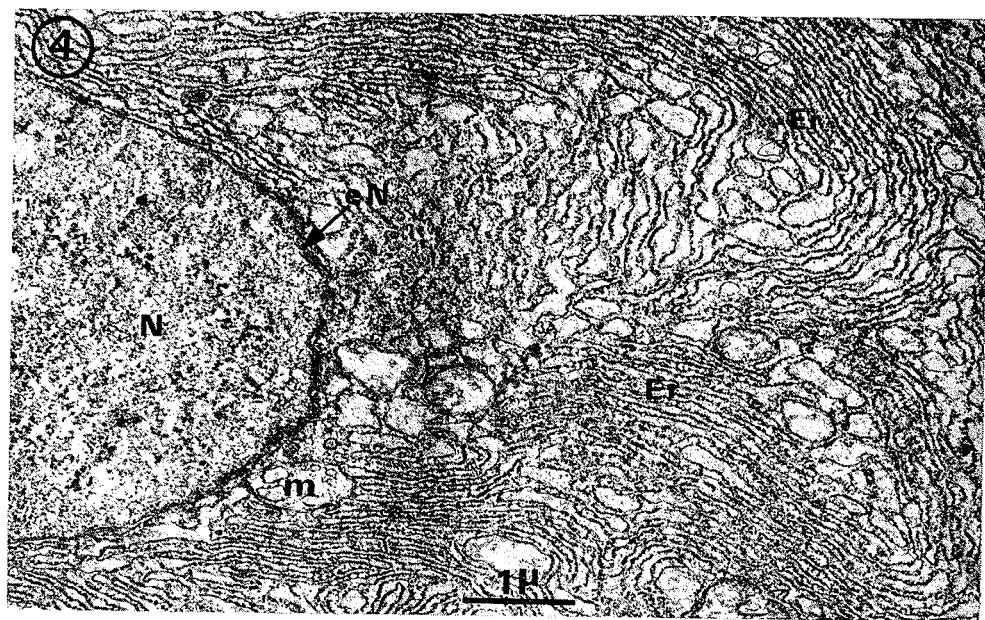
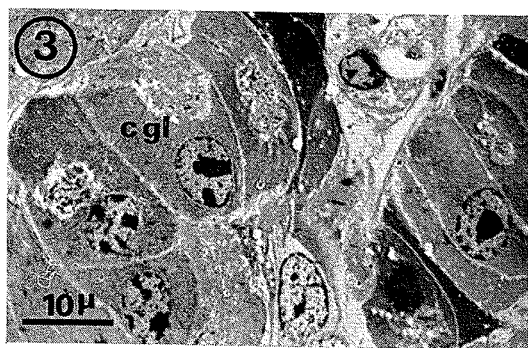
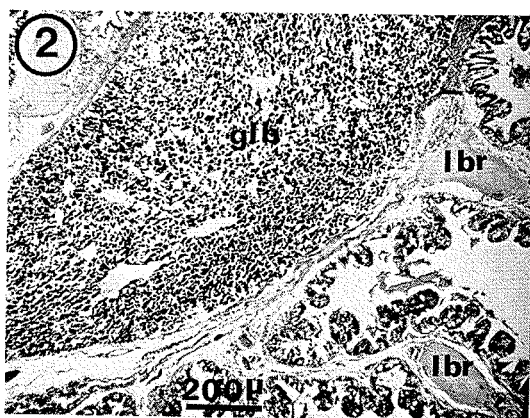
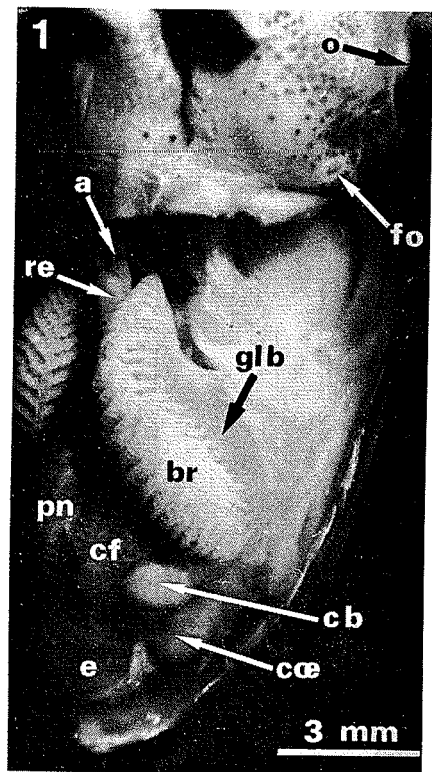
The branchial gland from the cuttlefish (Cephalopod Mollusc) consists of extensively irrigated tissue, which shows a typical ultrastructure of protein-secreting cells : prominent nucleolus, elaborate system of granular endoplasmic reticulum and active Golgi apparatus.

The possible hemopoietic role of the gland is sustained by our biochemical results.

LÉGENDES DE LA PLANCHE I

- Fig. 1. — Vue ventro-latérale gauche d'une jeune seiche de 35 jours, après dissection.
Fig. 2. — Aspect général de la glande branchiale et de la branchie en coupe transversale.
Fig. 3. — Cellules glandulaires de la glande branchiale : coupe semi-fine colorée au bleu de Toluidine.
Fig. 4. — Détail d'une cellule glandulaire (Gt 15.000); noter la richesse du cytoplasme en ergastoplasme.

a : anus; br : branchie; c.b. : cœur branchial; c.f. : corps fongiformes; c.gl. : cellule glandulaire; coe : coecum; e : estomac; e.N. : enveloppe nucléaire; Er. : ergastoplasme; f.o. : fossette olfactive; gl.b. : glande branchiale; l.br. : lamelle branchiale; m. : mitochondrie; N. : noyau; o. : œil; p.n. : poche du noir; re. : rectum.



BIBLIOGRAPHIE

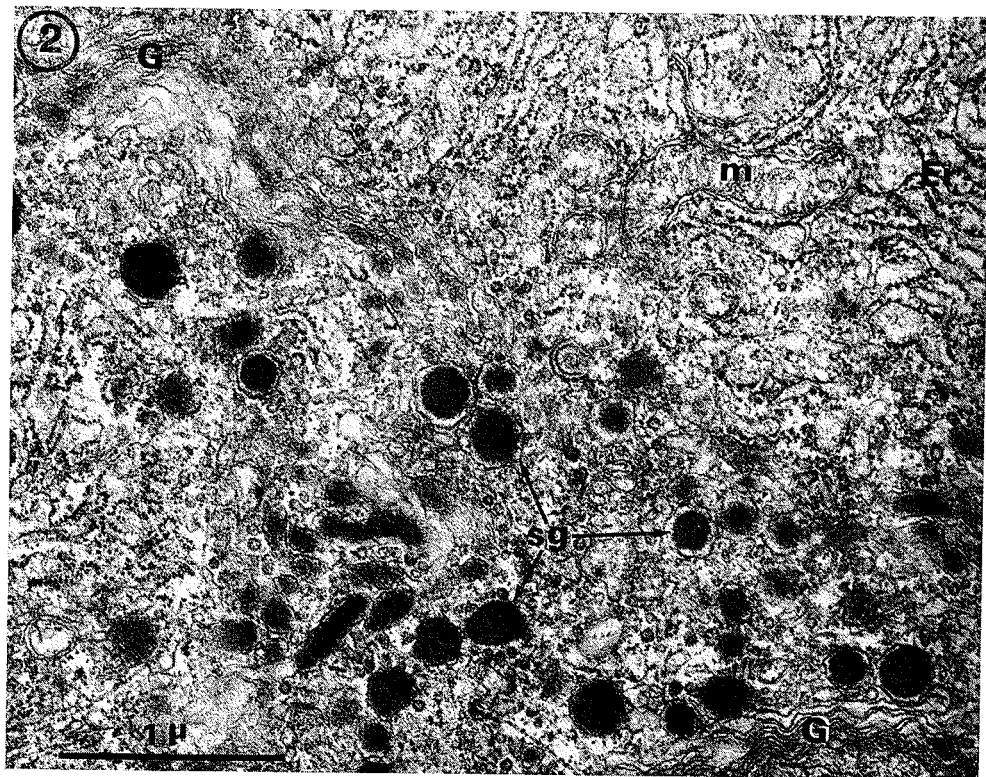
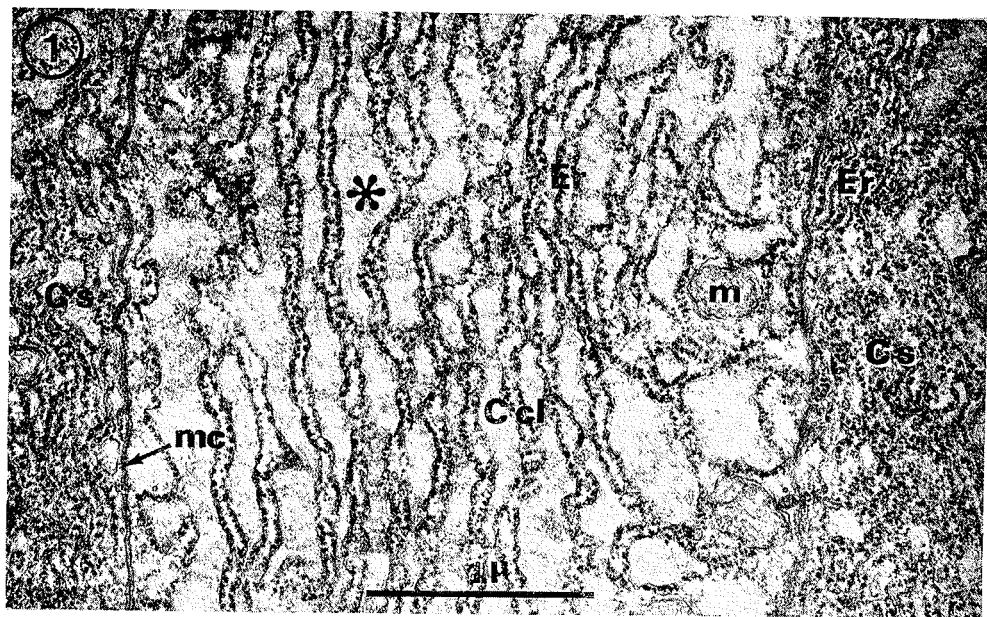
- CAZAL, P. et BOGORAZE, D. (1949) — Les glandes endocrines des Céphalopodes. *Ann. Biol.*, **25**, 225-238.
- CUENOT, L. (1891) — Etudes sur le sang et les glandes lymphatiques dans la série animale. (2) Invertébrés. *Arch. Zool. exp. gén.*, **9**, 13-90, 365-475, 593-670.
- DECLEIR, W., LEMAIRE, J. et RICHARD, A. (1970) — Determination of copper in embryos and very young specimens of *Sepia officinalis*. *Mar. Biol.*, **5**, 256-258.
- DECLEIR, W., LEMAIRE, J. et RICHARD, A. (1971) — The differentiation of blood proteins during ontogeny in *Sepia officinalis* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, **40B**, 923-930.
- DECLEIR, W. et RICHARD, A. (1969) — Blood proteins in *Sepia officinalis*. 6th FEBS Meeting Madrid — Abstract n° 1020. Academic Press London and New York.
- DECLEIR, W. et RICHARD, A. (1970) — A study of the blood proteins in *Sepia officinalis* L. with special reference to embryonic hemocyanin. *Comp. Biochem. Physiol.*, **34**, 203-211.
- DILLY, P. N. et MESSENGER, J. B. (1972) — The branchial gland : a site of haemocyanin synthesis in Octopus. *Z. Zellforsch.*, **132**, 193-201.
- GRIMPE, G. (1913) — Das Blutgefäßsystem der dibranchiaten Cephalopoden. Teil I. *Octopoda. Z. wiss. Zool.*, **104**, 531-621.
- HUTCHINSON, G. E. (1928) — The branchial gland of the Cephalopoda : a possible endocrine organ. *Nature*, **121**, 674-675.
- JOUBIN, L. (1885) — Structure et développement de la branchie de quelques Céphalopodes des côtes de France. *Arch. Zool. exp. gén.*, **3**, 75-150.
- LEMAIRE, J., RICHARD, A. et DECLEIR, W. (1975) — Le foie embryonnaire de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). I. Organogenèse. *Haliotis*, **6**, 287-296.
- LUFT, J. H. (1961) — Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 409-414.
- MITOLO, M. (1938) — Sulla funzione dei corpi branchiali nei Cefalopodi. *Arch. Sci. Biol. Napoli*, **24**, 33-58.
- RICHARD, A. (1966) — La température, facteur externe essentiel de croissance pour le Céphalopode *Sepia officinalis* L. *C.R. Acad. Sc. Paris*, **263**, 1138-1141.
- RICHARD, A. (1968) — Ultrastructure des cellules de la glande branchiale de la seiche (*Sepia officinalis* L.). *J. Microscopie*, **7**, 53a.
- RICHARD, A. (1971) — Contribution à l'étude expérimentale de la croissance et de la maturation sexuelle de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode) — Thèse Univ. Lille I, AO 6479.
- RICHARD, A. (1973) — Biosynthèse et ontogenèse de l'hémocyanine (protéine sanguine) chez la Seiche (Mollusque Céphalopode). *J. Microscopie*, **17**, 92a.
- RICHARD, A. (1975) — L'élevage de la seiche (*Sepia officinalis* L., Mollusque Céphalopode). — 10th. European Symposium on Marine Biology, Ostend, Belgium, sept. 17-23, 1, 359-380.

LÉGENDES DE LA PLANCHE II

Fig. 1. — Cellule « claire » et cellule « sombre » (Gt 30.000). Noter la différence de densité du réticulum endoplasmique qui permet de caractériser les 2 types cellulaires.

Fig. 2. — Détail de la sécrétion golgienne (Gt 30.000).

C.cl. : cellule « claire »; C.s. : cellule « sombre »; Er. : ergastoplasme; G. : golgi; m. : mitochondrie; m.c. : membrane cellulaire; s.g. : sécrétions golgiennes,



- RICHARD, A. et DECLEIR, W. (1969) — Mise en évidence d'une variation des protéines sanguines au cours des premières semaines de vie post-embryonnaire chez *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). *C.R. Acad. Sc. Paris*, **268**, 107-110.
- RICHARD, A. et DECLEIR, W. (1973) — De ontogenie van Hemocyanine bij *Sepia officinalis* L. *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.*, **103**, 400.
- ROCCA, E. (1969) — Copper distribution in *Octopus vulgaris* Lam. Hépatopancréas. *Comp. Biochem. Physiol.*, **28**, 67-82.
- SABATINI, D. D., BENSCH, K. G. et BARNETT, R. J. (1963) — Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell. Biol.*, **17**, 19-58.
- SCHIPP, R., HÜHN, P. et GINKEL, G. (1973) — Elektronenmikroskopische und histochemische Untersuchungen zur Funktion der Branchialdrüse (Parabranchialdrüse) der Cephalopoda. *Z. Zellforsch.*, **139**, 253-269.
- SERENI, E. (1932) — Sulla funzione dei corpi branchiali dei cefalopodi. *Arch. Zool. Ital.*, **16**, 941-947.
- TAKI, I. (1940) — On the branchial gland in Cephalopods. *Zool. Mag. Tokyo*, **52**, 91-92 (En japonais).
- TAKI, I. (1943) — Studies on *Octopus*. 1. The branchial gland. — *Journ. Sci. Hiroshima Univ. Zoology*, **10**, 131-151 (En Japonais).
- TAKI, I. (1964) — On the morphology and physiology of the branchial gland in Cephalopoda. *J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ.*, **5**, 345-417.
- TURCHINI, J. (1923) — Caractères histologiques endocrines des glandes hypobranchiales des Céphalopodes dibranchiaux. *C.R. Assoc. Anat. Paris.*, **18**, 477-478.
- WAEHNELD, T. et SHOOTER, E. (1973) — A comparison of the protein composition of the brains of four rodents. *Brain Research*, **57**, 361-371.
- YUNG KO CHING, M. (1930) — Contribution à l'étude cytologique de l'ovogenèse, du développement et de quelques organes chez les Céphalopodes. *Ann. Inst. Ocean.*, **7**, 301-364.