

LA GLANDE DIGESTIVE DES CÉPHALOPODES, ORGANE DE SYNTHÈSE ET DE SÉCRÉTION D'ENZYMES DIGESTIVES.

par

Renata Boucher-Rodoni

Station biologique, 29211 Roscoff

Résumé

L'étude de la glande digestive de *Sepia officinalis* et de *Eledone cirrosa* a permis de mettre en évidence un activité protéolytique partiellement thiol-dépendante, qui est le fait de fractions protéiniques de poids moléculaire moyen et de forte mobilité électrophorétique. L'activité protéolytique totale varie au cours d'un cycle digestif. Elle diminue après le début de la digestion, indiquant la fin de la période de sécrétion des enzymes qui participent à la digestion extracellulaire. En fin de digestion, des protéines de même poids moléculaire et de même mobilité électrophorétique que les protéases identifiées dans la glande digestive s'accumulent dans les cellules. Leur activité ne devient cependant particulièrement importante que pendant les phases de sécrétion.

Introduction

De nombreux auteurs ont étudié l'activité enzymatique dans le tractus digestif des Céphalopodes. Bidder (1966) résume la plupart de ces travaux. Des activités protéasiques, amylasiques et lipasiques ont été observées chez de nombreuses espèces. Bidder (1966) souligne le rôle prépondérant de la glande digestive (1) dans la synthèse des enzymes digestives, ne fût-ce que du fait de sa masse. En effet, Takahashi (1960), trouve une activité protéasique plus importante dans des extraits de caecum et d'intestin que dans des extraits de glande digestive. Cependant, cet auteur estime que, du fait de son apport quantitatif massif, la glande digestive est néanmoins responsable de 89 p. 100 de l'activité protéolytique totale.

Plus récemment, deux auteurs ont particulièrement participé à l'étude des enzymes du tube digestif des Céphalopodes : Boucaud-Camou (1969, 1974) et Morishita (1972 a, b, c ; 1974 a, b, c, d ; 1978).

Morishita (1972 a) a recherché la distribution des enzymes protéolytiques, par action hydrolytique sur la caséine, dans divers organes d'*Octopus* et testé leur activité à différents pH et à différentes températures. La plus forte activité a été enregistrée dans les

(1) Pour la nomenclature des organes digestifs, voir Bidder (1976).

glandes salivaires postérieures, au pH alcalin proche de 8,5. La glande digestive présente la plus forte activité enregistrée entre pH 2,0-3,0 et 5,5-6,0. Les organes digestifs tels que le jabot, l'estomac, le caecum et l'intestin ne possèdent que de faibles activités, surtout à pH alcalin. Pour la glande digestive, cet auteur indique une température optimale de 35°-40° à pH 2,5 et de 45°C à pH 5,5-6,0. Morishita (1972 b) étudie ensuite quelques propriétés des enzymes protéolytiques de la glande digestive *d'Octopus*, notamment leur stabilité à différentes températures et l'effet d'ions métalliques, de cystéine et d'acide ascorbique. Il conclut à la présence d'au moins deux enzymes protéolytiques distinctes consistant essentiellement en enzymes de type cathepsine.

Dans le suc digestif, Morishita (1974 d) trouve quatre enzymes protéolytiques, trois protéines basiques présentant beaucoup de similitude avec la carboxypeptidase A cationique (CPA), dont une proche de la CPA des glandes salivaires postérieures, et une enzyme de type chymotrypsine A, proche de trois des chymotrypsines des glandes salivaires postérieures dans ses activités mais en différant par ses propriétés physicochimiques telles que point isoélectrique et poids moléculaire. Cet auteur considère que les glandes salivaires postérieures contribuent largement à la digestion.

Boucaud-Camou (1969) a recherché la localisation d'activités amylasiques et protéasiques dans l'appareil digestif de *Sepia officinalis* au moyen de techniques d'empreintes. Elle conclut que la glande digestive apparaît comme l'organe le plus actif, aussi bien à l'égard des protéines que des polyosides, suivie, à un moindre degré, par les cellules du caecum et de l'intestin, alors que celles des appendices des canaux digestifs ne semblent pas actives. Dans une étude ultérieure, Boucaud-Camou (1974), appliquant des techniques histochimiques et biochimiques, constate une fois de plus la prédominance de la glande digestive comme source d'enzymes digestives, par des enzymes de type cathepsine et chymotrypsine, dont les boules seraient le principal support, pour l'activité protéolytique. La glande digestive sécrète aussi des amylases, des lipases et d'autres enzymes lytiques (estérases, phosphatases acides et alcalines). Cet auteur conclut également que l'équipement enzymatique des cellules de la glande digestive et de l'épithélium interne des appendices des canaux digestifs confirme la fonction d'absorption digestive de ces deux organes. Boucaud-Camou (1969) situe le début de la digestion dès le bulbe buccal, grâce à des enzymes d'origine salivaire.

Les deux auteurs sont donc en accord en ce qui concerne le rôle précoce et important des glandes salivaires dans la digestion, aussi bien chez *Octopus* que chez *Sepia*. La glande digestive prend également, dans les phénomènes digestifs, une part enzymatique importante, mais qui semble plus marquée chez *Sepia* que chez *Octopus*.

Des activités amylasique, lipasique et protéasique existent donc dans l'extrait de glande digestive. Pour une étude plus détaillée, notamment au cours de la digestion, l'activité protéasique nous a paru mériter une attention particulière, pour plusieurs raisons. D'une part, les Céphalopodes sont des animaux carnivores et, d'autre part, l'activité protéasique se révèle importante dans la glande digestive (89 p. 100 de l'activité protéasique totale selon Takahashi, 1960). Enfin, l'étude de cette activité permet une mesure en parallèle histo-

logique et biochimique, les « boules », inclusions abondantes et aisées à dénombrer dans les cellules de la glande digestive, étant le principal support des enzymes protéolytiques (Boucaud-Camou, 1974).

Matériel et méthodes

Deux espèces sont concernées par ce travail, *Sepia officinalis* et *Eledone cirrosa*. Le Sépioidé a été particulièrement étudié ici. Cependant, une grande partie des expériences ont été étendues à l'Octopode, afin de donner aux résultats une portée plus générale.

Des animaux fraîchement chalutés sont maintenus en aquarium à système de circulation ouverte d'eau de mer. Après un jeûne de deux jours, une partie des animaux sont sacrifiés (témoins) et les autres nourris pendant quelques jours afin de les acclimater avant la réalisation des expériences de digestion. Celles-ci consistent à sacrifier les animaux à différents temps après la prise de nourriture et à prélever rapidement la glande digestive pour des extractions et mesures immédiates et pour une congélation en vue de traitements ultérieurs. Un contrôle histologique est réalisé pour chaque individu par fixation (Bouin aqueux) d'un fragment de glande digestive qui sera ensuite inclus dans la paraffine, coupé à 4-5 µm et les coupes colorées à l'Azan.

La teneur totale en protéines des différents extraits a été déterminée par la méthode de Lowry *et al.* (1951), parallèlement aux mesures d'activité enzymatiques et aux études électrophorétiques.

Mesure des activités enzymatiques

a - Microméthode ApiZym

Il s'agit d'une méthode semi-quantitative permettant de détecter les activités enzymatiques d'un extrait complexe non purifié. Ce système se compose d'une galerie de 20 microcuvettes en PVC dont le fond est constitué d'un support en viscose, contenant le substrat enzymatique à base de naphtol, avec son tampon.

Des fragments frais de glande digestive des deux espèces sont broyés dans l'eau distillée. Après une centrifugation rapide (3-4 minutes à 3.000 rpm), à 4 °C, deux gouttes de surnageant sont déposées dans chaque microcuvette. Le dérivé naphtholique libéré au cours de l'incubation (4 heures à 37 °C) est ensuite révélé avec un sel de diazonium provoquant une coloration plus ou moins intense en fonction de l'activité enzymatique.

b - Activités amylasique et lipasique

L'existence de ces activités a été vérifiée rapidement à l'aide de kits prêts à l'emploi : Merckotest α -Amylase et Merckognost lipase.

c - Activité protéasique

— Utilisation d'un substrat spécifique.

L'activité protéolytique de la glande digestive a été étudiée essentiellement à l'aide d'un substrat spécifique, le « Hide Powder Azure » (Calbiochem; Rinderknecht *et al.*, 1968). Ce substrat, totalement insoluble, se compose de poudre de collagène reliée à du bleu brillant remazol par des liaisons covalentes. Ce substrat est d'une sensibilité remarquable, l'hydrolyse d'une molécule de collagène libérant de nombreuses molécules colorées.

Un ou deux grammes de glande digestive fraîche sont broyés et homogénéisés avec 10 ou 20 ml de tampon. Différents tampons ont été testés (voir Résultats). Après centrifugation pendant 1 heure à 20.000 g dans une centrifugeuse réfrigérée (4 °C), le surnageant est recueilli à l'aide d'une seringue de 10 ml (extrémité de l'aiguille maintenue sous la couche de lipides accumulés en surface), dilué deux fois, puis filtré sur filtre millipore (0,30µm) à l'aide d'un système swinnex. Toutes ces opérations sont réalisées à 4 °C. L'équivalent de 50 mg de tissu frais/ml est ensuite mis à incuber pendant une heure à 37 °C en présence du substrat Hide Powder Azure (10 mg HPA/5 ml d'extrait). Un tube ne contenant pas de substrat servira de blanc. La réaction est stoppée en plongeant les tubes dans de la glace fondante une fois le temps écoulé. Dix mg de H.P.A. sont alors ajoutés au blanc. Le contenu de tous les tubes est filtré (filtre plissé) et leur D.O. est lue au spectrophotomètre, à une longueur d'onde de 595 nm. L'activité mesurée avec le H.P.A. en fonction de la quantité d'extrait présente a préalablement été testée, par hydrolyse complète du substrat par un excès de pronase.

— Etude électrophorétique et localisation de l'activité protéolytique sur gel de polyacrylamide.

Une étude électrophorétique de la glande digestive a eu pour but, d'une part de localiser l'activité protéolytique sur gel de polyacrylamide et, d'autre part, de suivre l'évolution des protéines au cours de la digestion. Des électrophorèses sur gel vertical, à 7 p. 100 d'acrylamide, ont été réalisées dans ce but (Ornstein, 1964; Davis, 1964). Le tampon de migration est du tampon Tris-Glycine, pH 7.9. Les protéines séparées par la migration électrophorétique (4 mAmp par tube), sont fixées et mises en évidence par immersion des gels dans une solution de bleu de Coomassie G 250 dans l'acide perchlorique (Reisner *et al.*, 1975). Chaque tube a été analysé avec le lecteur de gels Vernon (PHI 3), muni d'un intégrateur permettant d'estimer le pourcentage que représente la concentration de chaque bande protéinique.

Le poids moléculaire approximatif des principales composantes protéiques de la glande digestive a été déterminé par électrophorèse sur plaques à gradient de polyacrylamide (P.A.A. 4/30, Pharmacia). Le tampon est le même que celui utilisé pour les migrations en tube (Tris-Glycine). Les plaques sont fixées et colorées également avec la solution de Bleu de Coomassie G 250. La distance de migration de chaque protéine est mesurée et son poids moléculaire estimé à partir de la droite de référence (chaque lot de plaques est étalonné par le fabricant qui fournit la distance de migration d'un certain nombre de protéines témoin).

Les protéines présentant une activité protéolytique ont été localisées sur gel de polyacrylamide par incorporation de gélatine à 0,1 p. 100 dans le gel de migration (Stegeman, 1968; Ebeling *et al.*, 1974). Chaque électrophorèse réalisée à 4 °C, destinée à rechercher la localisation des protéases sur gel de polyacrylamide, comportait en parallèle deux tubes contenant de la gélatine et un à deux tubes sans gélatine. Après migration, les gels contenant de la gélatine sont incubés dans du tampon phosphate 67 mM, pH 8, pendant une heure à 35 °C, puis fixés, colorés et analysés comme ci-dessus.

Le poids moléculaire des protéases a été estimé par électrophorèse bidimensionnelle chez les deux espèces. Le principe de cette technique consiste en une migration d'abord verticale de l'extrait (lube de 2,7 mm de diamètre intérieur). Le gel ainsi obtenu et qui contient donc les protéines séparées en fonction de leur poids moléculaire et de leur point isoélectrique, est déposé ensuite au sommet d'une plaque à gradient de polyacrylamide (PAA 4/30). Au cours de cette deuxième migration, les protéines se répartissent en fonction de leur poids moléculaire seul. Des migrations témoin sont évidemment menées en parallèle avec des tubes de diamètre standard (avec et sans gélatine) et avec des tubes fins. Une fois l'activité protéolytique localisée sur gel vertical grâce à la digestion de gélatine, le poids moléculaire des protéases est déterminé grâce à leur distance de migration dans le gradient de polyacrylamide.

— Gel filtration.

Le poids moléculaire des protéases de la glande digestive de *Sepia* a été également déterminé par Chromatographie sur colonne de Sephadex G 100 (colonne K 16 x 100, Pharmacia). L'animal utilisé pour cette expérience était un mâle, fraîchement capturé. A la dissection, son estomac s'est révélé plein, il s'agit donc d'un animal en train de digérer un repas mais l'heure de digestion est inconnue. Dix grammes de glande digestive ont été homogénéisés dans du tampon phosphate (60 ml), puis centrifugés et un aliquot (50 ml) récupéré pour une ultrafiltration (filtre Amicon, membrane UM2), qui a ramené le volume à environ 5 ml.

Après passage sur la colonne, la D.O. des fractions se révélant intéressantes selon le profil d'élution a été lue (595 nm) pour servir de blanc, puis chaque fraction a été testée par le substrat Hide Powder Azure. Le poids moléculaire des fractions actives est déduit par comparaison avec une courbe de calibrage de la colonne utilisée par passage de Bleu Dextran et de protéines de poids moléculaire connu.

L'extrait concentré et le filtrat ont également été testés pour s'assurer qu'il n'y a pas eu de pertes importantes lors de l'ultrafiltration. Ce contrôle s'est révélé satisfaisant, puisque plus de 90 p. 100 de l'activité totale sont conservés.

RÉSULTATS

Des résultats préliminaires indicatifs concernant les enzymes de la glande digestive ont été obtenus par la micro-méthode ApiZym. Pratiquement, toutes les enzymes impliquées dans le métabolisme des sucres testées répondent positivement. En ce qui concerne les lipides, la lipase (C 14) ne réagit pas. Les endopeptidases fournissent des réactions généralement négatives, sauf une légère réaction positive de la chymotrypsine chez *Eledone*. Par contre, les exopeptidases réagissent positivement, surtout la leucine acrylamidase. La réponse négative de la trypsine et souvent aussi de la chymotrypsine est peut-être due à un substrat non adéquat. S'agissant d'extraits de tissu d'invertébré, on peut dire d'une façon générale qu'une réponse positive obtenue avec ce test amène à conclure à la présence possible de l'enzyme recherchée ; une réponse négative ne permet aucune conclusion.

Chez *Eledone* et chez *Sepia*, les activités amylasiques et lipasiques ont été confirmées par une série de microdosages réalisés à l'aide des réactifs pour analyses médicales Merckotest-Amylase et Merckognost-Lipase. L'activité protéasique a été mise en évidence essentiellement à l'aide du substrat spécifique, Hide Powder Azure.

I. Les protéases de la glande digestive

Avant de suivre l'évolution de l'activité protéolytique dans la glande digestive au cours d'un cycle digestif, il est apparu nécessaire d'étudier plus en détail les protéases en présence et la nature de leur activité. Cela a été réalisé d'abord chez *Sepia* par gel filtration et

par l'utilisation d'inhibiteurs, puis chez *Sepia* et *Eledone* par des études électrophorétiques permettant de localiser cette activité sur gel et sur plaque.

1) Nature de l'activité protéolytique de la glande digestive de *Sepia officinalis* et poids moléculaire des protéases.

— *Activité protéolytique.*

Dans un premier temps, différents tampons d'extraction ont été testés :

- * tampon Tris 50mM avec KCl 0,5M; pH 8;
- * idem plus EDTA 10mM;
- * idem plus CaCl₂ 10mM;
- * idem plus EDTA 10mM et L-cystéine 10mM;
- * tampon phosphate 10mM, pH 7,2 avec KCl 0,15M, EDTA 1mM et L-cystéine 1mM;
- * idem plus tampon véronal-acétate-HCl 0,1M, pH 5,4 (v/v; pH final 6,5).

L'équivalent de 10mg de tissu frais (0,2ml d'extrait) est testé avec chaque tampon par le Hide Powder Azure. Les résultats figurent dans le tableau 1, où sont également indiquées les valeurs très élevées obtenues après incubation de 5ml du même extrait (250mg de tissu frais). La D.O. des extraits avant incubation (D.O.«) est retranchée des valeurs obtenues après incubation avec le substrat (D.O.+H.P.A.).

TABLEAU 1

Activité protéolytique de la glande digestive de *Sepia officinalis*, avec différents tampons d'extraction.

TAMPON	Échantillon ml	Tampon ml	(D.O.+HPA)-DO _o
Phosphate	0,2	4,8	0,460
EDTA Cystéine	5,0	0	trop conc.
Veronal-Acétate-HCL			
Phosphate	0,2	4,8	0,701
EDTA Cystéine	5,0	0	1,245
Tris	0,2	4,8	0,286
	5,0	0	1,113
Tris	0,2	4,8	0,062
EDTA	5,0	0	0,792
Tris	0,2	4,8	0,485
Calcium	5,0	0	0,982
Tris			
EDTA	0,2	4,8	0,486
Cystéine	5,0	0	0,864

Le maximum d'activité a été enregistré avec le tampon phosphate, en présence d'EDTA et de L-cystéine. Les études ultérieures ont toutes été réalisées avec ce tampon. Les résultats avec du tampon Tris montrent que, en présence d'EDTA seul, on note une baisse notable de l'activité. La cystéine est donc indispensable, ce qui laisse supposer la présence d'une protéase-SH. De bons résultats sont également obtenus par adjonction de calcium, ce qui fait penser à la présence d'une sérine-protéase.

Afin de vérifier ces résultats indicatifs, un extrait de glande digestive a été testé en présence d'inhibiteurs des protéases-SH et des sérine-protéases. Les inhibiteurs choisis étaient le PHMB (p-Hydroxy-mercuri-benzoate, Sigma) et le PMSF phénylméthyl-fluoride, Calbiochem). Le PHMB indique les activités de protéases possédant un groupe sulphydryl dans le site actif, le PMSF inhibe les activités dues à la présence de protéases présentant un résidu sérine dans leur site actif (Gold, 1965). Il apparaît nettement que l'activité est en grande partie due à une protéase-SH (tableau 2).

TABLEAU 2

Activité protéolytique en présence d'inhibiteurs des thiolprotéases (PHMB) et des sérine-protéases (PMSF).

	D.O. (Tampon phosphate)
Témoin	0,500
PHMB 1,5 mM	0,020
PMSF 40 mM	0,155

— *Gel filtration.*

La figure 1 indique le profil d'activité protéasique obtenu après gel filtration d'extrait de glande digestive de *Sepia*. Les plus fortes activités se situent dans les fractions à poids moléculaire moyen (29 à 42 000 daltons). L'épaulement situé dans la zone des forts poids moléculaires (entre 62 et 92 000 daltons) ne peut être attribué avec certitude à une activité différente de celle des protéases de poids moléculaire moyen. Un pic est également localisé dans les fractions à faible poids moléculaire (P.M. inférieur à 10 000 daltons). L'activité mesurée dans le tube 44 est provoquée par une contamination.

2) Étude électrophorétique de la glande digestive de *Sepia* et d'*Eledone*.

a - *Les fractions protéiniques séparées sur gel de polyacrylamide et leur poids moléculaire.*

Chez les deux espèces, des migrations électrophorétiques sur gel de polyacrylamide (tubes) ont été réalisées avec des extraits frais de glande digestive et avec des extraits de matériel ayant été d'abord congelé puis lyophilisé. Les fractions protéiniques (protéines solubles) séparées par électrophorèse sont caractérisées par leur migration relative (Rf), leur concentration et leur poids moléculaire. Pour faciliter l'interprétation des images obtenues après migration électrophorétique,

que, les gels ont été subdivisés en trois zones, séparées par des bandes dont la présence est constante et le Rf relativement fixe : les bandes α (parfois double), β et γ (Fig. 5 et 6). Elles délimitent les zones des protéines à faible mobilité électrophorétique (α — α), à mobilité moyenne (α — β), et à forte mobilité (β — γ). Les Rt des bandes α , β et γ ont été déterminés à partir d'extrait de tissu frais et des Rf moyens ont été calculés (tableau 3). La bande γ a toujours un Rf égal à 1.

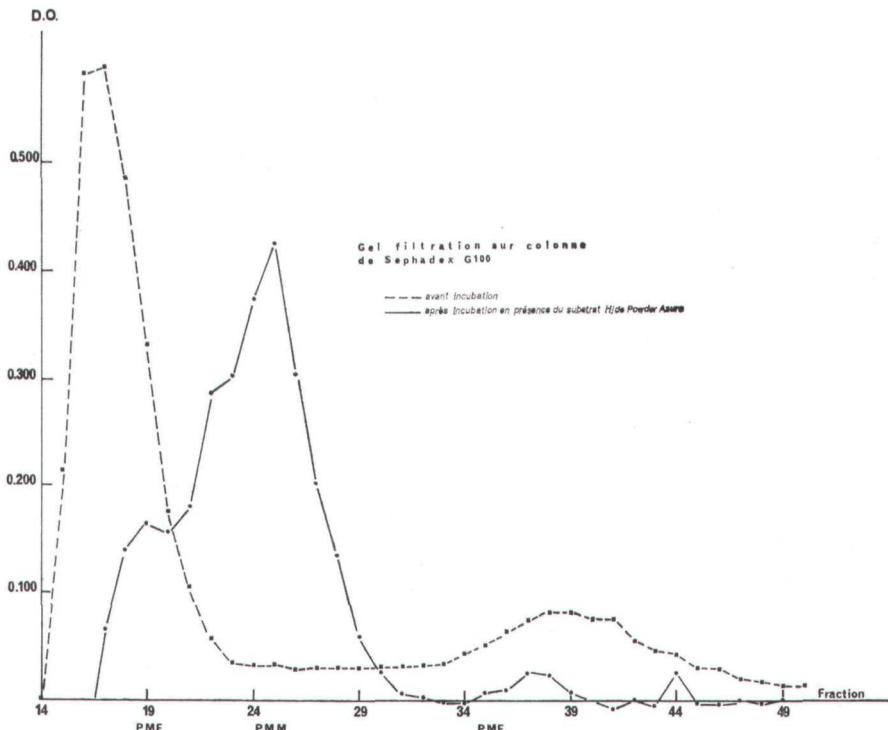


FIG. 1

Densité optique des différentes fractions obtenues par gel filtration sur colonne de Sephadex G100, avant incubation (trait en pointillé), et après incubation en présence du substrat H.P.A. (trait plein). Deux ou trois régions d'activités sont à noter : la première se traduit par un épaulement dans les fractions à P.M. élevé (PME), la deuxième, la plus intense, comprend des fractions de P.M. moyen (PMM) et la troisième concerne des fractions de faible P.M. (PMF).

La concentration en protéines solubles des trois zones délimitées s'exprime en pourcentage de la concentration totale en protéines (tableau 4).

L'analyse électrophorétique de plusieurs extraits frais de glande digestive des deux espèces montre une certaine variabilité des fractions protéiniques présentes chez les témoins à jeun. Le nombre de bandes identifiables est généralement de 15 ou 16 pour *Sepia*, et de 13 ou 14 pour *Eledone*. Cependant, certaines bandes présentes chez un individu peuvent être absentes chez un autre. La concentration relative de chaque bande peut également varier d'un individu à un autre. Les résultats d'électrophorèses d'échantillons lyophilisés de

TABLEAU 3

Rf des bandes α , β et γ , mesurés après électrophorèse de matériel frais, chez les deux espèces.

a. *Sepia officinalis*

Ech Rf \	S124	S141	S136	S125	S140	S137	S138	S142	S126	S132	S129	S127	S128	Rf moyen
α	0.27	0.28	0.25	0.20	0.30	0.27	0.20	0.25	0.24	0.22	0.20	0.21	0.26	0.24
	0.28	0.29	0.26	0.22	0.32	0.28	0.22	0.26	0.27		0.22	0.23	0.28	0.26
β	0.59	0.63	0.67	0.63	0.67	0.71	0.59	0.62	0.63	0.62	0.62	0.64	0.66	0.63
γ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

b. *Eledone cirrosa*

Ech Rf \	Ec F30	Ec 169	Ec 170	Ec F3	Ec F2	Ec F	Ec F1	Rf moyen
α	0.28	0.24	0.34	0.24	0.24 0.26	0.29	0.24	0.27
β	0.58	0.56	0.57	0.60	0.57	0.58	0.57	0.58
γ	1	1	1	1	1	1	1	1

TABLEAU 4

Sommes des concentrations relatives (pourcentage de la concentration totale) des différentes zones définies après migration électrophorétique de matériel frais (valeurs déterminées à partir des intégrations du lecteur de gel), chez les deux espèces.

a. *Sepia officinalis*

Ech Somme concen. relatives \	S124	S141	S136	S125	S140	S137	S138	S142	S126	S132	S129	S127	S128
Zone O— α	16.7	21.0	15.7	17.5	14.4	25.1	14.9	14.5	18.6	13.4	14.7	11.5	7.3
Zone α — β	54.3	64.2	65.3	62.2	59.0	56.6	58.5	60.5	53.4	67.4	61.7	57.4	58.6
Zone β — γ	29.0	14.4	16.1	20.4	21.7	18.4	26.6	23.1	28.0	19.3	24.3	29.1	34.2

h. *Eledone cirrosa*

Ech. Somme concen. relatives \	EcF30	Ec169	Ec170	Ec F3	Ec F2	Ec F4	Ec F1
Zone O α	29.1	29.9	16.8	5.1	11.3	27.5	11.3
Zone α β	51.9	36.9	43.0	38.2	36.7	37.4	38.6
Zone β γ	18.9	33.2	40.1	56.8	52.1	35.2	49.9

glande digestive confirment ceux obtenus avec le matériel frais, le nombre de bandes étant cependant parfois inférieur.

Le poids moléculaire des principales fractions a été déterminé par passage d'extrait lyophilisé sur des plaques à gradient de polyacrylamide (gradient 4/30, Pharmacia) chez les deux espèces. Chez *Sepia officinalis*, l'individu dont l'exemple est illustré dans la figure 2 présente dans ces conditions 14 bandes dont les poids moléculaires

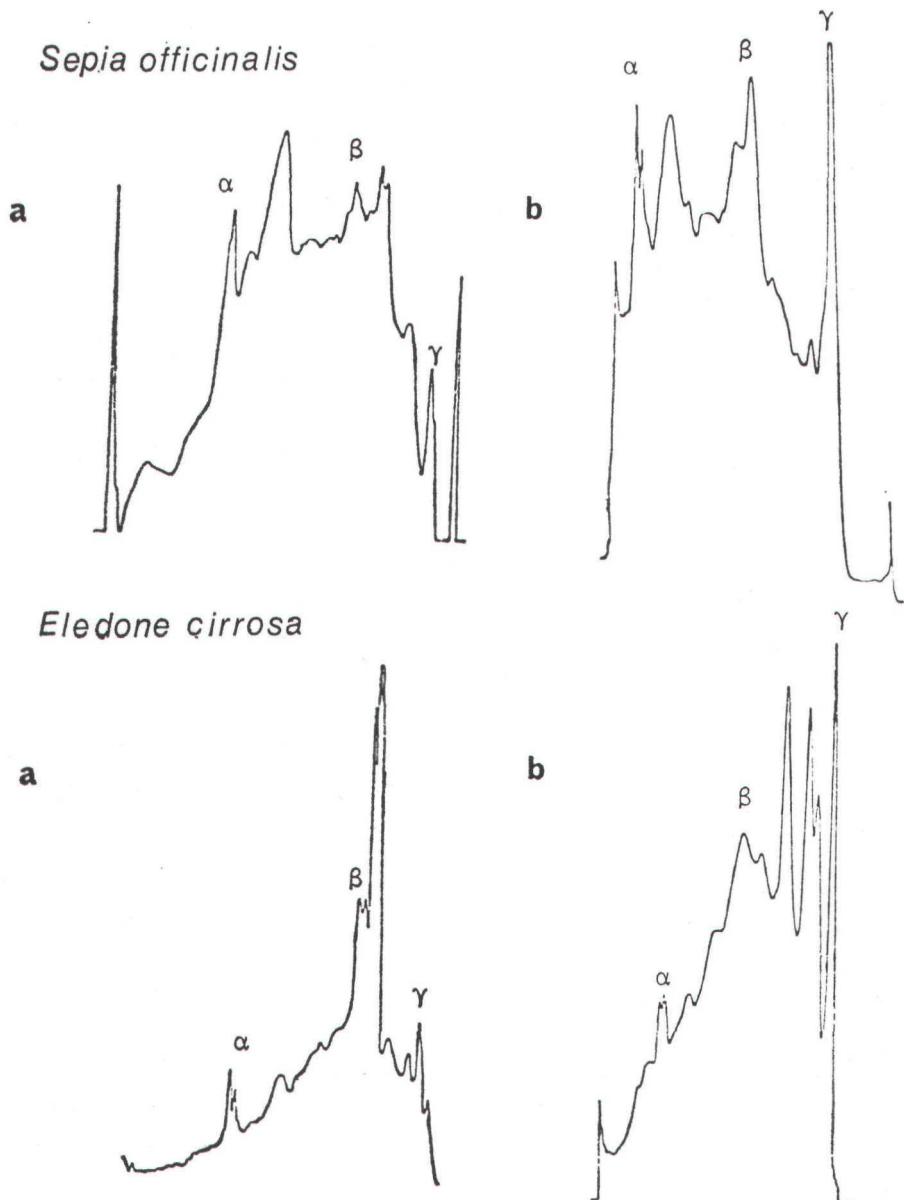


FIG. 2

Illustration de migrations en parallèle sur plaque à gradient de polyacrylamide 4/30 (a), et sur tube (b), chez les deux espèces.

s'étendent entre $0,041$ et $1,53 \times 10^6$. Les concentrations relatives et l'aspect des pics d'absorption permettent d'identifier certaines bandes, par exemple la double bande α , dont le poids moléculaire est de $0,59 \times 10^6$, le bande β , de poids moléculaire égal à $0,115 \times 10^6$ et la bande γ de poids moléculaire égal à $0,041 \times 10^6$ chez *Sepia*.

Chez *Eledone cirrosa*, l'individu dont l'exemple est également illustré dans la figure 2, présente 13 bandes dont les poids moléculaires vont de $0,038 \times 10^6$ à $2,1 \times 10^6$. Les bandes α , β et γ , identifiées ont des poids moléculaires respectivement de $0,43 \times 10^6$, $0,088 \times 10^6$ et $0,038 \times 10^6$, donc un poids moléculaire légèrement inférieur à *Sepia* en ce qui concerne les bandes α , β et γ .

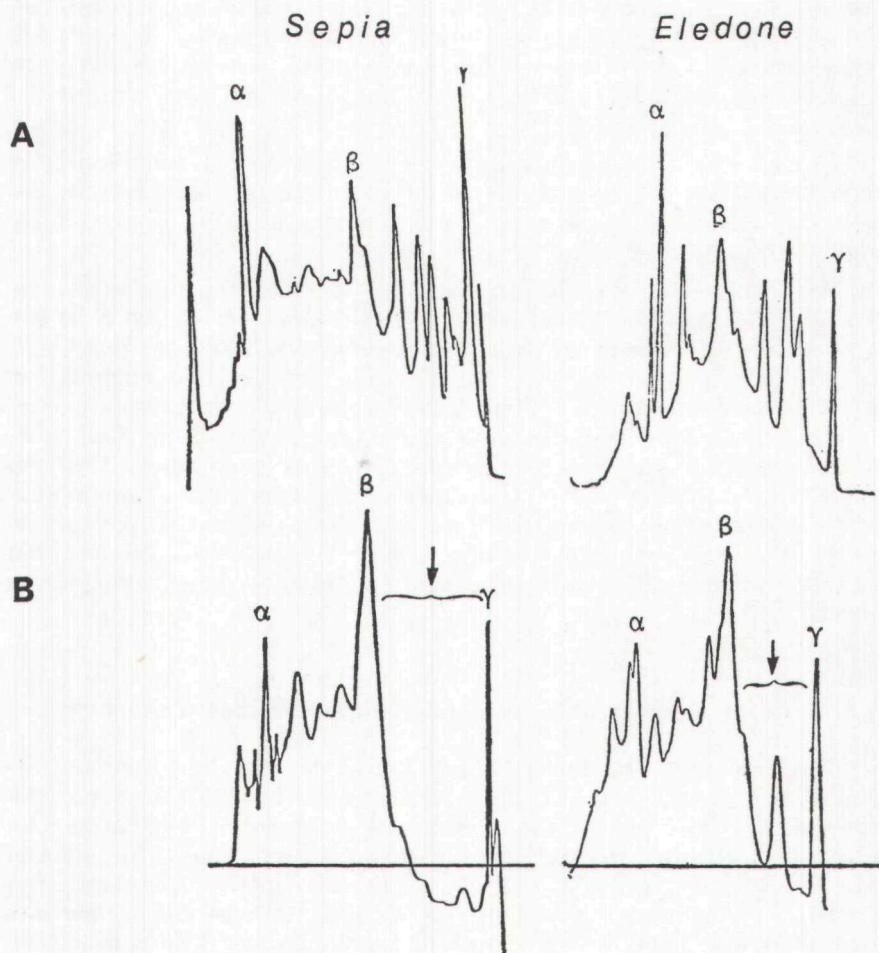


FIG. 3

Illustration, grâce à deux exemples, des résultats obtenus par électrophorèse d'extract brut de la glande digestive de *Sepia officinalis* et de *Eledone cirrosa*, en absence (A) et en présence (B) de gélatine incorporée dans le gel. Après migration électrophorétique, incubation et coloration, une région plus claire que la coloration du fond apparaît dans le gel comprenant la gélatine, dans la zone $\beta-\gamma$ (flèches), correspondant à une activité protéolytique dans cette région.

b - Localisation de l'activité protéolytique sur gel de polycrylamide.

Afin de vérifier quelles fractions protéiniques isolées par électrophorèse correspondent à des enzymes protéolytiques, des migrations en présence de gélatine (à 0,1 p. 100 dans le gel) ont été réalisées, avec du matériel frais. Un exemple du type de résultat obtenu est illustré par la figure 3, où apparaissent en parallèle les enregistrements de gels témoins et de gels contenant de la gélatine, chez les deux espèces.

L'introduction de gélatine dans la composition du gel provoque une coloration intense du fond, sauf dans les régions où les enzymes protéolytiques ont agi (Fig. 3 B). La concordance entre gels témoins et gels contenant de la gélatine est perturbée du fait que ces derniers sont incubés pendant une heure à 35°C avant fixation et coloration des protéines, ce qui provoque une certaine diffusion des bandes. Théoriquement, après incubation et coloration, les zones enzymatiquement actives doivent apparaître comme des régions claires sur fond coloré (Planche I, A).

Les résultats obtenus montrent nettement que la zone comprise entre les bandes β et γ a l'activité enzymatique la plus forte, autrement dit, que certaines des protéines à forte mobilité électrophorétique présentent une activité protéolytique.

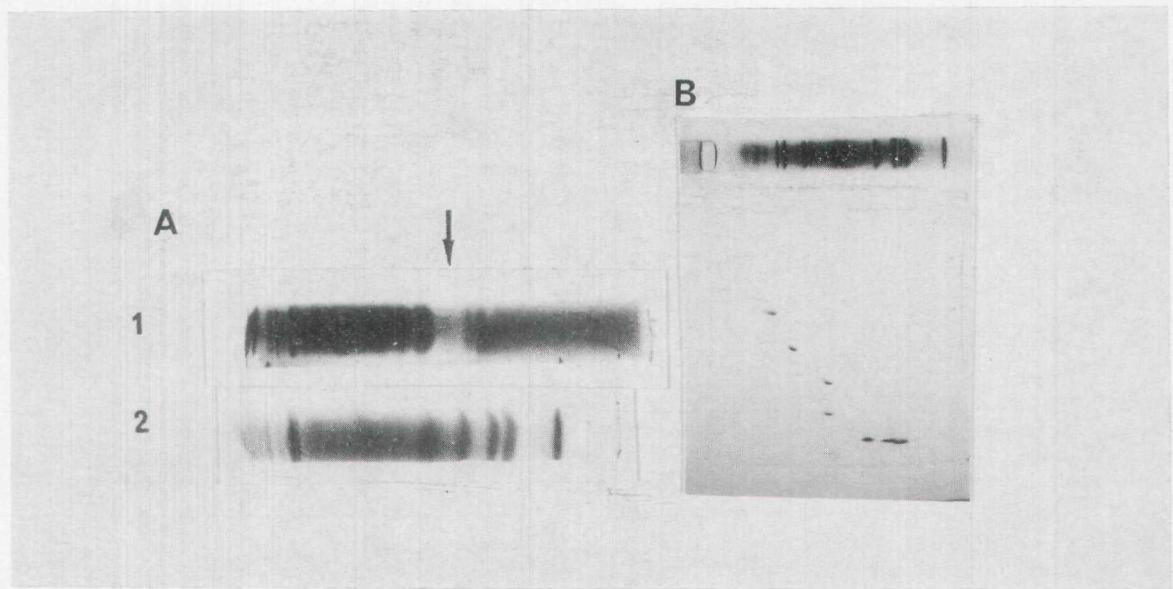
Des électrophorèses bidimensionnelles ont montré des poids moléculaires de 37 500 à 48 000 daltons chez *Eledone* et 41 000 à 53 000 daltons chez *Sepia* pour les protéines paraissant concernées par l'activité protéolytique (Planche I, RB). Comme lors de la détermination du poids moléculaire des protéines correspondant aux bandes α , β et γ , il faut noter que le poids moléculaire des protéines de *Sepia* est, en moyenne, un peu plus élevé que celui des protéases d'*Eledone*. Les résultats obtenus par électrophorèse bidimensionnelle amènent à définir des poids moléculaires un peu plus élevés que ceux déterminés par gel filtration chez *Sepia* bien que, dans les deux cas, le maximum d'activité protéolytique concerne des fractions à poids moléculaire moyen.

II. Synthèse et sécrétion d'enzymes protéolytiques au cours de la digestion.

Pour un individu donné, à une heure de digestion donnée, différents paramètres ont été suivis. D'abord, la concentration en protéines et l'activité protéolytique d'extrait de glande digestive sur un substrat spécifique (H.P.A.) ont été mises en relation entre elles et avec l'évolution histologique de l'organe. Ce contrôle histologique a consisté à déterminer l'abondance en inclusions (« boules ») connues pour présenter une activité protéolytique (Boucaud-Camou, 1974). L'évolution de la glande digestive a été ensuite appréhendée par les techniques électrophorétiques.

1) Activité protéolytique totale au cours de la digestion.

Chez *Sepia officinalis*, la glande digestive montre, surtout au début de la digestion, une activité protéolytique importante qui,



R. BOUCHER-RODONI

PLANCHE I

A : illustration des résultats d'électrophorèse en présence (1) et en l'absence (2) de gélatine incorporée dans le gel (*Sepia*).
B: illustration des résultats obtenus par électrophorèse bidimensionnelle (*Eledone*).

à la température expérimentale de 14°C, tend à se stabiliser après la sixième heure. Ces résultats ont été obtenus avec des animaux de petite taille (Fig. 4).

L'image graphique de la cinétique de l'activité protéolytique comparée à la cinétique de la concentration en protéines de la glande digestive pour ces mêmes animaux (Fig. 4) semble montrer une évolution antagoniste de ces deux paramètres. Le coefficient de corrélation de rang de Spearman calculé entre ces deux variables indique une valeur négative, donc inverse, et significative à P inférieur à 0,02 ($r^s = -0,62$ et $z = -2,61$ pour $n = 19$).

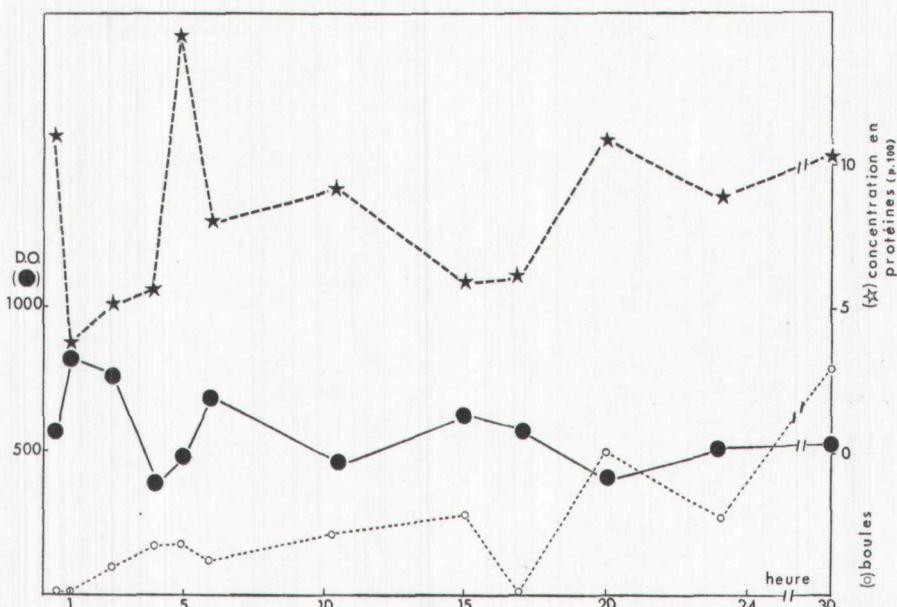


FIG. 4

Variations de l'activité protéolytique (D.O., trait plein), de la teneur en protéines (trait discontinu long) et du nombre de « boulés » par unité de surface (trait en pointillé) au cours d'un cycle digestif, chez *Sepia officinalis*.

Chez *Eledone cirrosa*, trois séries d'expériences ont été réalisées concernant l'étude de l'activité protéolytique de la glande digestive au cours d'un cycle digestif, en avril (lot 477), mai (lot 577) et septembre (lot 977). La température influence les résultats obtenus et, particulièrement, les temps longs. Cela empêche un mixage des résultats des trois lots différents. Il était déjà établi par ailleurs qu'une température plus basse favorise une longueur plus importante du cycle digestif et une rythmicité plus marquée (Boucher-Rodoni, 1975). Chez cette espèce, la représentation graphique est peu parlante. Cependant, le premier lot (477) apporte suffisamment d'information pour permettre de traiter statistiquement la relation entre concentration en protéines et activité protéolytique. Le calcul du coefficient de corrélation de rang de Spearman montre que, comme chez *Sepia*, l'évolution de la teneur en protéines est inverse de celle de l'activité protéolytique.

Il est donc possible de conclure qu'une période de synthèse de protéines correspond généralement à une faible activité protéolytique et vice-versa, c'est-à-dire que l'activation des enzymes survient en fin de phase de synthèse des protéines et accompagne la sécrétion.

2) Évolution électrophorétique de la glande digestive au cours de la digestion.

Les images électrophorétiques obtenues avec du matériel frais montrent des variations considérables de la composition en protéines de la glande digestive au cours du cycle digestif. Les différentes concentrations relatives dans chaque zone sont résumées dans le tableau 4.

La figure 5 où les bandes α , β et γ sont indiquées, met en évi-

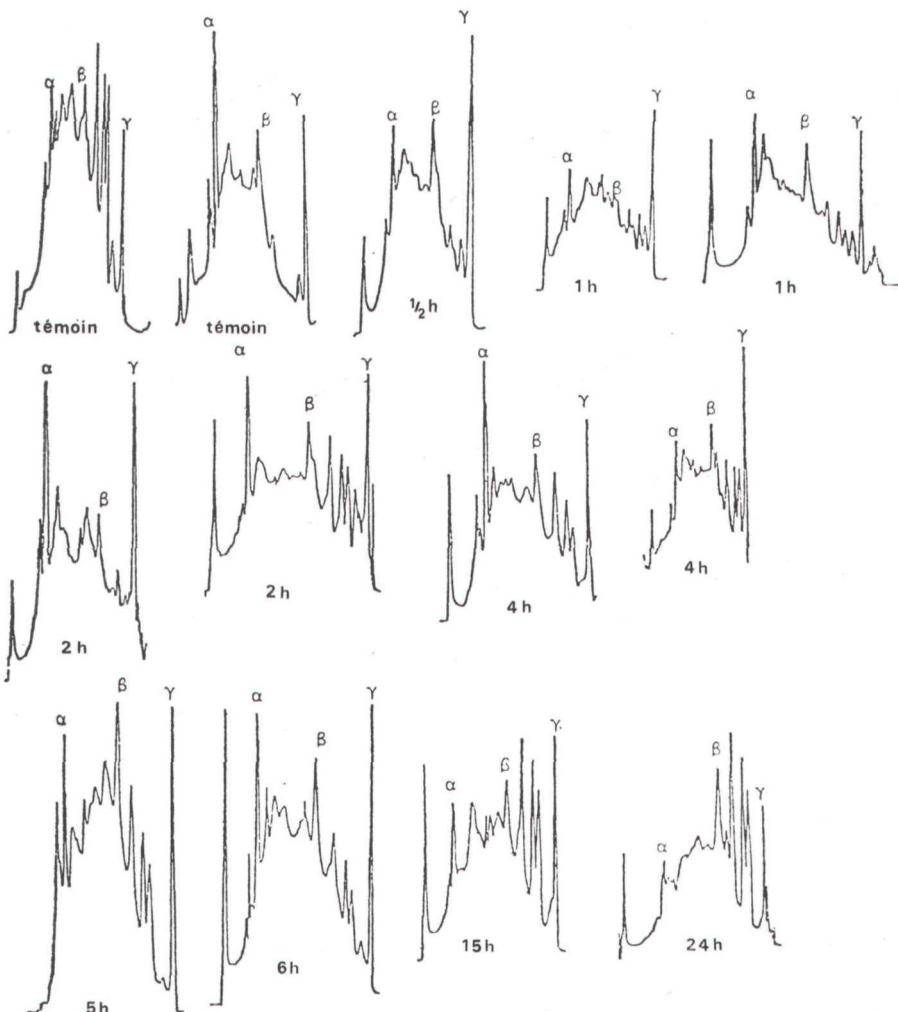


FIG. 5

Etude électrophorétique de la glande digestive de *Sepia officinalis*, au cours de la digestion (enregistrements au lecteur de gel). Les durées indiquées représentent le temps écoulé depuis l'ingestion du repas. Les témoins correspondent à des animaux à jeun.

dence les changements intervenant dans les zones délimitées par ces bandes pendant la digestion chez *Sepia*. La région subissant les modifications les plus spectaculaires est celle comprise entre les bandes β et γ , zone dans laquelle a été mise en évidence une activité protéolytique. On y constate en effet l'apparition de plusieurs bandes devenant de plus en plus importantes au cours de la digestion et se retrouvant prépondérantes à la 24^e heure. Chez *Eledone cirrosa*, comme chez *Sepia*, les modifications de la composition protéinique de l'extrait de glande digestive au cours de la digestion concernent essentiellement les protéines à forte mobilité électrophorétique (Fig. 6).

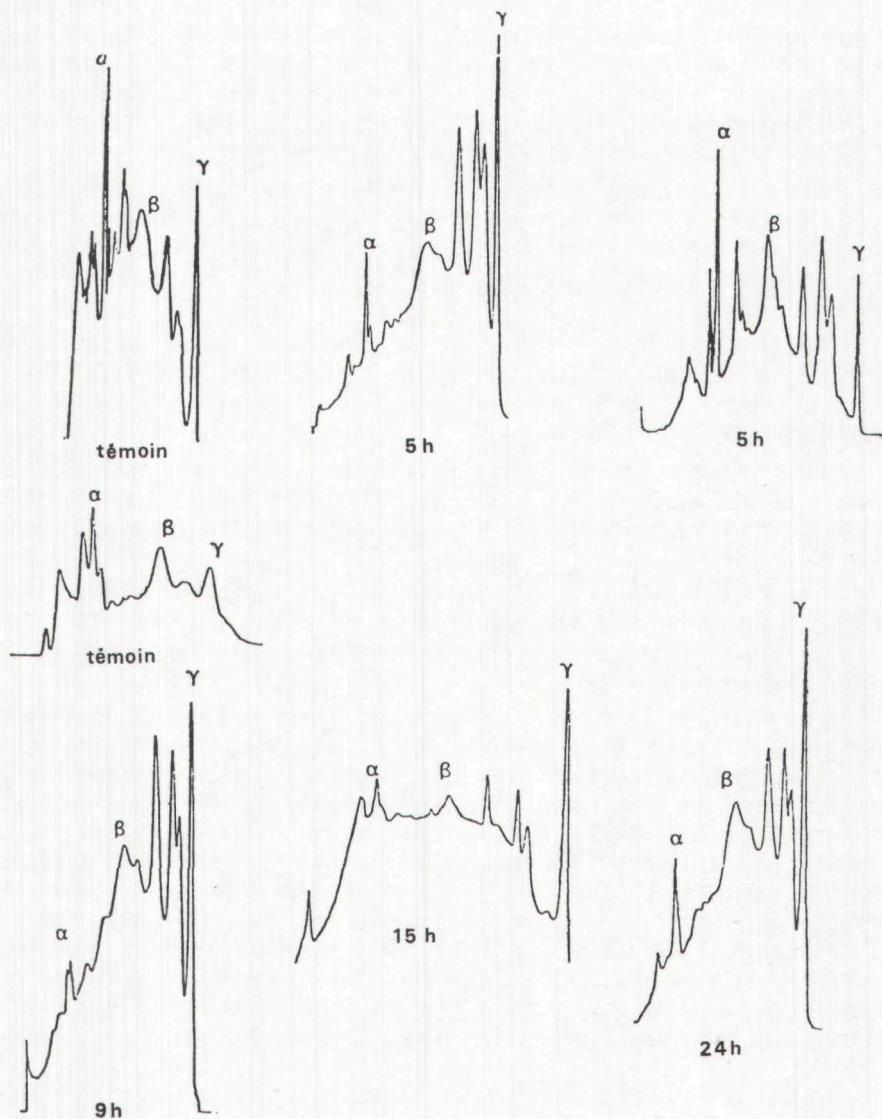


FIG. 6

Etude électrophorétique de la glande digestive de *Eledone cirrosa*, au cours de la digestion (enregistrements au lecteur de gel). Les durées indiquées représentent le temps écoulé depuis l'ingestion du repas. Les témoins correspondent à des animaux à jeun.

Chez les deux espèces, des protéases de la zone β - γ sont donc sécrétées en début de digestion, alors qu'en fin de digestion, il y a accumulation dans cette même zone.

DISCUSSION ET CONCLUSION

La contribution des différents organes aux processus digestifs a été étudiée chez plusieurs espèces, *Octopus vulgaris* (Bidder, 1957; Capurro, 1961; Boucaud-Camou *et al.*, 1976; Boucher-Rodoni et Mangold, 1977), *Sepia officinalis* (Cuénot, 1907; Bidder, 1966; Boucaud-Camou, 1968, 1969, 1973, 1974; Boucaud-Camou et Péquignat, 1973), *Eledone cirrosa* et *Illex illecebrosus* (Boucher-Rodoni, 1976), *Loligo vulgaris* et d'autres calmars (Bidder, 1950).

Chez de nombreuses espèces de Céphalopodes, la digestion des aliments débute le plus souvent dès le bulbe buccal grâce aux enzymes des glandes salivaires (Boucaud-Camou, 1973; Morishita, 1978). Certaines espèces pourraient même prédigérer les proies avant ingestion (Wilson, 1951).

Le site principal de digestion est l'estomac, organe intervenant par son action mécanique et recevant les enzymes digestives issues principalement de la glande digestive, à ce niveau. La digestion est achevée dans le caecum où seuls les aliments liquéfiés pénètrent.

Les organes responsables de l'absorption des aliments digérés sont essentiellement le caecum et la glande digestive, le rôle absorbant du caecum étant plus important chez *Octopus* que chez *Sepia*.

Les déchets alimentaires sont agglomérés dans des cordons muqueux produits par le caecum et évacués le long de l'intestin vers l'anus. L'intestin ne semble pas constituer un organe important en ce qui concerne l'absorption.

La digestion d'un repas est un phénomène rythmique, montrant des phases successives de sécrétion et d'absorption. Pendant les deux ou trois premières heures de digestion, la glande digestive est concernée par la sécrétion d'enzymes. Puis, les aliments digérés remontent du caecum dans les tubules de la glande digestive et la première phase d'absorption intervient, en même temps que les enzymes digestives sont resynthétisées. Une nouvelle phase de sécrétion, moins massive, semble intervenir ultérieurement, suivie par une nouvelle phase d'absorption. Cette rythmicité des processus digestifs est ponctuée par les envois successifs d'aliments du jabot vers l'estomac chez les Octopodes, de l'estomac vers le caecum chez la seiche, puis par des flux tantôt montant, tantôt descendant dans les canaux de la glande digestive.

Dans le cadre de ce travail, après vérification de l'existence d'activités lipasiques, amylasiques et protéasiques dans la glande digestive des espèces étudiées, la dernière de ces activités a été plus particulièrement retenue. Cette activité protéolytique est essentiellement le fait de protéines à forte mobilité électrophorétique se situant

parmi les fractions de poids moléculaire moyen. La nature de cette activité est partiellement thiol-dépendante, ainsi que cela est également le cas pour les protéases de la glande digestive de *Todarodes* (Takahashi, 1963) et de *Loligo* (Pignero and Rocca, 1969).

Au cours de la digestion d'un repas, l'activité protéolytique totale varie en rapport avec l'état de granulation des cellules de la glande digestive.

Le début de la digestion est fortement conditionné par l'état nutritionnel antérieur de l'animal expérimental (à jeun ou régulièrement nourri), dont dépend l'état de la glande digestive, ainsi que cela est attesté aussi bien par l'histologie que par les migrations électrophorétiques. Chez des animaux s'alimentant de façon régulière, les périodes initiales de forte activité enzymatique correspondent à la phase de sécrétion des « boules » (protéases) et de diminution de la teneur en protéines. Puis, les cellules resynthétisent des protéines dont la concentration augmente avant l'apparition de nouvelles « boules ».

La chute de l'activité protéolytique de l'extrait de glande digestive après le début de la digestion correspond sans doute à la fin de la sécrétion des enzymes qui participeront à la digestion extracellulaire. Les oscillations ultérieures de cette activité sont d'interprétation plus difficile car l'extrait réalisé à partir d'un broyat d'organe ne permet pas de distinguer les protéases qui agiront dans les lumières des tubules, voire dans le caecum ou l'estomac, de celles utilisées pour la digestion intracellulaire. Une telle digestion intracellulaire semble en effet exister chez les deux espèces (Boucaud-Camou et Yim, 1980; Boucher-Rodoni, en cours).

Une augmentation de l'activité protéasique ne correspond pas forcément à une augmentation de la teneur totale en protéines de la glande digestive. Ainsi, par exemple, en fin de digestion le taux protéinique est élevé, sans que cela aille de pair avec une activité protéasique particulièrement forte. Or, cette teneur élevée en protéines est à mettre en parallèle avec une augmentation des fractions à forte mobilité électrophorétique correspondant aux enzymes agissant sur le substrat proteinique. Ces dernières sont suffisamment actives pour permettre leur identification après broyage de tissu frais, mais l'activité protéolytique augmente considérablement lors de la sécrétion. Il existe probablement un inhibiteur intracellulaire de l'activité protéasique comme chez *Loligo* (Tschesche and Rücker, 1973 a et b). L'activation des enzymes paraît survenir en fin de phase de synthèse des protéines et accompagner la sécrétion. Chez *Sepia*, l'activation a probablement lieu dans les lumens de la glande digestive elle-même, où de la nourriture partiellement digérée peut remonter. Cette concentration de la fonction digestive dans la glande digestive explique sans doute les images plus facilement interprétables chez cette espèce que chez l'Octopode, où le caecum seconde beaucoup plus efficacement la glande digestive dans ses fonctions de digestion et d'absorption (Ledrut et Ungar, 1937; Boucaud-Camou *et al.*, 1976).

Ainsi, en fin de digestion, il y a accumulation de protéines, notamment de protéases, dans la glande digestive des deux espèces.

On peut supposer qu'un animal se nourrissant régulièrement (toutes les 12 ou 24 heures chez ces espèces à mœurs crépusculaires) commence à digérer un repas avec des réserves d'enzymes protéolytiques importantes dans la glande digestive.

Summary

The digestive gland of cephalopods, organ of synthesis and secretion of digestive enzymes.

This study of the digestive gland of two cephalopods, *Sepia officinalis* and *Eledone cirrosa*, has shown that the proteolytic activity of the organ is partially thiol-dependent. The fractions responsible for such an activity are among the proteins of medium molecular weight. When analyzed by electrophoretical means, they display high Rf values (0.6-1.0).

During a digestive cycle, the total proteolytic activity varies. It decreases at the beginning of digestion, showing that enzymes have been secreted, which participate probably to the extracellular digestion. At the end of the digestive process, proteins of similar molecular weight and electrophoretic mobility as those of the proteolytic enzymes accumulate in the digestive gland cells. Nevertheless, their activity is not particularly important, and is thought to be increased only when secretion occurs.

Riassunto

La ghiandola digestiva dei Cefalopodi, organo di sintesi e di secrezione degli enzimi digestivi.

Questo studio della ghiandola digestiva di due Cefalopodi, *Sepia officinalis* e *Eledone cirrosa*, ha dimostrato che l'attività proteolitica dell'organo è in parte dovuta alla presenza di thiol-proteasi. Le frazioni che presentano una tale attività si trovano tra le proteine di peso molecolare medio, la cui mobilità elettroforetica è importante (Rf compreso tra 0,6 e 1,0).

Durante la digestione di un pasto, l'attività proteolitica totale subisce variazioni. Essa diminuisce all'inizio del ciclo digestivo, ciò che indica che enzimi sono stati secretati, i quali partecipano probabilmente alla digestione extracellulare. Alla fine della digestione, delle proteine di stesso peso molecolare e stessa mobilità elettroforetica che gli enzimi proteolitici si accumulano nelle cellule dell'organo. Ma la loro attività non è particolarmente forte, e aumenta solo durante la secrezione.

Je tiens à remercier très vivement Mme K. Mangold pour son soutien et pour l'intérêt qu'elle a toujours porté à mon travail, Mme C. Faidy pour sa collaboration technique compétente et efficace, M. G. Peaucellier pour ses conseils et son aide, particulièrement en matière de gel filtration.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- BIDDER, A.M., 1950. — The digestive mechanism of the European squids *Loligo vulgaris*, *Loligo forbesii*, *Alloteuthis media* and *Alloteuthis subulata*. *Quart. J. Microsc. Sci. 3rd. series*, 91, pp. 1-43.
- BIDDER, A.M., 1957. — Evidence for an absorptive function in the "liver" of *Octopus vulgaris* Lam. *Pnbl. Staz. Zool. Napoli*, 29, pp. 139-150.
- BIDDER, A.M., 1966. — Feeding and digestion in Cephalopods. In *Physiology of Mollusca*. Ed. Wilbur and Yonge, Acad. Press. N-Y and London, II, pp. 97-124.
- BIDDER, A.M., 1976. — New names for old: the cephalopod "mid-gut gland". *J. Zool. Lond.*, 180, pp. 441-443.
- BOUCAUD-CAMOU, E., 1968. — Etude histologique et histo chimique de l'appareil digestif de *Sepiola atlantica* d'Orbigny et *Sepia officinalis* L. *Bull. Soc. Linn. Normandie*, 2, (10e série), pp. 220-243.

- BOUCAUD-CAMOU, E., 1969. — Localisation d'activités amylasiques et protéasiques dans l'appareil digestif de *Sepia officinalis* L. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 269, pp. 2564-2566.
- BOUCAUD-CAMOU, E., 1973. — Etude de l'appareil digestif de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). Essai d'analyse expérimentale des phénomènes digestifs. Thèse Doct. Univ. Caen.
- BOUCAUD-CAMOU, E., 1974. — Localisation d'activités enzymatiques impliquées dans la digestion chez *Sepia officinalis* L. *Arch. Zool. exp. gén.*, 115, (1), pp. 5-27.
- BOUCAUD-CAMOU, E., et PEQUIGNAT, E., 1973. — Etude expérimentale de l'absorption digestive chez *Sepia officinalis* L. *Forma et Funcio*, 6, pp. 93-112.
- BOUCAUD-CAMOU, E., BOUCHER-RODONI, R. and MANGOLD, x., 1976. — Digestive absorption in *Octopus vulgaris* (Cephalopoda : Octopoda). *J. Zool. Lond.* 191, pp. 89-105.
- BOUCHER-RODONI, R., 1975. — Vitesse de digestion chez les Céphalopodes *Eledone cirrosa* (Lamarck) et *Illex illecebrosus* (Lesueur). *Cah. Biol. Mar.*, 16, pp. 159-175.
- BOUCHER-RODONI, R., 1976. — Etude histologique du tube digestif de deux Céphalopodes, *Eledone cirrosa* (Octopoda) et *Illex illecebrosus* (Teuthoidea) au cours de la digestion. *Cah. Biol. Mar.*, 17, pp. 245-260.
- BOUCHER-RODONI, R., and MANGOLD, x., 1977. — Experimental study of digestion in *Octopus vulgaris* (Cephalopoda : Octopoda). *J. Zool. Lond.*, 183, pp. 505-515.
- CAPURRO, s., 1961. — Ricerche istochimiche sui mucopolisaccaridi degli epitelii del canale alimentare di *Octopus vulgaris* Lam. *Ann. Mus. Stor. Nat. Genova*, 72.
- CUENOT, L., 1907. — Fonctions absorbante et excrétrice du foie des Céphalopodes. *Arch. Zool. exp. gén.*, 7 (4), pp. 227-245.
- DAVIS, B.J., 1964. — Disc electrophoresis. II Methods and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, pp. GQG-GLB.
- EBELING, W., HENNICH, N., KLOCKOW, M., METZ, H., ORTH, H.D. and LANG, H., 1974. — Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *Eur. J. Biochem.* 47, pp. 91-97.
- GOLD, A., 1965. — Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. III. Identification of serine on the site of sulfenylation in Phenylmethane sulfonyl α -chymotrypsin. *Biochem.*, 4 (5), pp. 897-901.
- LEDRUT, J. and UNGAR, G., 1937. — Action de la sécrétine chez l'*Octopus vulgaris*. *Arch. Int. Physiol.*, 44, pp. 205-211.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, B.J., 1951. — Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, pp. 265-275.
- MORISHITA, T., 1972 a. — Studies on the distribution of proteolytic enzymes in the internal organs of *Octopus*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 38 (8), pp. 839-843.
- MORISHITA, T., 1972 b. — Studies on some properties of proteolytic enzyme from *Octopus* liver. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 38 (9), pp. 1051-1056/
- MORISHITA, T., 1972 c. — On the existence of cathepsins A, B and C in *Octopus* liver. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 38 (9), pp. 1057-1060.
- MORISHITA, T., 1974 a. — Participation in digestion by the proteolytic enzymes of the posterior salivary gland in *Octopus*. I - Confirmation of the existence of protein digestive enzymes in the posterior salivary gland. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 40 (6), pp. 595-600.
- MORISHITA, T., 1974 b. — Participation in digestion by the proteolytic enzymes of the posterior salivary gland in *Octopus*. II - Isolation and purification of the proteolytic enzymes from the posterior salivary gland. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 40 (6), pp. 601-607.
- MORISHITA, T., 1974 c. — Participation in digestion by the proteolytic enzymes of the posterior salivary in *Octopus*. III - Some properties of purified enzymes from the posterior salivary gland. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 40, (9), pp. 917-925.
- MORISHITA, T., 1974 d. — Participation in digestion by the proteolytic enzymes of the posterior salivary gland in *Octopus*. IV - Purification and some properties of proteolytic enzymes from the digestive juice. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 40 (9), pp. 927-936.
- MORISHITA, T., 1978. — Studies on the protein digestive enzymes of octopus, *O. vulgaris* Cuvier. *Bull. Fac. Fish. Mic. Univ.*, 5, pp. 197-282.
- ORNSTEIN, L., 1964. — Disc electrophoresis. I - Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, pp. 321-349.

- PIGNERO, A. and ROCCA, E., 1969. — Proteolytic and peptidasic activities of a particulate fraction of *Loligo vulgaris* Lamarck hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol.*, 29, pp. 1271-1275.
- REISNER, A.H., NEMES, P. and BUCHOLTZ, C., 1975. — The use of coomassie brilliant blue G250 perchloric acid solution for staining of electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Analyt. Biochem.* 64, pp. 509-516.
- RINDERKNECHT, H., GEOKAS, M.C., SILVERMAN, P. AND HAVERBACK, B.J., 1968. — A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clin. Chem. Acta* 21, pp. 197-203.
- STEGEMANN, H., 1968. — Die Primereinschluss-Technik zum Enzymnachweis bis 10-12 g. nach Polyacrylamid-Electrophorese, dargestellt an Phosphorylasen. *Z. Anal. Chem.*, 243, pp. 573-578.
- TAKAHASHI, T., 1960. — Biochemical studies on the viscera of cuttle-fish, *Ommastrephes sloani pacificus*. III. V. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 26, pp. 500-507 and 1006-1009.
- TAKAHASHI, T., 1963. — Studies on the viscera enzymes of cuttle-fish *Ommastrephes sloani pacificus*. *J. Fac. Fish. Pref. Univ. Mie-Tsu*, 5, pp. 384-411.
- TSCHESCHE, H. AND ROCKER, V.A., 1973 a. — Proteinase-Inhibitoren mit breiter Spezifität für Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein aus Tintenfischen (*Loligo vulgaris*). *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 354 (10-11), pp. 1447-1461.
- RÜCKER, v., A., TSCHESCHE, H. and RÜCKER, v., A., 1973 b. — Über die Organverteilung des Proteinase-Inhibitoren breiter Spezifität aus Tintenfischen (*Loligo vulgaris*) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 354 (10-11), pp. 1510-1512.
- WILSON, D.P., 1951. — Life of the shore and shallow sea. Vol. I. Nicholson and Watson, Londres, p. 150.