

ÉTUDE COMPARÉE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DES RÉGIONS SOUPLES ET DURCIES DE LA CUTICULE DE QUATRE ESPÈCES DE SIPONCULIENS.

par

M.F. Voss-Foucart, S. Barzin, Ch. Jeuniaux

et

J.C. Bussers

Laboratoire de Morphologie, Systématique et Ecologie animales,
Université de Liège, 22, quai Van Beneden, B-4020 Liège (Belgique)

Résumé

Nous avons abordé l'étude comparée de la composition chimique des régions souples et durcies de la cuticule de quatre espèces de Sipunculien : *Aspidosiphon clavatus* Diesing, *Golfingia vulgaris* (de Blainville), *Phascolion strombi* (Montagu) et *Sipunculus nudus* L.

L'étude histologique et histochimique confirme la participation du collagène à la constitution des cuticules.

Le matériel cuticulaire non protéique se compose, au moins en partie, de mucopolysaccharides neutres auxquels s'ajoutent dans les papilles de l'introvert de *S. nudus*, une certaine quantité de mucopolysaccharides acides, vraisemblablement carboxylés et soufrés.

Nous n'avons pas observé de différence histologique ou histochimique entre les parties banales et épaissies de la cuticule du corps de *Golfingia vulgaris*.

Chez *Aspidosiphon clavatus*, par contre, l'analyse chromatographique des acides aminés après hydrolyse acide révèle l'existence d'un matériel protéique particulier qui pourrait intervenir dans le durcissement des boucliers. Ce durcissement peut aussi être accentué par dépôt de carbonates.

Tout comme chez les Sipunculien à cuticule entièrement molle, la recherche de chitine par méthode enzymatique a donné des résultats négatifs chez les espèces à cuticule localement durcie, à savoir *Aspidosiphon clavatus* et *Phascolion strombi*.

1. Introduction et description morphologique

La cuticule de certaines espèces de Sipunculien présente la particularité d'être durcie au niveau de régions bien définies. Ainsi, chez les représentants de la famille des Aspidosiphonidae, il existe un ou deux boucliers. Si le bouclier est unique, il est antérieur, sinon, le second bouclier est tout à fait postérieur : c'est le cas du genre *Aspidosiphon* (Stephen et Edmonds 1972). L'étude morphologique de ces boucliers a été abordée par Rice (1969). Nous avons pour notre

part observé les boucliers antérieur et postérieur de *Aspidosiphon clavatus* Diesing ainsi que les régions durcies de la cuticule de *Golfingia vulgaris* (de Blainville) et *Phascolion strombi* (Montagu).

Le bouclier antérieur ou anal de *Aspidosiphon clavatus*, essentiellement dorsal, a une forme de coquille Saint-Jacques dont la charnière serait à la base de l'introvert (Fig. 1). Il est garni de sillons longitudinaux, recoupés dans la partie antérieure par des sillons transversaux. Ces sillons délimitent des plages constituées de plaquettes polygonales. Certains groupes de plaquettes entourent des orifices probablement papillaires. Les plaquettes se retrouvent dans les sillons où elles sont en général de plus grande taille. Le bouclier

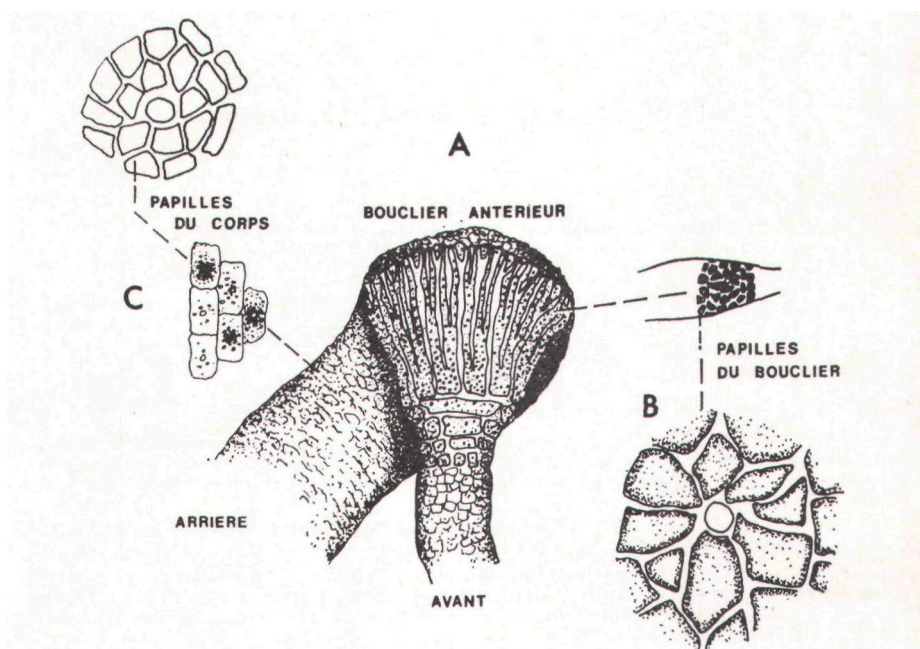


FIG. 1

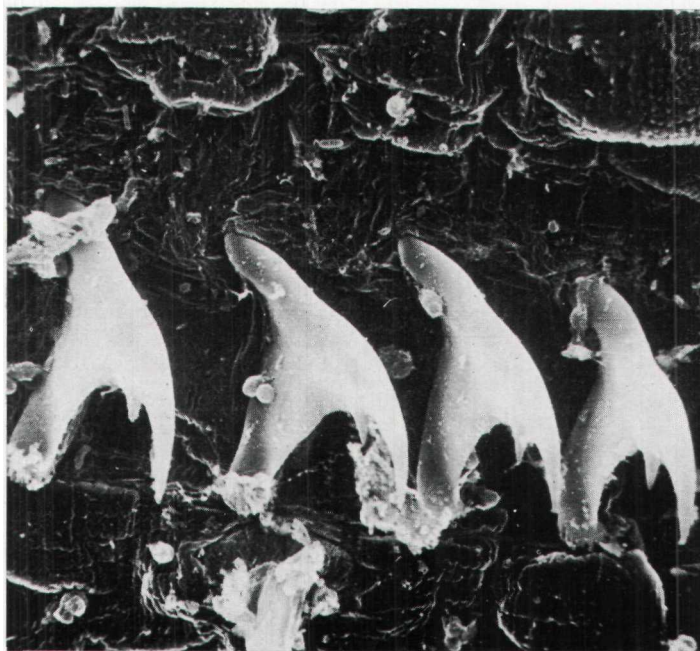
Aspidosiphon clavatus

A : bouclier antérieur ; B : détail du bouclier, avec une papille, montrant l'arrangement des plaquettes autour de l'orifice papillaire ; C : aspect des papilles du corps et arrangement des plaquettes autour de l'orifice papillaire.

postérieur, circulaire, est constitué de plaquettes semblables. Sa consistance est cependant moins dure. Les sillons qui le découpent sont dirigés radialement.

On trouve également des plaquettes, apparemment similaires, sur le corps de l'animal, au voisinage des boucliers et à la base de l'introvert. Elles sont disposées de façon à entourer les papilles, ménageant au sommet un orifice qui pourrait être glandulaire.

D'autre part, la surface de l'introvert est garnie de crochets, bifides dans la partie antérieure de l'organe, à pointe unique dans la partie postérieure d'après Stephen et Edmonds (1972). Nous avons pu vérifier ces données par des observations au microscope optique et au



M.F. VOSS-FOUCART, S. BARZIN, CH. JEUNIAUX, J.C. BUSSERS

PLANCHE I

En haut : disposition des crochets sur l'introvert d'*Aspidosiphon clavatus* x 380.
 En bas : crochets bifides de la partie antérieure de l'introvert x 1520.

microscope électronique à balayage (Planche I). Nous avons également constaté que les crochets sont disposés en rangées transversales dans la partie antérieure de l'introvert mais sont dispersés apparemment sans ordre quand on se rapproche de sa base.

Chez *Golfingia vulgaris* (de Blainville), il n'y a pas de bouclier mais des épaisissements cuticulaires, situés immédiatement en arrière de la base de l'introvert et sur la coupole terminale, soit aux endroits correspondant aux boucliers chez *Aspidosiphon clavatus*.

Chez *Phascolion strombi* (Montagu), comme chez les autres espèces de Phascolions, on observe des papilles adhésives ou d'accrochage. Elles sont situées dans la moitié postérieure du tronc et disposées sans ordre apparent. Ces papilles sont entourées d'un bord durci en forme de fer à cheval, présentant une protubérance en son milieu. La concavité du fer à cheval est tournée vers la partie postérieure de l'animal. L'introvert, pour sa part, se termine par une rangée de tentacules suivie immédiatement par une étroite zone garnie de crochets délicats.

Les différents auteurs ne s'entendent guère sur la composition chimique des épines, crochets ou plaquettes de la cuticule. Certains les décrivent comme chitineux (Hérubel, 1907 ; Tétry, 1959), d'autres comme cornés (Rice, 1969), d'autres encore comme de simples épaisissements locaux de la cuticule (Hyman, 1959).

Nous avons étudié la composition chimique des régions souples et durcies de la cuticule de quatre espèces de Siponculiens : *Sipunculus nudus* L., *Golfingia vulgaris* (de Blainville), *Aspidosiphon clavatus* Diesing et *Phascolion strombi* (Montagu). D'une part, nous avons appliqué des tests histochimiques à des coupes réalisées sur du matériel frais. D'autre part, nous avons recherché par méthode enzymatique la présence de chitine dans les régions durcies de la cuticule. Enfin, dans le cas d'*Aspidosiphon clavatus*, nous avons effectué l'analyse d'extraits peptidiques obtenus à partir des différentes régions cuticulaires.

2. Matériel

Les exemplaires, vivants ou fixés, de *Sipunculus nudus* et de *Golfingia vulgaris* nous ont été fournis par la Station de Biologie marine de Roscoff. Nous avons récolté les *Aspidosiphon clavatus* et les *Phascolion strombi* par dragage à 40 m de profondeur dans la Baie de Calvi (Corse) au départ de la Station STARESO, de l'Université de Liège. Les deux espèces habitaient des coquilles de *Turritella* sp. Les animaux ont été fixés et conservés dans l'alcool à 70°.

3. Méthodes

Tests histochimiques.

Ces tests ont porté sur des coupes de *S. nudus* et *G. vulgaris*. Les fragments de cuticule et de paroi du corps ont été fixés au liquide de Bouin pendant 24 heures, déshydratés puis inclus à la paraffine. Les coupes (7 μ) ont été soumises aux réactions suivantes :

coloration topographique à l'Azan ;

méthode à la picrofuchisine de Van Gieson pour la mise en évidence du collagène ;

réaction de Chèvremont et Frédéric (1943) pour la mise en évidence des protéines soufrées ;

réaction du **PAS** avec acétylation réversible et digestion salivaire, du bleu alcian à pH 2.5 avec méthylation réversible et séquence bleu alcian-PAS pour la mise en évidence des polysaccharides et mucopolysaccharides.

Décalcification.

Certains travaux faisant état de la présence de CaCO_3 dans les boucliers de trois espèces d'Aspidosiphonidae, nous avons soumis les cuticules d'*A. clavatus* et de *P. strombi* à l'action de l'acide chlorhydrique **0.5 N** pendant **3 heures** à la température ordinaire.

Test enzymatique pour la recherche de chitine.

Nous avons utilisé la méthode enzymatique spécifique de Jeuniaux (1963, 1965) qui consiste à traiter les structures à étudier par des solutions de chitinases purifiées, à 37 °C et à pH 5.2 pendant 6 heures. Le liquide surnageant a été ensuite incubé en présence de chitobiase et on a recherché l'acétylglucosamine libérée par la méthode colorimétrique de Reissig *et al.* (1955). Cette méthode a été appliquée après traitement à la soude 0.5 N à 100°, traitement qui permet le démasquage de la chitine de ses complexes chitinoprotéiques.

Extraction du collagène cuticulaire et analyse de la fraction polypeptidique du matériel résiduel.

Pour extraire le collagène cuticulaire, nous avons traité les échantillons par l'acide trichloracétique à **10 p. 100** à chaud suivant la méthode employée par Fujimoto et Adams (1964). Le matériel résiduel a été séparé par centrifugation et hydrolysé en tubes scellés sous vide (HCl **6 N**, **24 heures** à 110°). La détermination de la composition en acides aminés des hydrolysats a été réalisée par Chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions, suivant une méthode mise au point par nous-mêmes (Voss-Foucart *et al.* sous presse).

Observation au microscope électronique à balayage.

Les observations au microscope électronique à balayage ont été effectuées après fixation au Parducz (1967), déshydratation par la méthode du point critique et ombrage au carbone et à l'or-palladium.

4. Résultats

a) Tests histochimiques.

Sipunculus nudus : les résultats des tests histochimiques appliqués aux coupes de paroi du corps et de l'introvert figurent dans le tableau 1. Les résultats obtenus lors de la réaction topographique de

TABLEAU 1

Résultats des tests histochimiques appliqués à des coupes de paroi du corps et de l'introvert de *Sipunculus nudus*. Les résultats concernent uniquement les réactions observées au niveau de la cuticule.

Réactions	Cuticule du corps	Cuticule de l'introvert	Interprétation
Azan	Bleu foncé avec quelques zones rougeâtres	Bleu foncé	
Van Gieson	+	+	Présence probable de collagène.
PAS	+	+	Présence de groupements réagissant au Schiff après action de l'acide periodique.
Pyridine-PAS	+	+	La réaction PAS + n'est pas due, uniquement du moins, à des lipides.
Acétylation-PAS	—	—	Blocage des groupements —OH.
Acétylation-KOH-PAS	+	+	Restauration des groupements 1-2 glycol des polysaccharides.
Salive-PAS	+	+	La réaction PAS + n'est pas due, uniquement du moins, à du glycogène.
Bleu alcian	—	Une bande positive sur les papilles. Sommet des papilles +	Présence de mucopolysaccharides acides.
Méthylation-bleu alcian	—	—	Blocage des groupements alcianophiles.
Méthylation-KOH-bleu alcian	—	Bande de la face supérieure des papilles + Sommet et bande de la face inférieure —	Mucopolysaccharides acides carboxylés restaurés, les soufrés, non.
Bleu alcian-PAS	Rose	Rose	Dominance des polysaccharides sur les mucopolysaccharides acides.
Chèvremont	—	—	Absence de protéines à groupements —SH.

l'Azan et de la réaction de Van Gieson sont en accord avec l'existence de collagène dont nous avons démontré la présence par l'analyse biochimique (Voss-Foucart *et al.*, sous presse).

La réaction du PAS, positive au niveau de la cuticule du corps comme de celle de l'introvert, abolie par acétylation, rétablie après saponification, montre la présence de polysaccharides. Le test préalable de la digestion salivaire indique qu'il ne s'agit pas, exclusivement du moins, de glycogène.

La réaction au bleu alcian, caractéristique des mucopolysaccharides acides, est négative dans la cuticule du corps, mais est positive à trois niveaux de la cuticule de l'introvert : à la face supérieure des papilles, dans la partie externe, au niveau du sommet des papilles et à la face inférieure des papilles, sur la face interne, contre l'épiderme. Les résultats de la méthylation et de la saponification au KOH suggèrent la présence de mucopolysaccharides acides carboxylés au

niveau de la partie externe de la face supérieure des papilles, de mucopolysaccharides acides soufrés au sommet et sur la face inférieure des papilles. Ces mucopolysaccharides acides sont cependant peu importants par rapport aux autres polysaccharides puisque, dans l'introvert comme dans le corps, la séquence « bleu alcian-PAS » colore uniformément les cuticules en rose.

Enfin, la réaction de Chèvremont et Frédéric, 1943, négative, indique l'absence dans les cuticules de protéines à groupement SH.

Golfingia vulgaris : nous présentons dans le tableau 2 les résultats des tests histochimiques appliqués à des coupes de paroi du corps à cuticule banale ou épaissie et de paroi de l'introvert. Ces résultats sont assez voisins de ceux qui ont été obtenus dans le cas de *Sipunculus nudus*, en ce qui concerne la présence de collagène dans la cuticule, celle de polysaccharides et l'absence de protéines à groupements SH.

TABLEAU 2

Résultats des tests histochimiques appliqués à des coupes de paroi du **corps**, des épaississements et de l'introvert de *Golfingia vulgaris*. Les résultats concernent uniquement les réactions observées **au** niveau de **la** cuticule.

Réactions	Cuticule du corps	Cuticule des épaississements	Cuticule de l'introvert	Interprétation
Aran	Zones bleu foncé et rougeâtres	Zones bleu foncé et rougeâtres	Rouge dominant avec zones bleu foncé	
Van Gieson	+	+	+	Présence probable de collagène (confirmation de nos analyses chimiques).
PAS	+	+	+	Présence de groupements réagissant au Schiff après action de l'acide periodique.
Pyridine-Pas	+	+	+	La réaction PAS+ n'est pas due, uniquement du moins, à des lipides.
Acétylation-PAS	—	—	—	Blocage des groupements —OH.
Acétylation-KOH-PAS	+	+	+	Restauration des groupements 1-2 glycol des polysaccharides.
Salive-PAS	+	+	+	La réaction PAS+ n'est pas due, uniquement du moins, à du glycogène.
Bleu alcian	± sauf, par endroits, une fine zone externe	± sauf, par endroits, une fine zone externe	± sauf, par endroits, une fine zone externe	Présence de mucopolysaccharides acides.
Méthylation-bleu alcian	—	—	—	Blocage des groupements alcianophiles.
Méthylation-KOH-bleu alcian	± zone externe +	± zone externe +	± zone externe +	Restauration des mucopolysaccharides acides carbonylés.
Bleu alcian-PAS	Rose	Rose	Rose	Dominance des polysaccharides sur les mucopolysaccharides acides.
Chèvremont	—	—	—	Absence de protéines à groupements —SH.

Les cuticules des trois régions contiennent également des mucopolysaccharides acides, car elles prennent une teinte légèrement bleutée sous l'action du bleu alcian. De plus, par endroits, on observe une fine bordure externe, mal délimitée, colorée en bleu : la coloration, absente quand il y a méthylation, devient positive après traitement par la potasse, ce qui suggère la présence de mucopolysaccharides acides carboxylés. Ceux-ci pourraient être sécrétés par les glandes sous-jacentes dont certains produits de sécrétion se colorent également.

b) Action de l'acide chlorhydrique.

Le traitement des cuticules d'*Aspidosiphon clavatus* et de *Phascolion strombi* par l'acide chlorhydrique s'accompagne d'un dégagement gazeux. Les éléments de structure restent cependant parfaitement reconnaissables même s'ils deviennent plus mous. Les plaquettes des boucliers se détachent alors relativement facilement. L'ensemble de ces observations suggère que des carbonates participent à la composition de ces structures cuticulaires durcies. Les chiffres indiqués dans le tableau 3 rendent compte de la perte de poids lors du traitement à l'acide chlorhydrique.

TABLEAU 9

Perte de poids (en g pour 100 g de poids sec initial) des cuticules d'*Aspidosiphon clavatus* et *Phascolion strombi* après traitement par HCl 0,5 N à 20°C.

	Corps	Boucliers	Introverts
<i>A. clavatus</i>			
lot 1	17,55	11,74	27,81
lot 2	41,32		38,15
<i>P. strombi</i>	42,58	—	56,06

Le calcaire ne semble pas plus abondant au niveau des boucliers qui sont pourtant les structures les plus dures. Cependant, la perte de poids varie considérablement d'une analyse à l'autre. Nous pensons qu'à côté du calcaire endogène dont la présence est suggérée par le ramollissement des cuticules et la relative désintégration des boucliers lors du traitement à l'acide, il pourrait y avoir des dépôts exogènes d'importance variable selon les spécimens étudiés. Rappelons le cas du bouclier antérieur de *Lithacrosiphon gurjanovae* incrusté d'une algue calcaire (Rice, 1969).

c) Tests enzymatiques pour la recherche de chitine.

Nous n'avons recherché la présence de chitine que dans diverses structures tégumentaires durcies, à savoir les plaquettes et crochets d'*Aspidosiphon clavatus*, les papilles en fer à cheval et les crochets de *Phascolion strombi*. La plupart des auteurs s'accordent en effet à reconnaître l'absence de cette substance dans la cuticule banale (Carlisle, 1959 ; Jeuniaux, 1963 ; Hyman, 1966). Les différents échantillons ont été soumis à l'action répétée de solutions de chitinases purifiées (activité : 400 unités néphélométriques, puis à l'action d'une

solution de chitobiase (sérum de Homard dilué). Les résultats des dosages d'acétylglucosamine ont été négatifs dans tous les cas. La chitine n'entre donc pas dans la composition des cuticules des Siponculiens *Aspidosiphon clavatus* et *Phascolion strombi*, pas plus dans les régions localement durcies que dans les régions molles. Les épaississements cuticulaires locaux résistent plus longtemps à l'action de la soude mais le test enzymatique démontre néanmoins l'absence de chitine.

d) Extraction du collagène cuticulaire et analyse de la fraction polypeptidique du matériel résiduel.

L'analyse de la composition en acides aminés des constituants protéiques extraits des cuticules par traitement à l'acide trichloracétique fait l'objet d'une autre publication (Voss-Foucart, Barzin et Toussaint, sous presse). Rappelons que ce traitement permet d'extraire une fraction protéique représentant, en partie au moins, le collagène de la cuticule. La composition du collagène extrait des portions cuticulaires épaissies ne se distingue guère de celle des portions de cuticule banale chez *Golfingia vulgaris*, mais le collagène des boucliers à *Aspidosiphon* se caractérise par un rapport très faible entre l'hydroxyproline et la proline.

TABLEAU 4
Composition en acides aminés (exprimée en pourcentages molaires) de la fraction protéique intervenant dans la composition du résidu après les extractions à l'acide trichloracétique, chez *Aspidosiphon clavatus*.

Acides aminés	Boucliers	Corps	Introvert
Hydroxyproline	0	0	0
Acide aspartique	5,72	9,40	10,34
Thréonine	2,63	4,07	5,19
Sérine	6,27	6,56	6,84
Acide glutamique	4,35	7,48	10,89
Proline	4,97	5,00	5,21
Glycine	41,00	24,86	19,71
Alanine	2,59	5,52	7,21
Valine	2,18	3,91	4,97
Cystine	+	+	+
Méthionine	++	+	+
Isoleucine	1,28	2,92	3,03
Leucine	1,93	3,62	4,91
Tyrosine	10,57	7,91	4,42
Phénylalanine	1,36	2,72	2,84
Lysine	3,93	4,49	4,50
Histidine	4,18	2,55	1,66
Arginine	6,98	8,92	8,22
Importance pondérale des acides aminés dans le matériel résiduel	37,39 pourcentage	27,76 pourcentage	13,41 pourcentage

Le tableau 4 compare la composition en acides aminés de la fraction protéique résiduelle de la cuticule banale du corps d'*Aspidosiphon clavatus* à celle de la cuticule durcie des boucliers et à celle de l'introvert de la même espèce.

On constate l'absence d'hydroxyproline, ce qui confirme que le collagène a été totalement extrait par le traitement à l'acide trichloro-acétique. Le matériel protéique résiduel est plus abondant au niveau des boucliers (37,39 p. 100) et se caractérise par la proportion particulièrement élevée de la glycine (41 p. 100) et par la relativement haute teneur en tyrosine.

5. Discussion

La cuticule des Siponculiens contient, en proportions variables, selon les espèces, du collagène, des protéines non extraites par l'acide trichloroacétique et des mucopolysaccharides neutres et acides. La cuticule des zones durcies (boucliers, crochets de l'introvert) des deux espèces cavernicoles *Aspidosiphon clavatus* et *Phascolion strombi* ne contient pas de chitine, pas plus que la cuticule du corps de ces mêmes espèces.

En ce qui concerne les protéines cuticulaires autres que le collagène, — très semblable, chez toutes les espèces étudiées (Voss-Foucart, Barzin, Toussaint, sous presse) — l'analyse de la fraction protéique du matériel résiduel a montré, dans le cas de *S. nudus* et de *G. vulgaris* que les différences de composition qui existent entre régions cuticulaires différentes d'une même espèce sont faibles, mais que l'importance pondérale de la fraction protéique varie considérablement (Voss-Foucart *et al.*, l.c.).

La fraction protéique résiduelle de la cuticule d'*Aspidosiphon* est fort différente de celle de ces espèces. C'est spécialement au niveau des boucliers que se marque cette différence de composition : les acides aspartique et glutamique présentent des valeurs tout à fait moyennes par rapport à celles des autres acides aminés ; par contre, la quantité de glycine est exceptionnellement élevée, la tyrosine suit la glycine avec une valeur inhabituelle de 10,57 p. 100 ; l'alanine est remarquablement peu abondante, comme d'ailleurs la plupart des autres acides aminés. Si nous considérons maintenant le corps et l'introvert, nous constatons que la composition en acides aminés de la fraction protéique résiduelle est en quelque sorte intermédiaire entre celle des boucliers d'*Aspidosiphon* et celle des cuticules des autres espèces étudiées antérieurement : la glycine représente l'acide aminé dominant mais sa valeur est environ égale à la moitié de celle des boucliers ; d'autre part, les acides aminés acides sont plus abondants qu'au niveau des boucliers.

Nous pensons pouvoir interpréter ces résultats en considérant que, dans les trois échantillons, nous avons vraisemblablement affaire à une association, en proportions variables, d'une protéine à haut pourcentage en glycine et tyrosine et, d'autre part, d'une protéine qui correspondrait à la fraction protéique caractéristique des autres espèces. Les proportions de ces deux substances varieraient considérablement d'une région à l'autre : le matériel protéique non « collagène » des boucliers serait composé presque exclusivement de la protéine à haut pourcentage de glycine et de tyrosine, dans la cuticule du corps, cette protéine serait moins abondante et moins encore dans la cuticule de l'introvert.

Il se pourrait que les plaquettes, dont l'importance décroît en passant des boucliers au corps et de celui-ci à l'introvert, soient précisément constituées, au moins en partie, de la protéine à haut pourcentage en glycine et tyrosine.

La fraction protéique non « collagène » des boucliers étant différente de celle des autres espèces, on peut se demander si elle ne constitue pas l'une des substances responsables de la dureté des boucliers. Le haut pourcentage en tyrosine pourrait suggérer la possibilité d'un tannage quinonique à ce niveau.

CONCLUSIONS

Les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec ceux de nos analyses antérieures en ce qui concerne la participation du collagène à la constitution des cuticules.

Le matériel cuticulaire non protéique se compose au moins en partie de mucopolysaccharides neutres, auxquels s'ajoutent, dans les papilles de l'introvert de *S. nudus*, une certaine quantité de mucopolysaccharides acides vraisemblablement carboxylés et soufrés.

Nous n'avons décelé aucune différence histologique entre les cuticules banales et épaissies du corps de *Golfingia vulgaris*. Par contre, nous avons mis en évidence un matériel protéique particulier aux *Aspidosiphon* qui pourrait intervenir dans le durcissement des boucliers, ce dernier pouvant être accentué par dépôt de CaCO_3 .

Enfin, la recherche de chitine s'est avérée entièrement négative chez les Sipunculidés à cuticule localement durcie tout comme elle l'est chez les espèces à cuticule entièrement molle.

Summary

Comparative study of the chemical composition of flexible and hard parts of the cuticle of Sipunculids was realized on four species: *Aspidosiphon clavatus* Diesing, *Golfingia vulgaris* (de Blainville), *Phascolion strombi* (Montagu) and *Sipunculus nudus* L.

The histochemistry confirmed that collagen takes part in the composition of the cuticle in all the species studied.

Non protidic cuticular material consisted of neutral mucopolysaccharides, associated with acid mucopolysaccharides in the papillae of the introvert of *S. nudus*.

Histological and histochemical differences between hard and flexible parts of the cuticle of the body of *G. vulgaris* were not observed.

In *Aspidosiphon clavatus*, a peculiar protidic material, detected by amino acid chromatography after acid hydrolysis, could play a role in the hardening of the shields, this hardening being possibly increased by carbonate deposits.

Using a specific enzymatic method, it was shown that chitin was lacking in the species with locally hardened cuticle as in those with flexible cuticle.

Nous exprimons notre gratitude à Monsieur le Professeur W. Verly du Service de Chimie biologique qui a bien voulu mettre à notre disposition l'analyseur Beckman Spinco. Nous tenons également à remercier Madame N. Bouchez pour l'efficacité de son aide technique dans la réalisation de la partie histochemique de ce travail.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- CARLISLE, D.B., 1959. — On the neurosecretory system of the brain and associated structure in *Sipunculus nudus* with a note on the cuticle. *Gumma J. Medic. Sci.*, 8, pp. 183-194.
- CHÈVREMONT, M. et FRÉDÉRIC, J., 1943. — Une nouvelle méthode histochimique de mise en évidence des substances à fonction sulfhydryle — Application à l'épiderme, au poil et à la levure. *Arch. Biologie*, LIV/4, pp. 589-605.
- FUJIMOTO, D. et ADAMS, E., 1964. — Intraspecies composition difference in collagen from cuticle and body of *Ascaris* and *Lumbricus*, *Biochem. Biophys. res. Com.*, 17 (4), pp. 437-442.
- HÉRUBEL, M.A., 1907. — Recherches sur les Sipunculides. *Mém. Soc. zool. France*, 20, pp. 107-418.
- HVMAN, L., 1959. — The prostomatous coelomates — phylum Sipunculida, in *The Invertebrates*, vol. V, pp. 610-696 (Mac Graw-Hill Book Cy, New York).
- HYMAN, L., 1966. — Further notes on the occurrence of chitin in Invertebrates. *Biol. Bull.*, 130, pp. 94-95.
- JEUNIAUX, CH., 1963. — Chitine et chitinolyse. Paris, Masson et Cie, éd., 181 pp.
- JEUNIAUX, CH., 1965. — Chitine et phylogénie : application d'une méthode enzymatique de dosage de la chitine. *Soc. Chim. Biol. Bull.*, 47, pp. 2267-2278.
- PARDUCZ, B., 1967. — Ciliary movement and coordination in Ciliates. *Intern. Rev. Cytol.*, 21, pp. 91-128.
- REISSIG, J.L., STROMINGER, J.L. et LELOIR, L.F., 1955. — A modified colorimetric method for the estimation of N-acétyl-amino-sugars. *J. Biol. Chem.*, 217, pp. 959-966.
- RICE, ME., 1969. — Possible boring structures of Sipunculids. *Am. Zool.*, 9, pp. 803-813.
- STEPHEN, A.C. et EDMONDS, S.J., 1972. — The phyla Sipuncula and Echiura. Trustees of the Brit. Mus. (Nat. Hist.) London, 528 pp.
- TÉTRY, A., 1959. — Sipunculiens in Grassé : *Traité de Zoologie*, vol. V, pp. 785-854.
- VOSS-FOUCART, M.F., BARZIN, S. et TOUSSAINT, C., 1978. — *Arch. Zool. exp. gén., sous presse*.