

Reçu le 20 février 1973.

DISTRIBUTION ET LOCALISATION TISSULAIRE
DE LA SYNTHÈSE DES CHITINASES
CHEZ LES VERTÉBRÉS INFÉRIEURS

PAR

J. C. MICHA, G. DANDRIFOSSE et Ch. JEUNIAUX

(Université de Liège, Institut Ed. Van Beneden, Laboratoires de Morphologie, Systématique et Ecologie animales, et Institut L. Fredericq, Laboratoire de Biochimie générale et comparée)

INTRODUCTION

On sait que beaucoup de Vertébrés supérieurs sont capables de digérer la chitine, grâce à la sécrétion de chitinases par la muqueuse gastrique et, dans certains cas, par le pancréas (JEUNIAUX, 1961, 1962 & 1963; DANDRIFOSSE, 1962; DANDRIFOSSE *et al.*, 1965). Chez les Mammifères comme chez les Oiseaux et les Reptiles, seules les espèces à régime alimentaire insectivore ou omnivore possèdent cette propriété (JEUNIAUX, 1963 & 1971).

Dans le cas des Poissons, on a également pu mettre des chitinases en évidence chez diverses espèces, mais la localisation tissulaire de la synthèse de ces enzymes semble beaucoup plus variable. Les chitinases sont élaborées soit par tous les organes constituant le tractus digestif (*Carassius auratus* : JEUNIAUX, 1963), soit par l'estomac, l'intestin et le foie (*Salmo irideus* : OKUTANI *et al.*, 1967; *Scylliorhinus canicula* : ALLIOT & BOCQUET, 1967), soit par l'estomac, le foie et la rate (*Lateolabrax japonicus* et 5 autres espèces : OKUTANI & KIMATA, 1964), soit par l'estomac et le foie (*Ommastrephes sloani* et *Polypus dofleini* : OKUTANI & KIMATA, 1964) soit par l'estomac exclusivement (*Anguilla vulgaris*, *Salmo trutta*, *Raia brachyura* : JEUNIAUX, 1963; *Acanthopagrus schlegelii* : SERA & OKUTANI, 1968). Jusqu'à présent, aucun auteur n'a signalé l'absence de chitinases chez un Poisson.

Enzymes : Poly- β -1,4-(2-acetamido-2-deoxy)-D-glucoside glycanohydrolase ou chitinase (E. N. 3.2.1.14); Chitobiose acetamidodeoxyglucohydrolase ou chitobiase (E. N. 3.2.1.29).

D'une part, dans l'état actuel des connaissances, on peut donc se demander dans quelle mesure la synthèse de chitinases constitue une propriété générale des Poissons, et si la spécialisation de certains organes du système digestif dans la sécrétion de ces enzymes peut être mise en relation avec la position systématique. D'autre part, alors que la corrélation entre la sécrétion de chitinases et le régime alimentaire est bien établie chez les Vertébrés supérieurs (JEUNIAUX, 1963 & 1971), les données actuellement disponibles ne permettent pas encore de tirer la même conclusion dans le cas des Poissons.

Afin de pouvoir répondre à ces questions, nous avons cherché à préciser la distribution zoologique et la localisation tissulaire de la synthèse de chitinases chez des Vertébrés inférieurs à régime alimentaire spécialisé, soit composé essentiellement de proies à téguiments chitineux (insectivores ou mangeurs de crustacés), soit au contraire dépourvu de chitine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) Matériel biologique.

Nous avons étudié 3 espèces de Reptiles, 4 espèces de Batraciens et 29 espèces de Poissons. Les poissons d'eau douce ont été pêchés dans l'Ourthe et dans la Semois (rivières de Belgique); les poissons marins ont été pêchés au chalut au large du port de Boulogne (¹).

Comme l'activité des hydrolases d'un tissu peut être sujette à des variations en fonction de l'âge, de l'activité, du jeûne, etc. (HARTMANN *et al.*, 1961), nous avons veillé à n'utiliser que des animaux adultes, fraîchement capturés.

2) Méthodes.

a) Préparation des extraits enzymatiques.

Les tissus, soigneusement isolés, sont lavés dans une solution saline, nettoyés au moyen d'un pinceau et essorés sur papier filtre avant d'être pesés. Nous avons veillé à éliminer les parasites fixés parfois aux muqueuses. Les strates musculaires et les mésentères,

(¹) Nous remercions M. le Professeur DEFRETTIN et M. R. GLAÇON, de la Station de Biologie Maritime et Régionale de Wimereux, pour les moyens techniques qu'ils ont bien voulu mettre à notre disposition, tant pour la capture des poissons que pour la préparation des extraits.

qui peuvent abriter le pancréas diffus, sont soigneusement écartés (sauf mention contraire). Les tissus, après pesée, sont homogénéisés (Potter) ou broyés au mortier en présence de sable lavé. Par addition d'eau distillée, les homogénats sont amenés à un volume tel que la proportion de tissu frais soit comprise entre 100 et 200 mg/ml de suspension. Les homogénats séjournent pendant 24 heures à 0 °C, puis sont centrifugés (3 000 rev. × min⁻¹ pendant 10 min). Les liquides surnageants sont conservés congelés à —10 °C jusqu'au moment du dosage; dans ces conditions, l'activité des chitinases reste constante pendant 2 ans minimum (JEUNIAUX, 1963).

b) Dosage de l'activité des chitinases.

Le substrat employé est une suspension de chitine « native », préparée à partir de sépions de *Sepia officinalis* (JEUNIAUX, 1963). L'activité chitinolytique est mesurée par la méthode de JEUNIAUX (1963 & 1966) mise au point pour l'étude des solutions enzymatiques dépourvues de chitobiase. Elle consiste à permettre l'hydrolyse du chitobiose, libéré à partir de la chitine, en *N*-acétyl-D-glucosamine libre, en ajoutant de la chitobiase au milieu réactionnel.

A 1 ml de suspension de chitine (5 mg/ml), on ajoute 1 ml de tampon acide citrique-Na₂HPO₄ 0.6 M de pH 5.2, 1 ml de sérum de homard dilué 10 fois (source de chitobiase) et 1 ml d'extrait enzymatique. L'acétylglucosamine présente au temps 0 et après 1 et 2 heures d'incubation à 37 °C est mesurée, après inactivation des enzymes à 100 °C, par la méthode colorimétrique de REISSIG *et al.* (1955).

L'activité est exprimée en µg d'acétylglucosamine libérée × h⁻¹ × g⁻¹ de tissus frais.

RÉSULTATS

1. Reptiles (tableau I).

Le lézard vert *Lacerta viridis* et la tortue d'eau *Clemmys caspica leprosa*, qui ont un régime alimentaire insectivore, sont capables de digérer la chitine grâce à la sécrétion très élevée de chitinases par la muqueuse gastrique et par le pancréas. Par contre, chez la couleuvre *Natrix natrix helvetica*, qui ne mange que des petits Vertébrés (DE WITTE, 1942), les tissus du système digestif sont dépourvus de chitinase.

TABLEAU I. Localisation et activité des chitinases chez trois espèces de Reptiles

Espèces	Activité : µg d'acétylglucosamine libérée × h ⁻¹ × g ⁻¹ de tissus frais						
	Muqueuses			Pancréas	Foie	Rate	Reins
	œsophago-gienne	gastrique	intestinale				
<i>Lacerta viridis</i> L.	—	12 145	0	22 210	0	—	—
<i>Clemmys caspica leprosa</i>	—	19 180	0	44 032	0	—	—
<i>Natrix natrix helvetica</i> Lacépède	0	0	0	0	30*	115	59

* Valeur non significative, comprise dans les limites d'erreur de la méthode.

Ce cas de corrélation entre la synthèse de chitinases au niveau du tube digestif et le régime alimentaire complète et confirme les observations de JEUNIAUX (1963) sur d'autres Reptiles, où la sécrétion de chitinases par l'estomac et le pancréas est évidente chez les insectivores (*Anguis fragilis*, *Uromastix acanthinurus*, *Anolis carolinensis*, *Chamaeleo vulgaris*, *Emys orbicularis*), mais nulle chez la tortue terrestre *Testudo hermanni*, exclusivement phytopophage.

Les extraits de rate et de reins, qui n'ont été étudiés que chez la couleuvre, manifestent une légère activité chitinolytique. Celle-ci est très réduite par rapport à celle observée dans le cas des extraits de muqueuses gastriques et de pancréas du lézard et de la tortue d'eau, mais elle n'est pas négligeable.

2. Batraciens (tableau II).

Les quatre espèces étudiées, qui sont insectivores, sont capables de digérer la chitine, grâce à la sécrétion de chitinases par la muqueuse gastrique et par le pancréas, comme chez les Reptiles. L'activité chitinolytique des extraits de muqueuse gastrique est particulièrement élevée chez le triton. La faible activité des extraits d'intestin de triton est probablement due à une contamination par le chyme gastrique.

TABLEAU II. Localisation et activité des chitinases chez quatre espèces de Batraciens.

Espèces	Activité : µg d'acétylglucosamine libérée × h ⁻¹ × g ⁻¹ de tissus frais					
	Muqueuse		Pancréas	Foie	Rate	Reins
	gastrique	intestinale				
<i>Rana temporaria</i> L....	14 090	0*	11 691	19*	31*	0
<i>Bufo marinus</i> L.	20 224	—	15 872	—	—	—
<i>Triturus alpestris alpestris</i> Laur	81 978	1 005*	33 382	269	—	—
<i>Salamandra salamandra taeniata</i> Boulanger	11 000	12*	19 000	15*	0	—

* Valeurs non significatives, comprises dans les limites d'erreur de la méthode.

^a Non débarrassée des strates musculaires.

3. Sélaciens (tableau III).

L'activité chitinolytique des extraits de muqueuse gastrique est nette mais faible chez les 4 espèces étudiées. La muqueuse intestinale et le pancréas sont dépourvus d'activité, mais les extraits de rate présentent, chez 2 espèces, une activité chitinolytique aussi élevée que celle de la muqueuse gastrique, surtout chez *Squalus acanthias*.

TABLEAU III. Localisation et activité des chitinases chez 4 espèces de Sélaciens.

Espèces	Activité : µg d'acétylglucosamine libérée × h ⁻¹ × g ⁻¹ de tissus frais				
	Muqueuse		Pancréas	Foie	Rate
	gastrique	intestinale ^a			
<i>Scyliorhinus canicula</i> L....	515	25*	0	—	329
<i>Squalus acanthias</i> L.	85	5*	0	—	465
<i>Raja montagui</i> Fowler ...	415	27*	34*	—	23*
<i>Raja brachyura</i> Lafont ...	460	0	4*	2*	—

* Valeurs non significatives.

^a Non débarrassée des strates musculaires.

4. *Brachypterygiens et Dipneustes* (tableau IV).

Nous avons observé une activité chitinolytique très élevée dans les extraits de muqueuse intestinale de *Polypterus ornatipinnis*, alors que cette espèce est considérée comme un prédateur de poissons (POLL, 1957).

Le Dipneuste *Protopterus aethiopicus* n'a pas d'estomac; nous n'avons pas observé d'activité chitinolytique ni au niveau du bulbe intestinal ni au niveau de l'intestin. Son régime est omnivore (BRIEN *et al.*, 1959). Seuls, les extraits de reins présentent une légère activité.

TABLEAU IV. *Localisation et activité des chitinases chez un Brachyptérygien et un Dipneuste.*

Espèces	gastrique	Activité : µg d'acétylglucosamine libérée × h ⁻¹ × g ⁻¹ de tissus frais					
		Muqueuses		Foie	Rate	Reins	
		intestinale	bulbe intestinal				
<i>Polypterus ornatipinnis</i> Blgr	35 937	—	146	24*	—	—	
<i>Protopterus aethiopicus</i> Heckel	— ^a	0	24*	0	—	98	

* Valeurs non significatives, comprises dans les limites d'erreur.

^a Poisson sans estomac différencié.

5. *Téléostéens* (tableaux V et VI).

Presque tous les Poissons Téléostéens étudiés (23 espèces appartenant à 8 ordres différents) élaborent des chitinases au niveau des tissus du système digestif. Seul un Cypriniforme : la brème, *Abramis brama*, poisson à régime omnivore à prédominance limnivore (SPILLMAN, 1961) ne synthétise pas ces enzymes.

L'examen de l'ensemble de ces résultats permet de se faire une opinion au sujet de la localisation tissulaire de la synthèse de chitinases.

CHITINASES CHEZ LES VERTÉBRÉS INFÉRIEURS

TABLEAU V. *Localisation et activité des chitinases chez les Téléostéens (Clupéiformes, Cypriniformes, Anguilliformes, Gastérostéiformes et Gadiformes).*

Ordres	Espèces	Activité : µg d'acétylglucosamine libérée × h ⁻¹ × g ⁻¹ de tissus frais					
		Muqueuses			Reins		
		gastrique	intestinale	bulbe intestinal	caca pyloriques	intestin	Foie
Clupéiformes	<i>Salmo irideus</i> Gib. <i>Tymallus tymallus</i> L. <i>Esox lucius</i> L.	16 291 3 070 4 659	— — —	— — —	141 ^a 58 ^a —	0 0 154	63 12 [*] —
Cypriniformes	<i>Carassius auratus</i> L. <i>Gardonus rutilus</i> L. <i>Cyprinus carpio</i> L. <i>Abramis brama</i> L.	— — — —	120-450 312 196 0	— — — —	— 182 95 0	511 ^a 271 69 ^b 0	255 — 385 0
Anguilliformes	<i>Anguilla anguilla</i> L.	46 520	—	—	—	0	0
Gastérostéiformes	<i>Gasterosteus aculeatus</i> L.	10 566	—	—	—	89 ^a	174
Gadiformes	<i>Gadus fuscus</i> L. <i>Gadus callarias</i> L. <i>Onco mustelus</i> L.	34 440 1 823 4 735	— — —	— — —	2 103 ^a 187 ^a 1 108 ^a	0 0 180	120 0 900

* Valeurs non significatives, comprises dans les limites d'erreur de la méthode.

^a Muqueuse non débarrassée des strates musculaires.

^b Panréas intrahépatique.

TABLEAU VI. Localisation des chitinases chez les Téléostéens (*Perciformes*, *Pleuronectiformes* et *Lophiiformes*).

Ordres	Espèces	Activité : µg d'acétylglucosamine libérée × h ⁻¹ × g ⁻¹ de tissus frais					
		Muqueuses			Foie	Rate	Reins
		gastrique	bulbe intestinal	intestinale			
Perciformes	<i>Perca fluviatilis</i> L.	14.547	—	—	414	29*	94
	<i>Blennius gattorugine</i> L. ^b	—	0	—	0	237 ^b	—
	<i>Gobius minutus</i> L. ^c	7.391	145 ^a	—	300	0	—
	<i>Pterois volitans</i> L.	1.075	—	—	67	0	—
	<i>Trigla lucerna</i> L.	3.360	—	0	0	—	—
	<i>Cottus gobio</i> L.	14.342	—	350 ^a	194 ^a	532	562
	<i>Tilapia macrochir</i> Blgr	30	—	422 ^a	120 ^a	337	—
	<i>Solea solea</i> L.	21*	—	—	155	41*	125
Pleuronectiformes	<i>Platichthys flesus</i> L.	26.668	—	—	—	—	—
	<i>Lophius piscatorius</i> L.	58	—	—	—	—	—
Lophiiformes					406	29*	148
					134	170	153
					20 ^a	48	0

* Valeurs non significatives, comprises dans les limites d'erreur de la méthode.

^a Muqueuse non débarrassée des strates musculaires.^b Pancréas intrahépatique.^c Bulbe intestinal et intestin n'ont pas été séparés.

L'estomac différencié est toujours le siège d'une importante synthèse de chitinases, sauf chez un Perciforme, *Tilapia macrochir*, chez la sole *Solea solea* et chez la baudroie *Lophius piscatorius*, où l'activité chitinolytique est faible.

Quand l'estomac n'est pas différencié (Cyprinidae et Gobiidae), le bulbe intestinal et la muqueuse intestinale sont le siège d'une synthèse de chitinases. Seul, *Blennius gattorugine* (Blenniidae) semble échapper à cette règle.

Les caeca pyloriques, quand ils existent, synthétisent des enzymes chitinolytiques; leur activité est probablement plus importante que celle qui est suggérée par les résultats des tableaux V et VI, car ces diverticules n'ont pas pu être débarrassés de leurs strates musculaires, dont le poids est plus important que celui des muqueuses.

C'est au niveau de l'intestin, du foie et de la rate que les résultats sont les plus variables. La synthèse de chitinases par l'intestin s'observe aussi bien chez des espèces sans estomac que chez des espèces à estomac différencié. L'activité chitinolytique des extraits d'intestin est toujours beaucoup plus faible que celle des extraits de muqueuse gastrique ou de caeca pyloriques. Chez 8 espèces sur les 23 espèces étudiées, nous n'avons pas observé de chitinases dans les extraits de muqueuses intestinales.

Les extraits de foie manifestent une activité chitinolytique incontestable dans 12 cas sur 22. Certes, la présence de chitinases dans cet organe pourrait être attribuée à l'activité des îlots pancréatiques, dans le cas des poissons à pancréas intrahépatique (*Cyprinus carpio* et *Blennius gattorugine*). Toutefois, les extraits de foie de certains poissons à pancréas non intrahépatique présentent également une activité chitinolytique. Chez ces espèces, le tissu hépatique proprement dit est donc capable d'élaborer des chitinases, mais nous ne savons pas dans quelle mesure ces enzymes sont sécrétées dans la lumière intestinale.

Sur 19 espèces examinées à ce point de vue, les extraits de rate de 11 espèces ont présenté une activité chitinolytique évidente, parfois relativement élevée (chez *Onos mustelus* par exemple). En ce qui concerne les reins, les extraits des 6 espèces étudiées ont également manifesté une activité chitinolytique incontestable. La question se pose de savoir dans quelle mesure l'activité chitinolytique décelée au niveau de ces organes, sans relation avec la lumière du tube digestif, est due à la présence d'authentiques chitinases ou à celle de lysozyme, enzyme dont on connaît l'activité lytique sur

la chitine et ses dérivés (BERGER & WEISER, 1958; HAMAGUCHI & FUNATSU, 1959; MAKSIMOV *et al.*, 1965). Il faut souligner toutefois que l'activité chitinolytique du lysozyme sur la chitine native, substrat utilisé dans le présent travail, est très faible : pour une même concentration en enzyme pur, l'activité du lysozyme est environ 2 000 fois plus faible que celle d'une chitinase bactérienne (JEUNIAUX, 1963). Il faudrait donc supposer, dans ce cas, que la rate et le rein contiendraient des quantités très élevées de lysozyme chez certains Poissons et pas chez d'autres. Des recherches plus poussées s'avèrent nécessaires.

CONCLUSIONS

Chez les Reptiles et les Amphibiens, il existe une étroite corrélation entre la sécrétion de chitinases par les tissus du système digestif et la nature de l'alimentation : toutes les espèces insectivores sont équipées de chitinases élaborées par l'estomac et le pancréas, tandis que les espèces phytophages en sont privées.

Cette corrélation est moins stricte chez les Poissons. Certes, la grande majorité des espèces à régime insectivore ou omnivore sont capables de synthétiser des chitinases tandis que des espèces à régime exclusivement carnivore, composé de petits poissons, en semblent incapables (exemple : *Lophius piscatorius*). Mais la situation inverse peut également être observée : l'aptitude à élaborer des chitinases est très développée chez des espèces réputées exclusivement ichtyophages (comme *Esox lucius* et *Polypterus ornatipinnis*) tandis qu'elle semble manquer totalement au moins chez un poisson incontestablement insectivore : la brème *Aramis brama* et chez un omnivore, le Dipneuste *Protopterus aethiopicus*.

Contrairement à ce que l'on pensait jusqu'ici, beaucoup de tissus présentent une activité chitinolytique. Dans de nombreux cas, tant chez les Reptiles et les Batraciens que chez les Poissons, nous avons en effet pu mettre en évidence une activité chitinolytique faible mais nette dans des extraits de foie, de rate et de rein. De nombreux tissus ou organes d'origine endodermique ou mésodermique sont donc capables de synthétiser des chitinases, mais le rôle éventuel de ces enzymes au niveau du rein et de la rate reste énigmatique. Il n'est pas exclu, toutefois, que l'activité chitinolytique ne soit due à la présence de grandes quantités de lysozyme.

En ce qui concerne le tractus digestif proprement-dit, les résultats du présent travail confirment l'idée suivant laquelle (JEUNIAUX, 1963) l'évolution de la synthèse de chitinases chez les Vertébrés se traduirait par une localisation de plus en plus poussée de cette synthèse. Chez les Poissons, la disposition primitive serait celle où la synthèse de chitinases est réalisée par toute la muqueuse du tube digestif et par le pancréas. Chez plusieurs espèces actuelles de Poissons, le siège principal de la synthèse de chitinases se localise plus ou moins nettement au niveau de l'estomac et éventuellement au niveau des caeca pyloriques. Chez les Amphibiens, les Reptiles et certains Mammifères, seuls l'estomac et le pancréas conservent l'aptitude de sécréter des chitinases, tandis que l'estomac devient le seul organe glandulaire spécialisé dans cette fonction chez d'autres Mammifères et chez les Oiseaux.

RÉSUMÉ

La distribution et la localisation de la synthèse de chitinases ont été étudiées chez trois espèces de Reptiles, quatre espèces de Batraciens et 29 espèces de Poissons. La plupart des espèces à régime alimentaire riche en chitine sont capables de sécréter des chitinases au niveau de la muqueuse gastrique, et, dans certains cas, au niveau du pancréas, des caeca pyloriques, de la muqueuse intestinale et du foie.

En général, il existe une bonne corrélation entre la nature du régime alimentaire et l'aptitude à sécréter des chitinases. Cette corrélation est moins rigoureuse chez les Poissons, où certaines espèces ichtyophages synthétisent des chitinases, tandis que certaines espèces insectivores n'en élaborent pas.

L'évolution de la synthèse des chitinases chez les Vertébrés se caractérise par la tendance à la localisation tissulaire de cette synthèse, qui, chez les Vertébrés supérieurs, est limitée à la muqueuse gastrique et au pancréas, ou à la muqueuse gastrique seule.

Chez plusieurs espèces de Poissons, les extraits de rate et de rein présentent une activité chitinolytique faible mais incontestable.

SUMMARY

The distribution and the localization of chitinase synthesis have been studied in 3 Reptiles, 4 Batrachians and 29 Fishes. Most

species with chitin-rich diet were found to be able to secrete chitinases at the level of the gastric mucosa, and, in some cases, at the level of the pancreas, the pyloric caeca, the intestinal mucosa and the liver. In many Fishes, the extracts of spleen and kidney exhibited also a low but undeniable chitinolytic activity.

As a whole, a good correlation was observed between the composition of the diet and the ability to secrete chitinases. This correlation was less clear-cut among Fishes, some ichthyophagous species being able to secrete chitinase while a few insectivorous or omnivorous species were not.

The general pattern of the evolution of chitinase synthesis among Vertebrates seems to be characterized by the tendency towards a narrower tissular localization of this synthesis from primitive Fishes, where chitinases are elaborated by the whole digestive tube, to upper Vertebrates where the gastric mucosa, and sometimes the pancreas, is the unique source of chitinolytic enzymes.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLIOT, E. & BOCQUET, J. (1967) *C. R. Soc. Biol. Filiales* **161**, 840-845.
 BERGER, L. R. & WEISER, R. S. (1958) *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 522-534.
 BRIEN, P., POLL, M. & BOUILLON, J. (1959) *Annales du Musée royal du Congo Belge*, Tervuren (Belgique), Sciences zoologiques **71**, 1.
 DANDRIFOSSE, G. (1962) *Annales Soc. roy. zool. Belg.* **92**, 199-201.
 DANDRIFOSSE, G., SCHOFFENIELS, E. & JEUNIAUX, Ch. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* **94**, 153-164.
 DE WITTE, G. F. (1942) *Batraciens et Reptiles* (Faune de Belgique) Musée Royal d'Histoires naturelles de Belgique, 123 p.
 HAMAGUCHI, K. & FUNATSU, M. (1959) *J. Biochem.* **46**, 1659-1660.
 HARTMAN, P. A., HAYS, V. W., BAKER, R. O., NEAGLE, L. H. & CATRON, D. V. (1961) *J. Anim. Sci.* **20**, 114-123.
 JEUNIAUX, Ch. (1961) *Nature (London)* **192**, 135-136.
 JEUNIAUX, Ch. (1962) *Ann. Soc. roy. zool. Belg.* **92**, 27-45.
 JEUNIAUX, Ch. (1963) *Chitine et Chitinolyse*, Masson et Cie, Paris.
 JEUNIAUX, Ch. (1965) *Bull. Soc. Chim. biol.* **47**, 2267-2278.
 JEUNIAUX, Ch. (1966) in *Methods in Enzymology* (COLOWICK, S. P. & KAPLAN, N. O.) vol. 8, pp. 644-650, Academic Press, New York.
 JEUNIAUX, Ch. (1971) in *Biochemical Evolution and the Origin of Life* (SCHOFFENIELS, E., ed.) vol. 2, pp. 304-313, North Holland Publ. Co., Amsterdam.
 MAKSIMOV, V. I., KAVERZNEVA, E. D. & DRAVCHENKO, N. A. (1965) *Biokhymia* **30**, 1007-1014.
 OKUTANI, K. & KIMATA, M. (1964) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries* **30**, 574-576.
 OKUTANI, K. & KIMATA, M. (1966) *Chem. Abstract* **64**, 3966a.
 OKUTANI, K., SAWADA, T. & KIMATA, M. (1967) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries* **33**, 952-955.
 POLL, M. (1957) *Les Genres de Poissons d'Eau douce de l'Afrique*. Publications de la Direction de l'Agriculture des Forêts et de l'Elevage, Bruxelles.
 REISSIG, J. L., STROMINGER, J. L. & LELOIR, L. F. (1955) *J. Biol. Chem.* **217**, 959-966.

SERA, H. & OKUTANI, K. (1968) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries* **34**, 920-924.
 SPILLMAN, C. J. (1961) in *Faune de France* (LECHEVALIER, P., ed.) 304 pp. Pierre André, Paris.

Ch. JEUNIAUX

Laboratoires de Morphologie, Systématique et Ecologie animales,
 Institut Ed. Van Beneden, Université de Liège
 22, Quai Van Beneden, B-4000 Liège, Belgique

G. DANDRIFOSSE

Laboratoire de Biochimie générale et comparée,
 Institut Léon Fredericq, Université de Liège
 17, Place Delcour, B-4000 Liège, Belgique