

ISSN 0240-8759

# Vie et Milieu

Vol. 35 n° 1 - Mars 1985

Périodique d'écologie - Publication trimestrielle

**VIE ET MILIEU**  
**PÉRIODIQUE D'ÉCOLOGIE GÉNÉRALE**  
LABORATOIRE ARAGO - UNIVERSITÉ P. et M. CURIE

*Vie et Milieu* publie des contributions dans les domaines de l'écologie, de la Biologie et de la Systématique dans les milieux marins, lagunaires et terrestres. Toutes les disciplines de l'Océanographie y sont représentées, y compris les aspects géologiques et physiques.

La revue est une publication trimestrielle; chaque volume annuel comprend 4 fascicules groupant 400 pages et présente des articles originaux, des communications de synthèse et des notes brèves, en Français ou en Anglais.

Les manuscrits sont reçus par le Professeur J. SOYER, Directeur de la Publication, ou par Mme N. COINEAU, Secrétaire de Rédaction (Laboratoire Arago, 66650 Banyuls-sur-Mer, France). Ils ne seront acceptés qu'après avoir été soumis à l'approbation scientifique de deux lecteurs dont les commentaires restent anonymes.

**Membres du Comité scientifique international :**

A. ANGELIER (Toulouse, France), M. BACESCO (Bucarest, R.P. Roumanie), M. BATTAGLIA (Padoue, Italie), M. BLANC (Paris, France), C.F. BOUDOURESQUE (Marseille, France), P. BOUGIS (Paris, France), C. COMBES (Perpignan, France), C. DELAMARE DEBOUTTEVILLE (Paris, France), P. DRACH (Paris, France), C. DUBOUL-RAZAVET (Perpignan, France), J. FOREST (Paris, France), R. HESSLER (La Jolla, U.S.A.), A. IVANOFF (Paris, France), W. KÜHNELT (Vienne, Autriche), M. KUNST (Prague, Tchécoslovaquie), M. LAMOTTE (Paris, France), L. LAUBIER (Paris, France), P. LUBET (Caen, France), R. MARGALEF (Barcelone, Espagne), M. PAVANS DE CECCATY (Lyon, France), J.M. PÉRÈS (Marseille, France), J. POCHON (Paris, France), P. REY (Toulouse, France), H. SAINT GIRONS (Paris, France), M. VACHON (Paris, France), E. VIVIER (Lille, France).

---

**Publié avec le concours financier du Conseil Général des Pyrénées-Orientales et du Centre National de la Recherche Scientifique**

---

**Abonnements/Subscriptions 1985**

	FRANCE	AUTRES PAYS
Un an (4 numéros) / <i>Annual subscription (4 issues)</i> .....	490 F	620 F
Adresser le paiement à l'ordre de / <i>Address payment to the order of :</i>		
<b>Vie et Milieu, Laboratoire Arago, 66650 BANYULS-SUR-MER. FRANCE</b>		
Les abonnements partent du premier numéro de l'année / <i>subscriptions begin with the first calendar year</i>		
Le fascicule 1985 :	FRANCE 120 F	ÉTRANGER 140 F
Numéros séparés de l'année, volumes antérieurs, suppléments et faunas des Pyrénées-Orientales, collections complètes, disponibles / <i>Back Issues and volumes, supplements and Faunas of Pyrénées-Orientales, complete collections, available :</i>		
<i>VIE ET MILIEU - Laboratoire Arago - F. 66650 BANYULS-SUR-MER</i>		

## VIE ET MILIEU, 1985, 35 (1)

### SOMMAIRE — SUMMARY

Recherche de l'argent chez quelques Mollusques marins, dulcicoles et terrestres. Formes chimiques et localisation histologique. <i>A survey of silver in some marine, freshwater and land molluscs. Chemical forms and histological localization.</i>	M. MARTOJA, J.M. BOUQUEGNEAU, M. TRUCHET et R. MARTOJA	1
Effets du malathion, insecticide organophosphoré, sur le Dinoflagellé marin <i>Prorocentrum micans</i> E. <i>Effects of the organophosphorus insecticide malathion on the marine Dinoflagellate Prorocentrum micans E.</i>	P. PRÉVOT et M.O. SOYER-GOBILLARD	15
Polymorphisme du rythme d'émission des Cercaires de <i>Schistosoma mansoni</i> et ses relations avec l'écologie de la transmission du parasite. <i>Polymorphism of the cercarial shedding pattern of Schistosoma mansoni and its relation with the ecology of the parasite.</i>	A. THÉRON	23
La fixation du carbone inorganique par le phytoplancton marin : données bibliographiques sur les carboxylases et le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ . <i>Inorganic carbon fixation by marine phytoplankton : bibliographical review on carboxylation enzymes and <math>^{13}\text{C}/^{12}\text{C}</math> isotopic ratio.</i>	C. DESCOLAS-GROS	33
Survival and growth of <i>Molgula socialis</i> Alder, 1863, at different temperature-salinity combinations. R. BRUNETTI, L. BEGHI, M.G. MARIN and M. BRESSAN		43
Influence de facteurs externes sur le développement gemmulaire d'une Démospone marine. <i>Influence of external factors on the gemmular development in a marine Demosponge.</i>	R. CONNES et M. GIL	49
Sur la présence d'une espèce du genre <i>Sarconema</i> (Solieriaceae, Rhodophyta) en Grèce. <i>The occurrence of a species of Sarconema (Solieriaceae, Rhodophyta) in Greece.</i>	A. DIAPOULIS, M. VERLAQUE, P. HUVE et C.F. BOUDOURESQUE	57
Analyses d'ouvrages / <i>Book reviews</i>		61

## *THIRD INTERNATIONAL CONFERENCE ON ECOLOGY AND ENVIRONMENTAL QUALITY*

*Jerusalem, Israël — June 1986*

The Israel Society for Ecology and Environmental Quality Sciences is happy to invite authors to submit papers for presentation at the Third International Conference on Ecology and Environmental Quality to be held at the Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel, in June, 1986 (Final date to be announced). The conference program will include subjects under the broad heading of Ecology and Environmental Quality including the following :

Aquatic Ecology	Environmental Chemistry and Microbiology
Desert Ecology	Environmental Education
General Ecology	Environmental Law
Urban Ecology	Stream and Lake Pollution
Water Pollution Control	Marine Pollution and Control
Water Quality and Treatment	Solid Waste Disposal and Recycling
Wastewater Treatment and Reuse	Toxic Waste Disposal
Air Pollution Monitoring and Control	Social, Political and Economic Aspects of
Environmental Health	Environmental Quality
Environmental Toxicology	

Authors are invited to submit complete papers in English, no longer than ten pages, single-spaced, including all figures and tables, no later than January 31, 1986. Final selection of the papers to be presented at the conference will be made by a panel of judges. Papers selected for presentation at the conference will also be published in the conference proceedings in book form. Proposals for poster presentations will also be considered. Papers should be typed in camera-ready copy according to the "Instructions for Authors". Authors interested in submitting papers are requested to write to the Society mentioning the title of the planned paper. By return mail, they will receive a copy of the "Instructions for Authors".

For further information please write to :

Israel Society for Ecology and Environmental Quality Sciences,  
The Hebrew University of Jerusalem, P.O. Box 1172, Jerusalem, Israel.

# RECHERCHE DE L'ARGENT CHEZ QUELQUES MOLLUSQUES MARINS, DULCICOLES ET TERRESTRES. FORMES CHIMIQUES ET LOCALISATION HISTOLOGIQUE

*A Survey of silver in some marine,  
freshwater and land molluscs.  
Chemical forms and  
histological localization*

M. MARTOJA<sup>(1)</sup>, J.M. BOUQUEGNEAU<sup>(2)</sup>, M. TRUCHET<sup>(3)</sup>  
et R. MARTOJA<sup>(3)</sup>

(1) Institut océanographique,  
195, rue Saint-Jacques, 75005 Paris, France

(2) Laboratoire d'Océanologie,  
Université de Liège, B 4000 Liège, Sart Tilman, Belgique

(3) Laboratoire d'Histophysiologie fondamentale et appliquée,  
Université P. et M. Curie, 12, rue Cuvier, 75005 Paris, France

ARGENT  
SULFURE  
MÉTALLOPROTÉINES  
CELLULES À PORES  
MOLLUSQUES

**RÉSUMÉ.** — Le stockage naturel d'argent a été étudié par méthode biochimique dans 2 espèces de Gastéropodes et par microanalyse dans 9 espèces de Gastéropodes et 2 espèces de Bivalves, choisies de manière à constituer un large échantillonnage sur le plan systématique et écologique. Les animaux analysés ont été recueillis dans des régions géographiques diverses, présumées indemnes de pollution. Une accumulation d'argent, non imputable à une altération du milieu, a été reconnue dans plusieurs espèces. Dans les tissus mous, le métal se présente sous au moins deux formes chimiques. La moins importante, du point de vue quantitatif, est vraisemblablement une métalloprotéine, l'autre est du sulfure d'argent, Ag<sub>2</sub>S. Ce dernier est inclus dans les lysosomes des « cellules excrétrices du tissu conjonctif » (« pore cells » des Gastéropodes, « brown cells » des Bivalves). Il coexiste avec le sulfure de cuivre dans les espèces à hémocyanine et avec le cadmium dans les espèces qui concentrent cet élément. Le stockage de sulfure d'argent est important dans les espèces marines, *Murex trunculus*, *M. brandaris*, *Littorina littorea*, *Pecten maximus*, faible chez les Gastéropodes terrestres, *Pomatias elegans*, *Cepaea nemoralis*, et nul chez les Gastéropodes dulcicoles, *Bithynia tentaculata*, *Valvata cristata*, *Lymnaea peregra*, *Planorbarius corneus*. Le Bivalve *Crassostrea gigas*, qui n'accumule pas d'argent dans les cellules excrétrices du tissu conjonctif, constitue une exception parmi les formes marines. La précipitation de sulfure d'argent pourrait représenter le terme du catabolisme par désulphydratation, d'une Ag-protéine naturelle dont la fonction reste à découvrir.

SILVER  
SULFIDE  
METALLOPROTEINS  
PORE CELLS  
MOLLUSCA

**ABSTRACT.** — The natural storage of silver was studied by a biochemical method in two species of gastropods, and by microanalysis in nine species of gastropods and two species of bivalves, all chosen with the goal of providing a wide range of samples, from both a systematic and an ecological point of view. These animals were collected from presumably unpolluted sites. An accumulation of silver, which was not related

to any alteration in the environment, was observed to exist in the tissues in at least two chemical forms : the less abundant form is probably an Ag-protein, whereas the other is silver sulfide. This sulfide is located in the lysosomes of excretory cells of connective tissue (pore cells in gastropods, brown cells in bivalves), together with copper sulfide in the species containing haemocyanin, and cadmium in those accumulating this metal. The storage of silver sulfide is important in marine species *Murex trunculus*, *M. Brandaris*, *Littorina littorea*, *Pecten maximus*, slight in land gastropods *Pomatias elegans*, *Cepaea nemoralis*, undetectable in freshwater gastropods *Bithynia tentaculata*, *Valvata cristata*, *Lymnaea peregra*, *Planorbium corneum*. The bivalve *Crassostrea gigas*, which does not store Ag in the brown cells, is an exception among marine species. The precipitation of silver sulfide could be the last stage in the catabolic process by desulfhydration of a natural Ag-protein, the identity and function of which remain to be discovered.

## INTRODUCTION

L'argent, qui n'est pas un constituant universel de la matière vivante, est le plus souvent considéré comme toxique. En effet, chez le Rat, il provoque les mêmes réactions de défense que le mercure et le cadmium, puisqu'il induit la synthèse de métallothionéines (Matuk, 1983) et que le sélénium possède un pouvoir antagoniste (Alexander et Aaseth, 1981). Chez les mollusques également, il peut être complexé par une protéine assez semblable aux métallothionéines de Vertébrés (Marshall et Talbot, 1979) tandis que chez certains Poissons et Crustacés, il diminue certaines activités enzymatiques (voir Calabrese *et al.*, 1977).

La toxicité de l'ion  $Ag^+$  à l'égard des larves d'oursins a été évaluée à 10 fois celle de  $Hg^{2+}$ , 20 fois celle de  $Cu^{2+}$  et 80 fois celle de  $Zn^{2+}$  (Soyer, 1963). Elle est également importante pour les larves de Crustacés (Amiard, 1976), moindre pour celles de Bivalves où elle est égale ou même inférieure à celle du mercure (Calabrese *et al.*, 1973; Martin *et al.*, 1981). Chez les adultes, les principaux effets physiologiques reconnus consistent en un accroissement de la consommation d'oxygène et de l'accumulation de cuivre. Toutefois, le plus remarquable est peut-être que *Crepidula fornicata* et *Mytilus edulis* supportent sans dommage une exposition de deux ans au nitrate d'argent et que les désordres histopathologiques s'y limitent à des dépôts d'argent sur les fibres conjonctives et les basales (Calabrese *et al.*, 1984; Nelson *et al.*, 1983; Thurberg *et al.*, 1975).

La possibilité qu'ont les Mollusques de stocker l'argent explique sans doute l'absence d'effets létaux constatés lors d'intoxications à long terme. En effet, certains d'entre eux contiennent des quantités d'argent qui, par référence aux autres groupes zoologiques, paraissent singulièrement élevées. Ainsi, le facteur de concentration, par rapport au milieu, y atteint jusqu'à  $1,8 \cdot 10^4$  en valeur globale et beaucoup plus encore dans les organes où l'argent s'accumule de façon préférentielle. Des teneurs de 60 et même 80  $\mu g/g$  (poids sec) ont été signalées dans la glande digestive d'animaux aussi éloignés sur le plan systé-

matique et écologique que les Bivalves *Ostrea sinuata* et *Chlamys opercularis*, le Gastéropode *Haliotis rufescens* et le Céphalopode *Loligo opalescens* (Anderlini, 1974; Brooks et Rumsby, 1965; Bryan, 1973; Martin et Flegal, 1975). L'importance de ces accumulations dépend très probablement de plusieurs facteurs. L'environnement exerce une influence (Anderlini, 1974; Bryan *et al.*, 1983; Flegal, 1980; Folsom et Young, 1965) qui se traduit par des variations géographiques au sein de la même espèce ou par la présence d'un radioisotope. Seuls les tissus mous, à l'exclusion de la coquille sont impliqués dans le stockage de cet argent excédentaire (Graham, 1972; Navrot *et al.*, 1974; Schwimer, 1973). D'autre part, le fait que des espèces voisines, d'origine géographique identique détiennent des quantités d'argent très différentes (Bryan, 1973) suggère l'existence d'une régulation spécifique interne. Cette hypothèse pourrait aussi rendre compte des relations différentes qui s'établissent entre l'argent et d'autres métaux. Ainsi, sa concentration est corrélée à celle du cuivre et du zinc chez *Crassostrea virginica* (Windom et Smith, 1972) et dans le foie de *Loligo opalescens* (Martin et Flegal, 1975). Il n'a pas de rapport avec le zinc mais semble se comporter comme le cuivre chez *Scrobicularia plana* (Bryan et Hummerstone, 1978; Bryan et Uysal, 1978). Enfin, il est indépendant de ce dernier chez les Prosobranches *Haliotis rufescens*, *H. tuberculata* et *Littorina littorea* (Anderlini, 1974; Bryan *et al.*, 1977; Bryan *et al.*, 1983).

Certaines données de biochimie, en particulier la faculté de réactiver des enzymes (Rapoport et Luebering, 1951; Skjeldal *et al.*, 1982) autorisent à imaginer que l'argent pourrait être un élément indispensable pour certains animaux. Selon les résultats de la chimie analytique et de la toxicologie expérimentale, les Mollusques apportent un grand nombre d'arguments à cette thèse. Or, la recherche d'un éventuel rôle métabolique de l'argent suppose l'identification des combinaisons chimiques dans lesquelles le métal est engagé et des types cellulaires où sa signification physiologique peut être établie; la seule localisation actuellement connue concerne des cellules impliquées dans l'absorption (Ballan-Dufrançais

et al., 1982). Nous avons donc entrepris l'étude du stockage naturel de l'argent, chez divers Gastéropodes et Bivalves, en appliquant conjointement les méthodes de l'histologie, de la microanalyse et, lorsque la taille des organes s'y prêtait, du fractionnement chimique.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les espèces étudiées et leur provenance géographique sont les suivantes :

### a) Gastéropodes

- *Murex trunculus* (L.), Baie de Calvi (Méditerranée)
- *Murex (Bolinus) brandaris* L., Banyuls-sur-mer (Méditerranée)
- *Littorina littorea* (L.), « bigorneau », Roscoff (Manche) et animaux du commerce
- *Valvata cristata* Müller et *Lymnaea peregra* (Müller), « limnée », Léman
- *Bithynia tentaculata* L., rivière Saône (Bourgogne)
- *Planorbis corneus* (L.), *Pomatias elegans* (Müller) et *Cepaea nemoralis* (L.), forêts de Fontainebleau et de Saint-Germain (Ile de France).

La position systématique de ces espèces et leur habitat sont rappelés dans le tableau V.

### b) Bivalves

- *Pecten maximus* L. « coquille Saint-Jacques », Roscoff (Manche) et animaux du commerce.
- *Crassostrea gigas* (Thunberg), « huître creuse », Carantec (Manche) et Bourgneuf (Atlantique). Les Huîtres provenaient de parcs, donc d'un milieu de salinité normale et stable. La taille de leur coquille était comprise entre 4 et 17 cm, ce qui correspond pour ces dernières à un âge de 5 ou 6 ans.

### Méthode biochimique

La coquille a été broyée, les tissus mous finement hachés, homogénéisés à l'ULTRA-TURRAX dans trois volumes de saccharose 0.5 M, puis centrifugés à 3 500 g pendant 1 h à 4 °C.

La teneur en Ag du surnageant (nommé Ag de la fraction soluble — Ag (FS)) a été dosée après minéralisation par 0.5 ml d'HNO<sub>3</sub> 14N/ml de surnageant pendant 12 heures.

Le culot obtenu après centrifugation des tissus mous a été divisé en deux lots minéralisés selon la

technique décrite précédemment (Bouquegneau et Martoja, 1982) qui permet de séparer le cuivre fortement lié (sulfure principalement) du cuivre faiblement lié.

Le premier lot, destiné au dosage de l'argent total (Ag (FI)), a subi 24 heures de minéralisation à la température ambiante par un mélange d'HCl 12N et HNO<sub>3</sub> 14N (2 ml/g de tissu). Le second lot, pour le dosage de l'argent faiblement lié (Ag (FL)), a été minéralisé pendant 12 heures à 80 °C par HCl 0,1 N (2 ml/g de tissu). Il faut remarquer que le choix de HCl 0,1 N, qui convient bien à la détermination des divers degrés de complexation du cuivre, n'est pas, dans le cas de l'argent, tout à fait adéquat vu la faible solubilité de AgCl<sub>2</sub> dans ces conditions. Les valeurs trouvées pour l'argent faiblement lié (Ag (FL)) de la fraction insoluble des tissus mous risquent donc d'être légèrement sous-estimées.

La teneur en Ag a été déterminée par spectrophotométrie d'absorption atomique avec flamme (Perkin Elmer 370 A).

### Histologie et microanalyse

La fixation des échantillons pour la microscopie photonique, l'analyse par émission X (microsonde CAMECA MS 46) et l'analyse par émission ionique secondaire (analyseur CAMECA SMI 300) a été effectuée par le liquide de Carnoy. Les coupes à la paraffine de 7 µm d'épaisseur ont été colorées au rouge solide-picroindigocarmin pour l'examen topographique; celles destinées à l'analyse par émission X et par émission ionique secondaire (Truchet, 1982) ont été étalées respectivement sur terphane carboné et sur or poli. Les caractères de solubilité des sels minéraux ou complexes métalliques présumés ont été déterminés par traitement des coupes à divers solvants et enzymes protéolytiques (voir chapitre résultats).

Des fragments de tortillon de *Murex brandaris* ont été fixés par le glutaraldéhyde, sans osmification ultérieure, pour examen ultrastructural et l'analyse par émission X sur coupes ultrafines (microsonde CAMECA CAMEBAX).

Les conditions d'analyse sont précisées dans les légendes des figures.

## RÉSULTATS

### I. *Murex (Bolinus) brandaris* et *Murex trunculus*

#### 1. Teneurs en argent

La concentration en argent dans les *Murex brandaris* analysés en janvier, va de 1 à 3 µg/g (poids

frais) pour l'ensemble des tissus mous et de 3,5 à 18,5 pour la masse viscérale (Tabl. I). Qu'il s'agisse de l'animal entier, du céphalopodium ou de la masse viscérale, elle présente une importante variabilité individuelle et elle n'est pas liée au poids de l'animal. Elle n'est pas non plus corrélée avec la teneur en cuivre, bien que les deux métaux soient surtout abondants dans la masse viscérale.

Tabl. I. — *Murex brandaris* : teneurs en cuivre et argent, exprimées en  $\mu\text{g/g}$  (poids frais), chez des animaux autopsiés au mois de janvier.

*Murex brandaris* : Cu and Ag concentrations ( $\mu\text{g/g}$  FW) in animals collected in January.

Poids de l'animal	Animal entier		Céphalopodium		Masse viscérale	
	Ag	Cu	Ag	Cu	Ag	Cu
5,28	1,15	78,28	0,52	5,82	4,24	430,88
7,74	3,09	58,75	0,11	2,33	18,49	350,61
11,83	1,29	88,4	0	9,41	4,35	272,54
15,96	2,41	106,39	0,36	11,76	8,69	396,76
17,02	1,40	100,78	0,10	12,14	4,00	272,14
17,35	1,08	76,32	0	11,73	3,54	220,59

Les analyses de *Murex trunculus* effectuées en octobre et décembre (Tabl. II et III) confirment la variabilité de teneurs en argent et l'absence de relation entre celles-ci et le poids du Mollusque. La variabilité affecte de la même façon l'ensemble des tissus mous ou les organes considérés isolément. Le seul fait constant est que la glande digestive est toujours l'organe le plus riche en métal. Le taux d'argent de la coquille, qui est de l'ordre de  $4,7 \mu\text{g/g}$ , apparaît, au contraire très stable et indépendant de celui des tissus mous. Enfin, la comparaison entre les analyses d'octobre et de décembre montre une chute de valeurs qui suggère l'existence d'un cycle annuel.

Tabl. II. — *Murex trunculus* : teneurs en argent total et en argent fortement lié, exprimées en  $\mu\text{g/g}$  (poids frais) dans la masse viscérale d'animaux autopsiés au mois d'octobre.

*Murex trunculus* : Total Ag, strongly bound Ag ( $\mu\text{g/g}$  FW) and percentage of strongly bound Ag in visceral mass of animals collected in October.

Poids de l'animal	Ag total	Ag fortement lié	%	
			Ag fortement lié	
2,2	28	26	93	
2,3	25	22	88	
2,9	24	18	75	
3,1	36	35	97	
4,4	22	22	100	
5,4	16	14	87	
7,1	35	34	97	
7,8	21	21	100	
8,9	36	34	94	
9,4	27	26	96	

## 2. Degré de complexation

Le degré de complexation de l'argent a été recherché chez *Murex trunculus*. Une très faible fraction de l'argent est facilement libérable par hydrolyse acide modérée, alors que l'essentiel, voire la totalité pour certains animaux, n'est extrait que par attaque à l'eau régale (Tabl. II et III). La plus grande partie de l'argent de la fraction insoluble est donc engagée dans une combinaison chimique sous une forme fortement liée (Tabl. III).

## 3. Localisation histologique de l'argent.

### Coexistence du métal avec d'autres éléments

Qu'il s'agisse de *Murex trunculus* ou de *M. brandaris*, l'argent n'a été décelé, par microanalyse X de coupes à la paraffine, que dans les cellules à pores. Des arguments développés plus loin, joints au fait que le métal de la masse viscérale est fortement lié et que la plupart des cellules à pores sont situées dans ce complexe anatomique, prouvent que l'argent

Tabl. III. — *Murex trunculus* : répartition de l'argent entre les différents complexes anatomiques de 7 animaux autopsiés en décembre (teneurs exprimées en  $\mu\text{g/g}$ , poids sec). Ag (FS) : teneur en Ag de la fraction soluble; Ag (FI) : teneur en Ag de la partie insoluble; % Ag FL : % d'Ag fortement lié de la fraction insoluble.

*Murex trunculus* : Ag concentrations ( $\mu\text{g/g}$  FW) in different « organs » of seven animals collected in December. Ag (FS) : Ag concentrations in the soluble fraction; Ag (FI) : Ag concentrations in the insoluble fraction; % Ag FL : percentage of strongly bound Ag in the insoluble fraction.

Organes	Ag	Ag	%Ag	Ag	Ag	%Ag	Ag	Ag	%Ag												
	(FS)	(FI)	FL	(FS)	(FI)	FL	(FS)	(FI)	FL												
Glande digestive	0,07	4,60	98	0,40	3,19	91	0,78	5,25	93	0,00	7,51	95	0,82	5,57	98	0,29	12,81	100	1,06	23,54	99
Rein	0,03	0,20	25	0,00	0,33	88	0,00	0,17	100	0,16	0,84	95	0,00	0,98	100	0,00	1,37	100	0,00	1,37	100
Complexe palléal	0,00	0,00		0,00	0,00		0,16	0,01	100	0,11	1,28	89	0,04	2,29	89	0,00	0,00		0,00	0,60	97
Céphalopodium	0,02	0,16	44	0,00	0,00		0,06	0,09	22	0,06	0,35	100	0,08	0,13	54	0,00	0,40	100	0,13	0,53	96
Tissus mous		1,00			1,10			0,47			2,21			1,86			2,39				5,61
Coquille		4,30			5,15			4,77			4,98			4,56			4,56				4,60
Sexe		?			♂			♂			♂			♀			♀				♀

ainsi mis en évidence correspond à la fraction fortement liée.

Dans ces cellules, l'argent coexiste avec le composé minéral majeur qui est le sulfure de cuivre (Martoja *et al.*, 1980). Les signaux argent, en spectrographie des rayons X ou en analyse ionique, sont toujours beaucoup plus faibles que ceux du cuivre (Fig. 1). Il existe même, pour la première méthode, des cellules où l'argent est indétectable alors que le cuivre l'est toujours. Ce sont également les cellules à pores qui accumulent une partie du cadmium naturel (Martoja *et al.*, 1984).

**4. Forme chimique de l'argent des cellules à pores**

L'éventualité d'une complexation de l'argent par un pigment, mélanine ou omochrome (Martoja et Truchet, 1983), est exclue, comme le prouve la persistance du métal après traitement acide des coupes. L'insensibilité du composé d'argent aux enzymes protéolytiques écarte aussi l'hypothèse d'un complexe métalloprotéique. Le composé est insoluble dans l'eau et dans l'ammoniaque. Après extraction du sulfure de cuivre par cette base, il persiste dans certaines cellules à pores des granules de couleur grise dans lesquels la microsonde électronique détecte des signaux argent aussi intenses que sur les coupes non traitées. Ces signaux argent sont accompagnés de signaux soufre supérieurs à ceux du soufre organique des cellules sans granules. Sur les

coupes préalablement privées de leur sulfure de cuivre par l'ammoniaque, le soufre et l'argent sont extraits conjointement par le cyanure de potassium, l'acide nitrique et l'acide sulfurique concentré. Après ces extractions, les granules de couleur grise disparaissent. On peut donc conclure à l'existence de sulfure d'argent,  $Ag_2S$ . Des tests similaires appliqués aux granules des cellules homologues de *Pecten maximus* (voir ci-dessous) confirment cette interprétation.

**5. Localisation intracellulaire de l'argent**

La recherche de l'argent, par microanalyse X des coupes ultrafines, montre que le métal est concentré dans les lysosomes des cellules à pores. Le contenu de ces lysosomes présente un aspect très variable, allant du semis de fins granules moyennement opaques aux électrons jusqu'aux volumineux amas d'opacité maximum et d'apparence amorphe (Fig. 2). Le cuivre, l'argent et le soufre qui leur est associé, sont situés dans les mêmes organites. Comme le suggérait l'analyse de coupes à la paraffine, l'argent n'est pas détectable dans tous les lysosomes. D'autre part, il est situé aussi bien dans les plages d'opacité moyenne que dans celles d'opacité maximum qui ne sont donc que des amas de concentration locale plus élevée.

Les intensités des signaux X de l'argent et du cuivre, mesurées sur un ensemble de lysosomes, ne font apparaître aucune corrélation  $Ag/Cu$  (Tabl. IV).

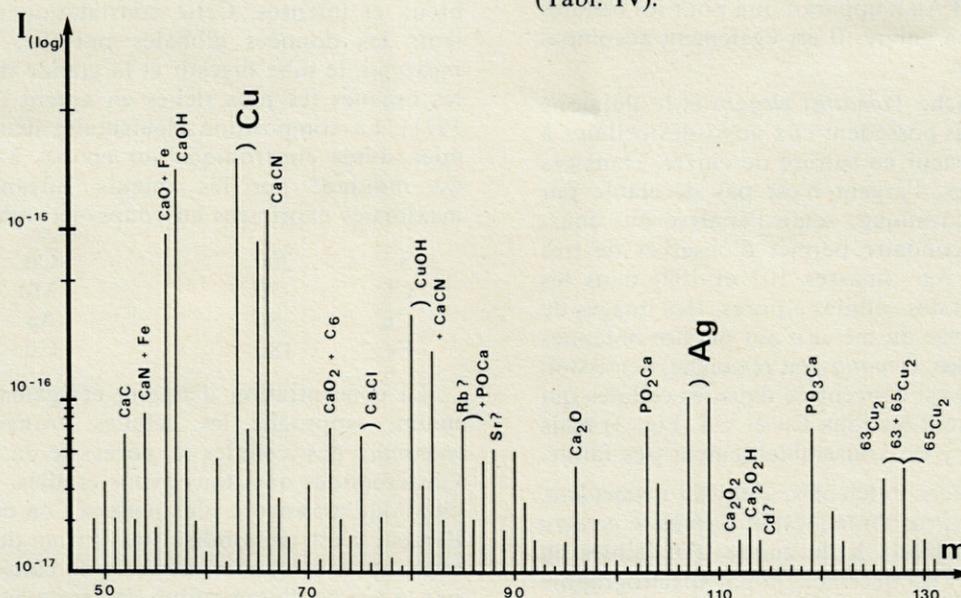


Fig. 1. — Spectre en basse résolution en masse ( $m/\Delta m = 300$ ) d'une cellule à pores de *Murex*, montrant la coexistence de Cu et Ag naturels. Conditions opératoires : bombardement,  $O^+$ ,  $7,5 \mu A$ ; diaphragme de lentille à émission,  $200 \mu m$ ; diaphragme de champ,  $600 \mu m$ . En abscisses, masses; en ordonnées, intensités en ampères.

*Low mass resolution spectrum ( $m/\Delta m = 300$ ) of a pore cell of Murex, showing the coexistence of natural Cu and Ag. Analytical conditions : primary ion beam,  $O^+$ ,  $7,5 \mu A$ ; diaphragm of the emission lens,  $200 \mu m$ ; field diaphragm,  $600 \mu m$ . X-axis, masses; Y-axis, intensities of the secondary ions in amperes.*

Tabl. IV. — *Murex brandaris* : détection du cuivre, de l'argent et du soufre, par microanalyse X de coupes ultrafines, dans onze lysosomes de cellules à pores (valeurs exprimées en nombre de coups enregistrés pendant 10 secondes). Cristaux des spectromètres : LiF pour Cu, P.E.T. pour Ag et S.

*Murex brandaris* : Intensities (in counts/10 s) of the characteristic peaks for Cu, Ag and S in eleven lysosomes of pore cells (wavelength analysis on ultrathin sections). Crystals : LiF for Cu, P.E.T. for Ag and S.

Aspect des plages analysées	Cu	Ag	S
fins granules peu opaques	3454 ± 118	47 ± 19	1253 ± 72
» »	6909 ± 167	24 ± 15	2629 ± 103
» »	7911 ± 179	73 ± 22	2882 ± 108
» »	9113 ± 192	55 ± 19	2699 ± 105
» »	12407 ± 224	58 ± 21	4741 ± 139
grains opaques parmi de fins granules peu opaques	5603 ± 150	48 ± 18	1518 ± 79
amas de grains opaques	6407 ± 161	0	1495 ± 79
» »	8261 ± 183	75 ± 21	2047 ± 92
» »	10917 ± 210	0	2862 ± 108
» »	19558 ± 280	72 ± 22	5022 ± 143
» »	23137 ± 305	0	6336 ± 161

## II. Autres Gastéropodes

L'argent n'est décelable, par microanalyse X de coupes à la paraffine, que chez le Prosobranché marin, *Littorina littorea*. Comme chez les Murex, il est localisé dans les cellules à pores (Martoja *et al.*, 1980) et le signal Ag n'apparaît que pour les cellules les plus riches en cuivre. Il est également accompagné de cadmium.

Le Prosobranché *Pomatias elegans* et le Pulmoné *Cepaea nemoralis* possèdent eux aussi des cellules à pores à haute teneur en sulfure de cuivre. Dans ces espèces terrestres, l'argent n'est pas décelable par microsonde électronique; seule l'analyse par émission ionique secondaire permet d'observer de très faibles signaux Ag<sup>+</sup> (masses 107 et 109) dans les plages contenant des cellules à pores. Des images de localisation précise du métal n'ont pu être obtenues chez *Cepaea*. Chez *Pomatias*, en revanche, l'émission ionique d'argent est concentrée dans les cellules qui émettent également les ions Cu et Cd (Fig. 3) mais le taux d'argent y est vraisemblablement très faible.

Dans les espèces dulcicoles, *Bithynia tentaculata*, *Valvata cristata* (Prosobranchés) et *Lymnaea peregra* (Pulmoné), les signaux X du cuivre sont faibles ou nuls. L'argent n'y est décelable ni par spectrographie des rayons X, ni par émission ionique secondaire.

Enfin, aucune trace d'argent n'a été détectée chez le Pulmoné « à sang rouge », *Planorbis cornutus* dont les cellules à pores accumulent non du sulfure de cuivre mais de la ferritine (Martoja *et al.*, 1982).

Les résultats relatifs aux Gastéropodes sont résumés dans le tableau V. Celui-ci appelle une remar-

que concernant le pigment respiratoire des Lymnaeïdés : un tel pigment ferait défaut selon Ghiretti et Ghiretti-Magaldi (1975) mais de l'hémocyanine a été décrite sur coupes ultrafines par Sminia (1972).

## III. Bivalves

Les cellules brunes des Bivalves (brown cells, serous cells) dont l'origine, les caractères et les fonctions présumées ont été revus en détail par Cheng (1981) entrent dans la catégorie des « cellules à carminate », comme les cellules à pores des Gastéropodes. L'identité de leur aspect ultrastructural renforce l'idée d'une homologie fonctionnelle. C'est donc dans ces cellules que nous avons recherché la présence éventuelle d'argent.

### 1. Pecten maximus

Nous avons examiné les « cellules brunes » dans les glandes péricardiques auriculaires où elles prennent naissance et entre les diverticules digestifs. L'examen ultrastructural des premières confirme un état de différenciation peu avancé : les plages à pores caractéristiques y sont déjà présentes mais le hyaloplasme est dépourvu de lysosomes (Ballan-Dufrançais et Jeantet, communication personnelle). L'analyse des cellules de la région auriculaire ne révèle aucune accumulation significative de métaux, alors que les signaux émis par les cellules situées entre les diverticules digestifs sont à la fois nombreux et intenses. Cette constatation rejoint d'ailleurs les données globales puisque, chez *Pecten maximus*, le tube digestif et la glande digestive sont les organes les plus riches en argent (Segar *et al.*, 1971). La composition élémentaire déterminée à la microsonde électronique sur coupes à la paraffine est indiquée par les valeurs suivantes (valeurs maximales exprimées en coups/seconde) :

S	200	Cu	15
Cl	70	Mo	6
Ca	80	Ag	240
Fe	180	Cd	5

La concentration d'argent, et également de cadmium, rapproche les cellules brunes de *Pecten maximus* des cellules à pores de la plupart des Gastéropodes que nous avons étudiés. L'homologie chimique est encore plus nette si l'on considère que l'argent y est immobilisé sous forme de sulfure. En effet, après extraction des sels de calcium et de fer par le citrate d'ammonium, les granules des cellules persistent et les signaux X obtenus en microsonde électronique, demeurent inchangés. Le rapport signal X de S/signal X de Ag est en moyenne de 0,822 ± 0,025 alors qu'il est de 0,787 ± 0,045 sur une poudre de Ag<sub>2</sub>S incluse en résine, coupée et analysée dans les mêmes conditions. Comme pour les deux espèces de *Murex*, le cyanure de potassium, l'acide

nitrique et l'acide sulfurique concentré extraient le sel d'argent. En revanche, l'accumulation de fer, vraisemblablement sous forme de phosphate et l'absence de stockage de sulfure de cuivre opposent *Pecten maximus* à ces Gastéropodes.

## 2. *Crassostrea gigas*

On admet que les glandes péricardiques de *Crassostrea* sont représentées par des cellules situées sur la face externe de l'oreillette (Galtsoff, 1964). Toutefois, les cellules ainsi localisées renferment déjà des inclusions naturellement colorées et leur composition chimique est la même que celle des cellules brunes dispersées entre les diverticules digestifs ou autour de la gonade. Dans tous les cas, l'élément le plus abondant et le plus caractéristique est le fer trivalent révélable par cytochimie. La composition élémentaire, déterminée dans les mêmes conditions que précédemment est indiquée par les valeurs suivantes (valeurs maximales exprimées en coups/seconde) :

P	350	Fe	800
S	110	Cu	50
Cl	30	Zn	15
Ca	30		

Le phosphate de fer est certainement le constituant majeur des inclusions de ces cellules et l'intensité des signaux cuivre est très faible. Quant à l'argent, il n'est décelable ni par sonde électronique, ni par émission ionique secondaire. Sur ce point, *Crassostrea gigas* diffère donc de toutes les autres espèces marines que nous avons étudiées. Les seules cellules contenant de l'argent naturel et du cadmium lors de contaminations (Martoja et Martin, 1985), sont les amœbocytes situés sous la paroi du tube digestif (Fig. 4).

## DISCUSSION

Dans les espèces qui accumulent le plus d'argent, la présence du métal est constante et ne peut être la conséquence d'une pollution. Le taux d'argent, pour l'ensemble des tissus mous, y est d'ailleurs inférieur à celui qui, selon Bryan *et al.* (1983), signale une contamination. D'autre part, les Murex, les Littorines et les Coquilles St Jacques provenaient de régions géographiques différentes et considérées comme non polluées. En outre, quelques échantillons de Littorines et de Coquilles St Jacques étaient destinés à la consommation et l'on peut penser que la qualité de leur milieu d'origine avait été contrôlée.

Les résultats quantitatifs obtenus chez les Murex sont comparables aux données bibliographiques. Ainsi, chez *M. brandaris* où la teneur globale moyenne en argent est de 1,7 µg/g, le facteur de

concentration, calculé sur la base 0,0001 µg/g dans l'eau de mer (Riley et Chester, 1971) est de  $1,7 \cdot 10^4$ . Ce chiffre élevé est à rapprocher des  $1,8 \cdot 10^4$  énoncés pour *Ostrea sinuata* en Nouvelle Zélande (Brooks et Rumsby, 1965) et des  $1,2 \cdot 10^4$  énoncés pour *Chlamys opercularis* en Grande Bretagne (Bryan, 1973). Si l'on considère la seule masse viscérale, la valeur moyenne de 27 µg/g obtenue en octobre pour *M. trunculus* est très proche des 30 µg/g trouvés chez un autre Prosobranchie Néogastropode, *Busycon canaliculatum* (River et Greig, cités d'après Nelson *et al.*, 1983). De la même façon, le taux moyen de 4,7 µg/g dans la coquille de *M. trunculus* est tout à fait analogue à ceux de *Patella vulgata* aux environs de Tel-Aviv ou d'*Olivella biplicata* en Californie et sa stabilité, comparée à la variabilité individuelle des tissus mous, apparaît également dans les résultats de plusieurs auteurs (Bertine et Goldberg, 1972; Graham, 1972; Navrot *et al.*, 1974; Schwimer, 1973). Quant à l'hypothèse d'un cycle annuel, suggérée par la chute des valeurs qui se produit entre octobre et décembre dans les tissus mous, elle rejoint les observations relatives aux variations saisonnières d'autres éléments-traces (Bryan, 1973). Enfin, par l'absence de corrélation entre les quantités d'argent et de cuivre accumulées, les Murex se comportent comme les autres Prosobranches, *Haliotis rufescens*, *H. tuberculata* et *Littorina littorea* (Anderlini, 1974; Bryan *et al.*, 1977; Bryan *et al.*, 1983) mais s'opposent aux Céphalopodes (Martin et Flegal, 1975) et sans doute aux Bivalves (Bryan et Hummerstone, 1978; Bryan et Uysal, 1978).

L'argent a été décelé par microanalyse dans toutes les espèces marines à l'exception de *Crassostrea vulgata*. Ce résultat négatif est d'autant plus inattendu que la capacité de cette espèce à accumuler l'argent est connue (Greig *et al.*, 1975; Windom et Smith, 1972) et que nous avons pu y localiser le cuivre sans difficulté, alors qu'il s'y trouve en très faible quantité (Pirie *et al.*, 1984). Dans le genre voisin *Ostrea*, la teneur en argent, qui peut être également très forte, surtout dans le cœur, s'accroît encore sous l'effet d'une intoxication expérimentale par le cadmium (Brooks et Rumsby, 1965, 1967). Or, la haute teneur en zinc et l'élévation de la teneur en cadmium des cœurs analysés laissent penser que ces derniers renfermaient une importante population d'amœbocytes, cellules qui, à l'inverse des cellules à pores, sont très riches en zinc (George *et al.*, 1978), contiennent de l'argent naturel et accumulent le cadmium excédentaire.

Il est donc très probable que, dans ce cas, l'argent mis en évidence par méthode chimique ne correspond pas au sulfure d'argent contenu dans les cellules à pores des autres espèces. L'argent a été décelé également chez les deux Gastéropodes terrestres mais, à la différence des espèces marines, il n'y a pas d'accumulations accessibles à la microanalyse X. Enfin, il est resté indétectable dans les espèces dulcicoles, alors que l'eau douce en est trois

fois plus riche que l'eau de mer (Chester et Riley, 1971). Il en ressort qu'il n'y a pas de relation directe entre la teneur en argent du milieu et l'accumulation naturelle opérée par l'animal. Il est, en outre, remarquable que le fait d'accumuler ou non l'argent ne soit pas superposable à la position systématique du Gastéropode, mais à son habitat (Tabl. V). Ce résultat pourrait être un exemple supplémentaire des convergences physiologiques existant entre les diverses familles de Mollusques « non-marins » (voir Russell Hunter, 1964).

Les sites histologiques de capture de l'argent, chez des animaux contaminés expérimentalement, sont différents de ceux que nous avons mis en évidence. Chez les Vertébrés et chez les Mollusques *Crepidula* et *Mytilus*, ce sont en effet les lames basales des épithéliums qui captent l'argent (Calabrese *et al.*, 1984; Nelson *et al.*, 1983), comme elles captent le cuivre en cas de pollution chez *Littorina littorea* (Martoja *et al.*, 1980). Les coordinats de l'argent sont également différents puisqu'il s'agit du sélénium chez les Mammifères (Alexander et Aaseth, 1981) et d'un ommochrome chez les Insectes (Martoja et Truchet, 1983) alors que l'argent naturel des Mollusques est lié au coordinat  $S^{2-}$ . La parution récente d'un article de Mason, Simkiss et Ryan (1984) nous impose de nous expliquer à nouveau sur le problème des sulfures. En effet, selon Mason *et al.* (op. cité, p. 717), l'existence du sulfure de cuivre dans les cellules à pores de *Littorina littorea* est improbable. Cependant, notre interprétation ne saurait être remise en cause sur la base de leurs arguments. En effet, l'osmiophilie des lysosomes est imputable aux protéines en cours de dégradation qui sont d'abord très abondantes et qui régressent peu à peu au profit du sel de cuivre (Martoja *et al.*, p. 258

et fig. 5A à D; Martoja et Thiriot-Quievreux, 1980, pl. II). Quant à la destruction rapide du ligand du cuivre par un plasma d'oxygène, elle est conforme à ce que l'on sait du pouvoir oxydant de l'oxygène, même atmosphérique, sur les sulfures de cuivre artificiels, et sur la covelline naturelle,  $Cu_4Cu_2^+(S_2)_2S_2$ . A ces deux arguments qui conduisent Mason *et al.* à imaginer un ligand organique du cuivre, nous opposons comme preuves : 1. les caractères de solubilité du sel de cuivre; 2. la raie Raman caractéristique (Martoja *et al.*, 1980); 3. la solidité de la liaison cuivre-soufre qui n'est rompue qu'en milieu acide fort (Bouquegneau et Martoja, 1982). En outre, le rapport

$$\frac{\text{signal X de S}}{\text{signal X de Cu}}$$

calculé d'après les données du Tableau IV (présent travail), comparé au même rapport calculé à partir de coupes ultrafines d'un standard de sulfure de cuivre, soit  $0,23 \pm 0,08$ , montre que ce rapport S/Cu est : 1. plus élevé (0,30 à 0,38) pour les lysosomes peu opaques aux électrons, très riches en protéines; 2. identique ou à peine supérieur (0,23 à 0,27) pour les grains opaques aux électrons que nous interprétons comme des précipités de sulfure de cuivre associé ou non à du sulfure d'argent. Nous considérons que dans le premier cas, les signaux X correspondent au soufre total, méthionine et cystéine, des protéines non encore dégradées, alors que dans le second, ils concernent le ligand  $S^{2-}$  provenant de la désulphydratation de la seule cystéine. La présence de sulfure d'argent et d'une petite quantité de protéines qui, enrobant les précipités de sulfure interfère dans l'analyse, explique que le rapport S/Cu soit légèrement supérieur à celui du standard. Rappelons enfin

Tabl. V. — Détection du cuivre et de l'argent, par microanalyse X et analyse ionique, à l'échelle structurale, dans les cellules à pores de divers Gastéropodes (les chiffres indiquent les valeurs moyennes exprimées en nombre de coups par seconde).  
*Detection of Cu and Ag, with electron microprobe and secondary in mass spectrometer, in the pore cells of several gastropod species (paraffin sections; for electron microprobe analysis, mean intensities of the characteristic peaks are indicated in counts/s).*

Espèce	Pigment respiratoire	Position systématique		Habitat	Microanalyse X		Analyse ionique
					Cu	Ag	Ag
<i>Murex trunculus</i> <i>Murex brandaris</i>	hémocyanine	Néogastropodes	marin	1200	30	+	
Prosobranches				Mésogastropodes	marin	500	10
		dulcicole	40		0	0	
		dulcicole	30	0	0		
		terrestre	300	0	+		
<i>Cepaea nemoralis</i>		Pulmonés	Stylommatophores	terrestre	500	0	+
<i>Lymnaea peregra</i>	Basommatophores		dulcicole	40	0	0	
<i>Planorbarius corneus</i>			dulcicole	0(Fe)	0	0	

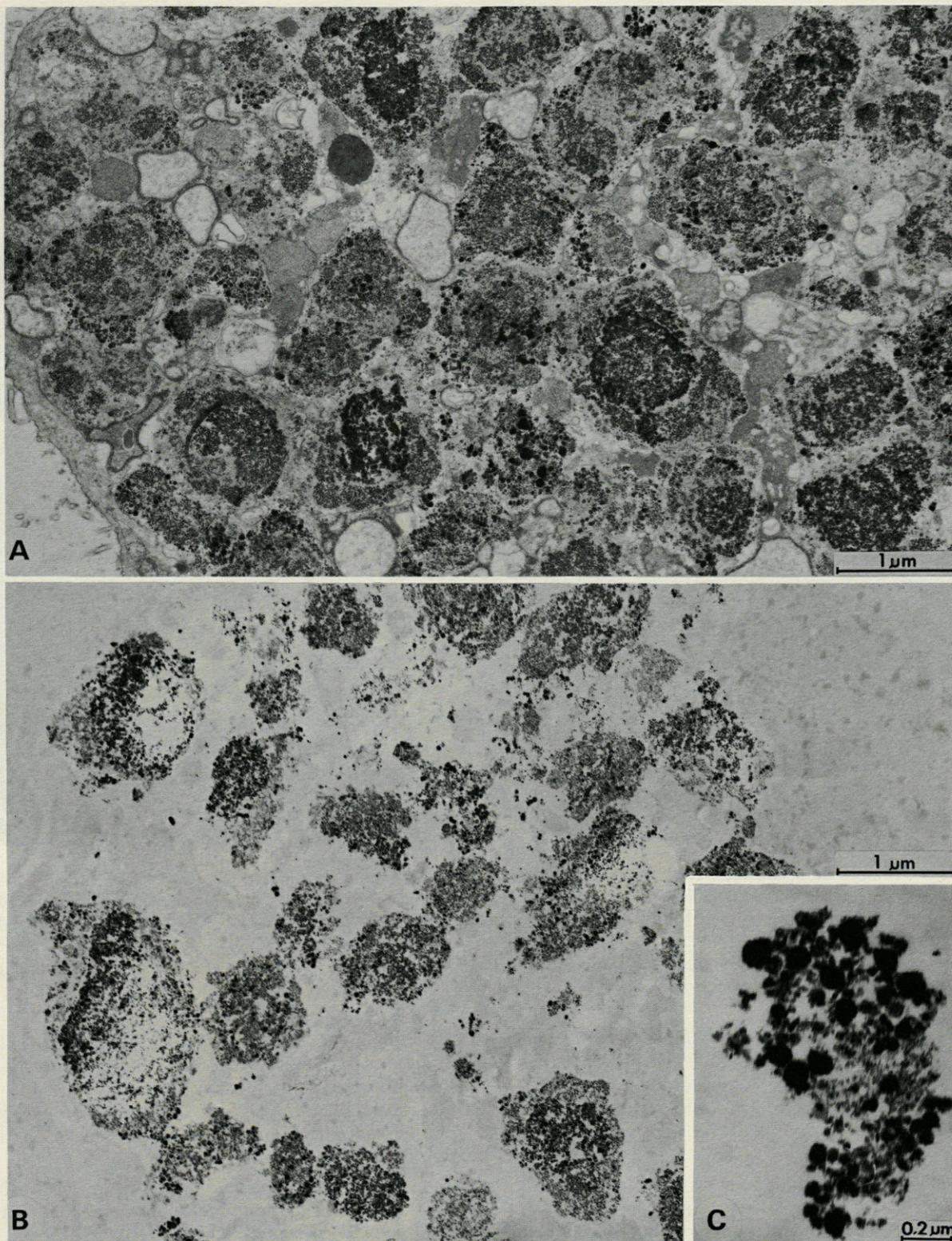


Fig. 2. — Coupes ultrafines de cellules à pores de *Murex*. A, coupe de pièce fixée au glutaraldéhyde, contrastée par l'uranyle. Noter l'abondance des lysosomes qui occupent presque tout le champ. B, coupe de pièce fixée au glutaraldéhyde et non contrastée. Noter l'opacité naturelle aux électrons du contenu des lysosomes. C, détail du contenu d'un lysosome (même technique qu'en B), montrant les précipités opaques de sulfures de Cu et Ag.

*Ultrathin sections in pore cells of Murex. A, section of a cell fixed with glutaraldehyd and stained with uranyl, showing the numerous lysosomes. B, section of a cell fixed with glutaraldehyd and unstained, showing the electron opaque content of the lysosomes. C, magnification of a lysosome (technical conditions as in B) showing the electron granules of Cu and Ag sulfides.*

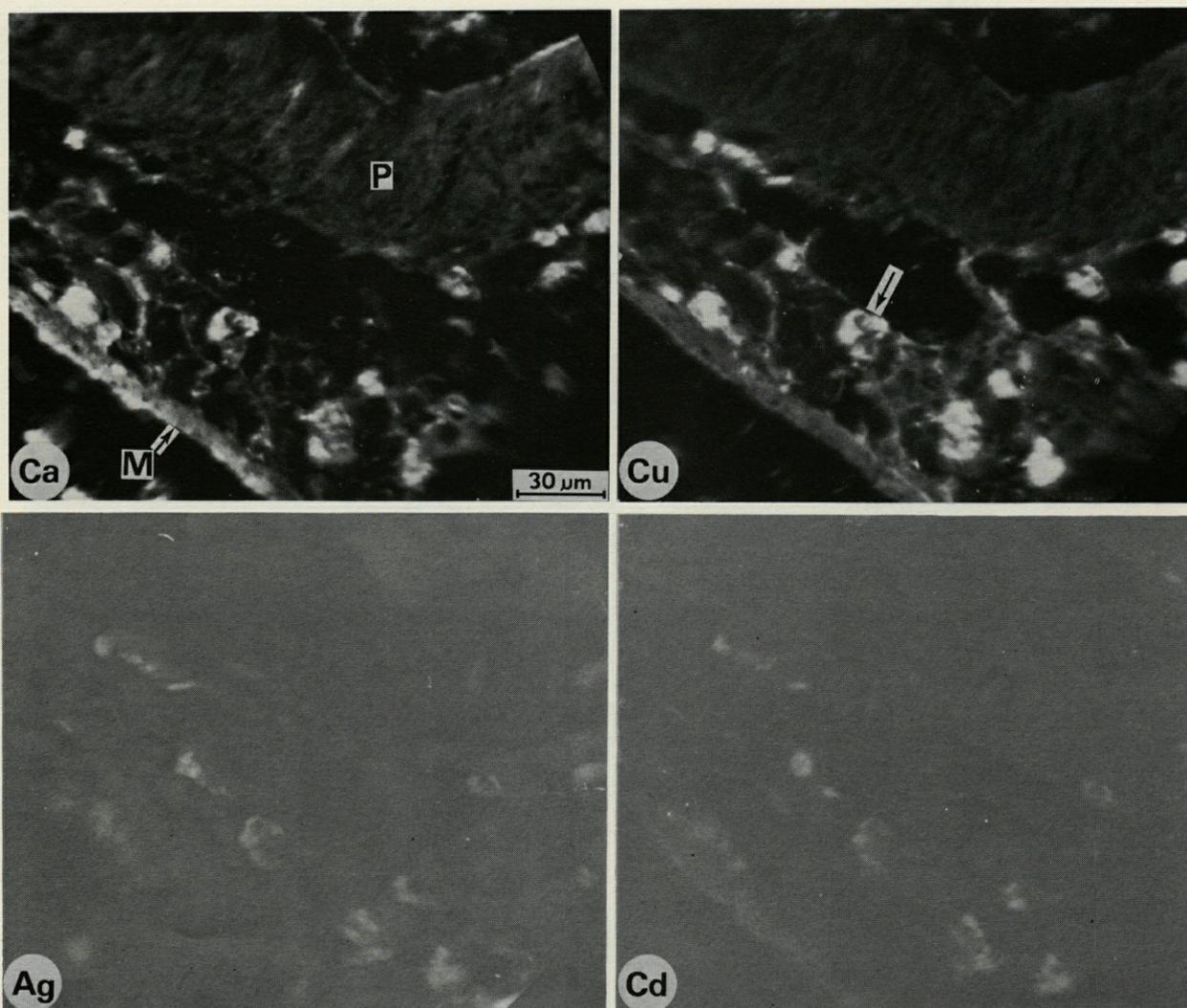


Fig. 3. — Coupes de masse viscérale de *Pomatias*. Images d'émission ionique aux masses  $40^+$  (Ca),  $63^+$  (Cu),  $109^+$  (Ag) et  $114^+$  (Cd). Noter la très forte émissivité des ions Ca et Cu des cellules à sulfure de cuivre, la plus faible émissivité des ions Ag et Cd des mêmes cellules. M, manteau; P, paroi intestinale. La flèche sur l'image Cu indique l'une des cellules à sulfures.

*Histological sections in the visceral mass of Pomatias. Distribution of  $^{40}\text{Ca}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{109}\text{Ag}$  and  $^{114}\text{Cd}$  obtained with the ion analyser. M, mantle; P, intestinal wall. The arrow indicates one of the cells containing sulfides.*

que la désulfhydratation des protéines est une voie catabolique bien connue depuis les bactéries jusqu'aux Vertébrés et que l'hémocyanine contient plus de résidus cystéine qu'il n'est nécessaire pour libérer la quantité voulue de ligand  $\text{S}^{2-}$ .

Le sulfure d'argent précipite dans des cellules dont le rôle est d'épurer le sang par pinocytose de protéines et que l'on peut regrouper sous le nom de « cellules excrétrices du tissu conjonctif » selon la terminologie de Cuénot (1899). La localisation du sulfure indique donc que le métal circule dans le milieu intérieur sous forme d'un complexe métalloprotéique, interprétation conforme aux données classiques sur l'affinité de l'argent pour les protéines. Il est probable que la métalloprotéine correspond à l'argent de la fraction soluble et à celui qui

est faiblement lié dans la fraction insoluble des tissus de *Murex trunculus*. Cependant, en raison de sa faible teneur, il ne nous a pas été possible de détecter ce métal dans des fractions chromatographiques obtenues après filtration sur gel de la fraction soluble.

Chez les Gastéropodes marins, *Murex* et *Littorines*, le catabolisme de la métalloprotéine à argent et celui de l'hémocyanine doivent être identiques, si l'on en juge par la similitude chimique des deux produits de dégradation qui supposent une désulfhydratation enzymatique des protéines avec production de  $\text{H}_2\text{S}$ . Cependant, bien que l'hémocyanine possède des sites non spécifiques de liaison avec divers métaux (Brouwer *et al.*, 1982), il est peu probable que l'argent soit transporté par le pigment

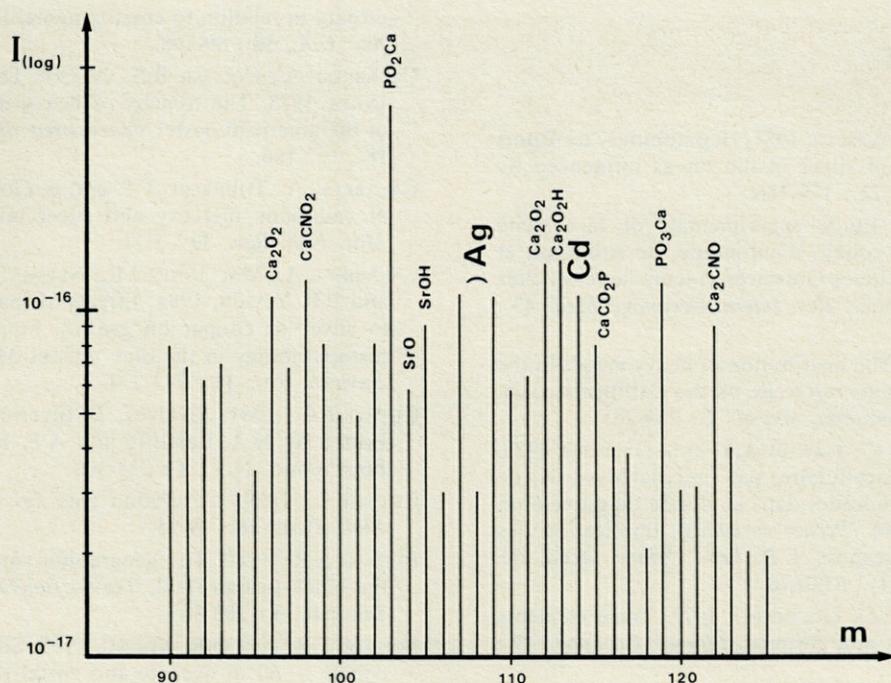


Fig. 4. — Spectre en basse résolution en masse ( $m/\Delta m = 300$ ) d'un amœbocyte d'Huître contaminée par  $\text{CdCl}_2$  montrant la coexistence de Ag naturel et de Cd exogène. Mêmes conditions opératoires que Fig. 1.

*Low mass resolution spectrum ( $m/\Delta m = 300$ ) of an amœbocyte in an oyster contaminated with  $\text{CdCl}_2$ , showing the coexistence of natural Ag and added Cd, Analytical conditions as in figure 1.*

lui-même. La précipitation de sulfure d'argent chez *Pecten maximus*, dépourvu d'hémocyanine et de sulfure de cuivre, et inversement, la précipitation de sulfure de cuivre en l'absence de sulfure d'argent dans les espèces dulcicoles, sont particulièrement démonstratives à cet égard.

Les différences entre espèces marines et terrestres que nous avons mises en évidence ne concernent que le stockage de sulfure d'argent, c'est-à-dire l'excrétion de la forme présumée métabolique du métal. Les très faibles signaux argent observés en analyse ionique, dans les espèces terrestres, ne peuvent être rapportés à une accumulation de sulfure mais ils indiquent que le métal est présent dans l'organisme. Les espèces diffèrent ainsi, non par le rôle de l'argent mais par le catabolisme des molécules qui le contiennent ou par le mode d'excrétion de celles-ci. Dans la première éventualité, on pourrait envisager que, chez les Gastéropodes terrestres qui ne fossilisent pas l'argent, l'hydrogène sulfuré provenant de la dégradation des protéines est, comme chez les Vertébrés, oxydé ou réutilisé pour la synthèse de la cystéine; l'argent n'aurait donc pas son ligand habituel. Le fait qu'ils accumulent du sulfure de cuivre en l'absence de sulfure d'argent montre que cette hypothèse ne peut être retenue. L'excrétion de l'argent par des voies différentes nous paraît donc la seule hypothèse qui puisse actuellement être retenue.

Il paraît douteux que l'argent représente, pour les Mollusques, un métal non essentiel prélevé en même temps que ceux qui le sont, puis stocké avec les déchets du métabolisme. Dans l'eau, sa concentration est inférieure à celle des éléments indispensables les plus pauvrement représentés, Se, Co, Cr, de sorte que les animaux doivent en effectuer un pompage actif. Comme pour le cadmium, présent lui-aussi à l'état d'ultra-trace et que ces animaux accumulent (Bouquegneau *et al.*, 1983; Martoja *et al.*, 1984), la question d'un rôle métabolique de l'argent doit être posée. A cet égard et ainsi que le suggéraient Brooks et Rumsby (1965), son aptitude à réactiver des enzymes que nous avons déjà mentionnée, mérite de retenir l'attention.

Les échantillons ont été préparés par H. Moysan. La microscopie électronique a été réalisée au Service commun de l'Université Pierre et Marie Curie, la microanalyse au Service commun de Microanalyse appliquée à la Biologie, C.N.R.S. et S.C. 27 I.N.S.E.R.M.

## BIBLIOGRAPHIE

- ALEXANDER J. and J. AASETH, 1981, Hepatobiliary transport and distribution of silver in the rat as influenced by selenite. *Toxicol.*, **21** : 179-186.
- AMIARD J.C., 1976. Etude expérimentale de la toxicité aiguë de sels de cobalt, d'antimoine, de strontium et d'argent chez quelques Crustacés et leurs larves et chez quelques Téléostéens. *Rev. Intern. Océanogr. Méd.*, **43** : 79-95.
- ANDERLINI V., 1974. The distribution of heavy metals in the red abalone, *Haliotis rufescens*, on the California coast. *Arch. environ. Contamin. toxicol.*, **2** : 253-265.
- BALLAN-DUFRANÇOIS C., JEANTET A.Y. et S. HALPERN, 1982. Localisation intracellulaire par microanalyse X de métaux et de métalloïdes dans la glande digestive d'un Mollusque Bivalve (*Pecten maximus*). Implication des processus de digestion. *C.R. hebdomadaire Séances Acad. Sc. Paris*, **294** (sér. III) : 673-678.
- BERTINE K.K. and E.D. GOLDBERG, 1972. Trace elements in clams, mussels and shrimps. *Limnol. Oceanogr.*, **17** : 878-884.
- BOUQUEGNEAU J.M. et M. MARTOJA, 1982. La teneur en cuivre et son degré de complexation chez quatre Gastéropodes marins. Données sur le cadmium et le zinc. *Oceanol. acta*, **5** : 219-228.
- BOUQUEGNEAU J.M., MARTOJA M. et M. TRUCHET, 1983. Localisation biochimique du cadmium chez *Murex trunculus* (L.) (Prosobranchie Néogastropode) en milieu naturel non pollué et après intoxication expérimentale. *C.R. Hebdomadaire Séances Acad. Sc., Paris*, **296** (sér. III) : 1121-1124.
- BROOKS R.R. and M.G. RUMSBY, 1965. Biogeochemistry of trace element uptake by some New Zealand bivalves. *Limnol. Oceanogr.*, **10** : 521-527.
- BROOKS R.R. and M.G. RUMSBY, 1967. Studies on the uptake of cadmium by the oyster, *Ostrea sinuata* (Lamarck). *Aust. J. mar. Freshwat. Res.*, **15** : 53-61.
- BROUWER M., BONAVENTURA C. and J. BONAVENTURA, 1982. Heavy metal ion interactions with *Callinectes sapidus* hemocyanin : structural and functional changes induced by a variety of heavy metal ions. *Biochem.*, **21** : 2529-2538.
- BRYAN G.W., 1973. The occurrence and seasonal variation of trace metals in the scallops *Pecten maximus* (L.) and *Chlamys opercularis* (L.). *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **53** : 145-166.
- BRYAN G.W. and L.G. HUMMERSTONE, 1978. Heavy metals in the burrowing bivalve *Scrobicularia plana* from contaminated and uncontaminated estuaries. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **58** : 401-419.
- BRYAN G.W., LANGSTONE W.J., HUMMERSTONE L.G., BURT G.R. and Y.B. HO, 1983. An assessment of the gastropod *Littorina littorea*, as an indicator of heavy metal contamination in United Kingdom estuaries. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **63** : 327-345.
- BRYAN G.W., POTTS G.W. and G.R. FORSTER, 1977. Heavy metals in the gastropod mollusc *Haliotis tuberculata* (L.). *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **57** : 379-390.
- BRYAN G.W. and H. UYSAL, 1978. Heavy metals in the burrowing bivalve *Scrobicularia plana* from the Tamar estuary in relation to environmental levels. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **58** : 89-108.
- CALABRESE A., COLLIER R.S., NELSON D.A. and J.R. MAC INNES, 1973. The toxicity of heavy metals to embryos of the american oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.*, **18** : 162-166.
- CALABRESE A., THURBERG F.P. and E. GOULD, 1977. Effects of cadmium, mercury and silver on marine animals. *Mar. Fish. Rev.*, **39** : 5-11.
- CALABRESE A., MAC INNES J.R., NELSON D.A., GREIG R.A. and P.P. YEVICH, 1984. Effects of long-term exposure to silver or copper on growth, bioaccumulation and histopathology in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.*, **11** : 243-274.
- CHENG T.C., 1981. Bivalves. In *Invertebrate blood cells*, Edited by N.A. Ratcliffe and A.F. Rowley, Academic Press Lond. N.Y., **1** : 233-300.
- CUENOT L., 1899. L'excrétion chez les Mollusques. *Arch. Biol., Paris*, **16** : 49-95.
- FLEGAL A.R., 1980. The geographic variation of silver in the black turban snail, *Tegula funebralis*. *Environment. Internat.*, **3** : 303-305.
- FOLSOM T.R. and D.R. YOUNG, 1965. Silver — 110 m and cobalt — 60 in oceanic and coastal organisms. *Nature*, **206** : 803-806.
- GALTSOFF P.S., 1964. The american oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fish. Bull., U.S. Fish wildl. Serv.*, **64** : 1-480.
- GEORGE S.G., PIRIE B.J.S., CHEYNE A.R., COOMBS T.L. and P.T. GRANT, 1978. Detoxication of metals by marine Bivalves : an ultrastructural study of the compartmentation of copper and zinc in the oyster *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.*, **45** : 147-156.
- GHIRETTI F. and A. GHIRETTI-MAGALDI, 1975. Respiration. In *Pulmonates*. Edited by V. Fretter and J. Peake. Academic Press Lond. N.Y., **1** : 33-52.
- GRAHAM D.L., 1972. Trace metal levels in intertidal Mollusks of California. *Veliger*, **14** : 365-372.
- GREIG R.A., NELSON B.A. and D.A. NELSON, 1975. Trace metal content in the american oyster. *Mar. Pollut. Bull.*, **6** : 72-73.
- MARSHALL A.T. and V. TALBOT, 1979. Accumulation of cadmium and lead in the gills of *Mytilus edulis*. X-ray microanalysis and chemical analysis. *Chem. Biol. Interact.*, **27** : 111-123.
- MARTIN J.H. and A.R. FLEGAL, 1975. High copper concentrations in squid livers in association with elevated levels of silver, cadmium and zinc. *Mar. Biol.*, **30** : 51-55.
- MARTIN M., OSBORN K.E., BILLIG P. and N. GLICKSTEIN, 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Mar. Pollut. Bull.*, **12** : 305-308.
- MARTOJA R. et J.L. MARTIN, 1985. Recherche des mécanismes de détoxication du cadmium par l'Huitre *Crassostrea gigas* (Mollusque, Bivalve). I. Mise en évidence d'une protéine sulfhydrilée de complexation du métal dans les améboocytes à zinc et cuivre. *C.R. hebdomadaire Séances Acad. Sc. Paris*, **300** (sér. III) : 549-554.
- MARTOJA M., QUINTANA C., JEANTET A.Y. et N. BONNET, 1982. Présence naturelle de protéines de type ferritine et hémossidérine dans le tissu conjonctif du Planorbe (Gastéropode pulmoné). *Biol. Cell*, **46** : 329-332.

- MARTOJA M., TRUCHET M. et J.M. BOUQUEGNEAU, 1984. Accumulation naturelle de cadmium chez *Murex trunculus* et *Murex brandaris* (Prosobranches néogastropodes) : localisation histologique. *C.R. Hebd. Séanc. Acad. Sc., Paris*, **298**, (sér. III) : 461-466.
- MARTOJA M., VU T.T. et B. ELKAIM, 1980. Bioaccumulation du cuivre chez *Littorina littorea* (L.) (Gastéropode prosobranché) : signification physiologique et écologique. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, **43** : 251-270.
- MARTOJA M. et C. THIRIOT-QUIEVREUX, 1980. Les cellules à sulfure cuivrique du Rissoidea, *Rissoa ventricosa*; répartition, caractères, conséquences écotoxicologiques. *Arch. Zool. exp. gén.*, **121** : 271-278.
- MARTOJA R. et M. TRUCHET, 1983. Rôle d'un omnochrome dans l'excrétion de métaux essentiels (Cu, Zn) et dans la détoxification à l'égard de contaminants métalliques (Ag, Cd) chez un Insecte (*Locusta migratoria*, Orthoptère). *C.R. Hebd. Séanc. Acad. Sc. Paris*, **297** (sér. III) : 219-224.
- MATUK Y., 1983. Distribution of radioactive silver in the subcellular fractions of various tissues of the rat and its binding to low molecular weight proteins. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **61** : 1391-1395.
- NAVROT J., AMIEL A.J. and J. KRONFELD, 1974. *Patella vulgata* : a biological monitor of costal metal pollution — a preliminary study. *Environ. Pollut.*, **7** : 303-308.
- NELSON D.A., CALABRESE A., GREIG R.A., YEVICH P.P. and S. CHANG, 1983. Long-term silver effects on the marine gastropod *Crepidula fornicata*. *Mar. Ecol., prog. ser.*, **12** : 155-165.
- PIRIE B.J.S., GEORGE S.G., LYTTON D.G. and J.D. THOMSON, 1984. Metal containing blood cells of oysters : ultrastructure histochemistry and X-ray microanalysis. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **64** : 115-123.
- RAPOPORT S. and J. LUEBERING, 1951. Glycerate-2, 3-diphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **189** : 683-694.
- RILEY J.P. and R. CHESTER, 1971. Introduction to marine chemistry. Academic Press, Lond. N.Y., **1** : 465 p.
- RUSSEL HUNTER W., 1964. Physiological aspects of ecology in non marine molluscs. In *Physiology of Molluscs*. Edited by K.M. Wilbur and C.M. Yonge. Academic Press Lond. N.Y., **1** : 83-126.
- SCHWIMMER S.R., 1973. Trace metal levels in three subtidal invertebrates. *Veliger*, **16** : 95-102.
- SEGAR D.A., COLLINS J.D. and J.P. RILEY, 1971. The distribution of the major and some minor elements in marine animals. Part II : Molluscs. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **51** : 131-136.
- SKEJELDALL, K.H. DAHL and J.S. MCKINLEY-McKEE, 1982. Reactivation of apohorse liver alcohol dehydrogenase with the monovalent metal ion Ag(I). *Biosc. Rep.*, **2** : 509-514.
- SMINIA T., 1972. Structure and function of blood and connective tissue cells of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, **130** : 497-526.
- SOYER J., 1963. Contribution à l'étude des effets biologiques du mercure et de l'argent dans l'eau de mer, *Vie et Milieu*, **14** : 1-36.
- THURBERG F.P., CABLE W.D., DAWSON M.A., MAC INNES J.R. and D.R. WENZLOFF, 1975. Respiratory response of larval, juvenile and adult surf clams, *Spisula solidissima* to silver. In *Respiration of marine organisms*. Edited by J.J. Cech, J. Bridges and D.B. Horton. TRIGOM publications. South Portland, Maine, 41-52.
- TRUCHET M., 1982. Etude de deux nouvelles méthodes d'analyse histologique : analyse élémentaire par émission ionique secondaire et analyse moléculaire par diffusion Raman; méthodologie et exemples d'application. Thèse de Doctorat d'Etat, Paris, p. 1-440.
- WINDOM H.L. and R.G. SMITH, 1972. Distribution of iron, magnesium, copper and silver in oysters along the Georgia coast. *J. Fish. res. Bd Canada*, **29** : 450-452.

Reçu le 23 novembre 1984; received November 23, 1984  
 Accepté le 28 février 1985; accepted February 28, 1985



# EFFETS DU MALATHION, INSECTICIDE ORGANOPHOSPHORÉ, SUR LE DINOFLAGELLÉ MARIN *PROROCENTRUM MICANS* E.

*Effects of the organophosphorus insecticide malathion  
on the marine dinoflagellate Prorocentrum micans E.*

Paul PRÉVOT et Marie-Odile SOYER-GOBILLARD

Département de Biologie cellulaire,  
Laboratoire Arago, UA 117 CNRS  
66650 Banyuls-sur-Mer (France)

MALATHION  
INSECTICIDE ORGANOPHOSPHORÉ  
DINOFLAGELLÉ  
*PROROCENTRUM MICANS* E.

**RÉSUMÉ.** — Les insecticides organophosphorés sont actuellement de plus en plus utilisés en agriculture et parmi eux le malathion se distingue par sa grande spécificité. Nous avons étudié son action sur un unicellulaire du phytoplancton : *Prorocentrum micans* E., Dinoflagellé marin libre et autotrophe. Le malathion est toxique pour cet organisme dès la dose de 10 ppm. Une nette diminution du taux de chlorophylle et une augmentation de la consommation en oxygène adviennent dans les cultures contaminées. Cet insecticide est concentré par les cellules de *P. micans* environ 30 fois pendant une période de 24 heures. Par ailleurs, les cellules contaminées présentent des modifications ultrastructurales telles que l'apparition de lysosomes et de nombreuses vésicules lipidiques, une vacuolisation importante et la transformation des chloroplastes qui deviennent annulaires. Il est important de noter qu'un tel insecticide peut avoir un effet toxique même à faible dose sur un organisme marin phytoplanctonique unicellulaire et chlorophyllien, et qu'il peut être concentré par ce premier maillon de la chaîne alimentaire.

MALATHION  
ORGANOPHOSPHORUS  
INSECTICIDE  
DINOFLAGELLATE  
*PROROCENTRUM MICANS* E.

**ABSTRACT.** — Organophosphorus insecticides are increasingly being used in agriculture. Malathion is distinguished by its great specificity. We have studied its action on a marine phytoplankter, the free-living Dinoflagellate *Prorocentrum micans* E. Malathion is toxic to this organism even at 10 ppm, causing a clear decrease of chlorophyll and an increase of the oxygen consumption. This pesticide is slightly concentrated by *P. micans* cells (thirty times in 24 h). Intracellular alteration, in particular formation of lysosomes, numerous lipidic vesicles and structural chloroplast modifications were observed. It is important to know that the insecticide malathion can have a toxic effect on unicellular chlorophyllous marine phytoplanktonic organisms and that it is concentrated by this first link of the trophic chain.

## INTRODUCTION

Les insecticides organophosphorés sont de plus en plus utilisés en agriculture et remplacent souvent les organochlorés parce qu'ils se dégradent plus vite et par conséquent persistent moins longtemps dans l'environnement. Cependant, les eaux de drainage et

de ruissellement peuvent entraîner ces toxiques en mer où ils peuvent être trouvés en quantités non négligeables (Wegman et Greve, 1979). Parmi les insecticides organophosphorés, le malathion se caractérise par sa grande spécificité (il est environ 10 fois moins toxique pour les Mammifères que le parathion). Il est aussi relativement soluble dans l'eau (124 ppm = 124 mg.l<sup>-1</sup>). L'intensification de

son utilisation nous a donc poussés à étudier ses effets possibles sur le milieu marin et en particulier sur le phytoplancton, premier maillon de la chaîne alimentaire. Aussi nous avons étudié sa toxicité vis-à-vis d'un Dinoflagellé marin autotrophe *Prorocentrum micans* E. qui a été choisi comme un organisme test.

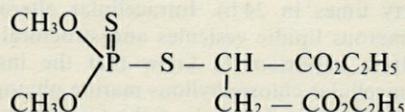
## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Organisme test et cultures

La souche de *P. micans* provient de la « Botany School » de l'Université de Cambridge. Ce Dinoflagellé est un unicellulaire marin, phytoplanctonique et participant donc à la production primaire. Il est aussi particulièrement intéressant comme organisme test à cause de sa position évolutive à la limite du règne végétal et du règne animal. Il a déjà été particulièrement étudié dans notre laboratoire (Haapala et Soyer 1973, 1974; Soyer 1977a, 1979; Prévot et Soyer 1978; Prévot 1979; Herzog et Soyer 1983; Herzog *et al.* 1984) sur le plan de sa biologie cellulaire.

Les cultures monospécifiques de *P. micans* ont été réalisées dans des Erlenmeyer de 1 l contenant 0,5 l de milieu Erdschreiber (Starr, 1964) à base d'eau de mer enrichie. La concentration initiale après le repiquage était de  $10 \times 10^3$  cellules  $\text{ml}^{-1}$ . La croissance des cultures a été suivie par comptage des prélèvements au microscope avec une cellule de Lemaire après fixation au lugol. Le malathion a été introduit au moment du repiquage ou 8 j après, c'est-à-dire au début de la phase exponentielle de croissance. Les cultures ont été suivies pendant 1 semaine. Nous avons utilisé 3 séries de cultures pour chaque concentration de l'insecticide (1,5, 6,6, 10, 20, 33, 50, 100, 200, 1 000 ppm).

### Malathion



S — (1,2 — Dicarbethoxyethyl) 0,0 — diméthyl phosphorodithioate.

Le malathion (en provenance de Riedel de Haën « analytical reference grade ») a été dilué préalablement 10 fois dans de l'acétone ou du cyclohexane avant d'être ajouté dans les cultures pour obtenir finalement des concentrations variant de 1 à 1 000 ppm.

### Mesure du taux de chlorophylle

Les cultures traitées et témoins ont été filtrées sur des filtres Whatman 0,5  $\mu\text{m}$  et le poids frais des cellules mesuré. Les filtres et les cellules ont été ensuite broyés dans de l'acétone à 100 % et la chlorophylle extraite pendant une heure à l'obscurité et à 4 °. Après centrifugation, la teneur en chlorophylle dans le surnageant a été mesurée avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer 552. Les concentrations en chlorophylle a et c<sub>2</sub> ont été calculées suivant la méthode de Jeffrey et Humphrey (1975).

$$\text{Ca (mg.l}^{-1}\text{)} = 11,43 \text{ D}_{663} - 0,64 \text{ D}_{630}$$

$$\text{Cc2 (mg.l}^{-1}\text{)} = 27,09 \text{ D}_{630} - 3,63 \text{ D}_{663}$$

### Mesure de la consommation d'oxygène par les cellules

La teneur en oxygène dans les cultures a été mesurée avec une sonde Orbisphère 2711 à haute sensibilité de détection (1 ppb). Cet appareil est constitué d'une chambre à flux, de sondes, d'un indicateur d'O<sub>2</sub> et d'un système d'enregistrement en continu. Les mesures ont été faites à l'obscurité dans des tubes en plastique de 250 ml et à une température maintenue à 18 °C par un bain thermostaté. Pour cette série d'expériences nous avons utilisé du malathion préalablement dissout dans du cyclohexane. La concentration finale dans la culture était de 20 ppm et la teneur en cyclohexane inférieure à 0,1 %. Des contrôles ont été faits avec du cyclohexane seul et avec du milieu de culture sans cellules.

### Détection et mesure du malathion dans les cellules

Le malathion a été recherché par chromatographie sur couche mince selon Bargnoux *et al.* (1977). Nous avons utilisé un gel de silice en couche fine (60 F 254; 0,25 mm — Merck) activé pendant 1 h à 150 °C, développé avec un mélange cyclohexane/acétone/chloroforme (70:25:5 v/v) et révélé par une solution aqueuse de chlorure de palladium (0,5 %). Les cellules ont été brisées par sonication, lyophilisées et dissoutes dans 2 ml de cyclohexane pour extraire le malathion. Pour les estimations quantitatives nous avons utilisé des standards de malathion dans du cyclohexane allant de 0,1 à 5  $\mu\text{g}$ .

### Microscopie électronique

Après un temps de culture donné, les cellules ont été récupérées par centrifugation (5 min. à 500 t). Les culots de centrifugation ont ensuite été fixés par un mélange glutaraldéhyde-paraformaldéhyde dans du tampon Pipes puis postfixés à l'osmium (Soyer,

1977b). L'inclusion a été faite dans de l'épon (Luft, 1973) et les coupes ultrafines (60 nm) ont été contrastées par l'acétate d'uranyle alcoolique — citrate de plomb (Reynolds, 1963) puis examinées au microscope électronique Hitachi H-600.

**RÉSULTATS**

*Action sur la croissance des cellules en culture*

Un test préliminaire a indiqué que les cellules de *P. micans* ne survivent pas à 1 500 ppm de malathion pendant 1 h. Un autre test a montré que ce pesticide affectait la motilité des cellules et leur nombre même pour une concentration aussi faible que 10 ppm (Tabl. I, A). On voit dans cette étude préliminaire que des concentrations d'acétone pouvant atteindre 2 % n'ont pas d'effet.

Tabl. I. — A, Effets de l'acétone et du malathion sur le nombre et la motilité des cellules en culture; B, variations des teneurs en chlorophylles après 6 h pour 5 et 50 ppm de malathion (teneurs pour le même poids frais de cellules).

A, effects of acetone and malathion on cell number and motility; B; chlorophyll amounts variation after 6 h for 5 and 50 ppm malathion (amounts for the same fresh weight).

A Cultures		Observations après 6 h en % par rapport aux témoins	
		motilité cellulaire	nombre de cellules
Témoins		100	100
+ Acétone	0,1 %	100	100
	1	100	100
	2	100	100
	10	20	20
+ Malathion	10 ppm	50	20
	100 ppm	20	20
	200 ppm	20	20
	1000 ppm	0	20

B Malathion		Chlorophylles totales	Teneurs en chlorophylles (% par rapport aux témoins)	
			chlorophylle a	chlorophylle c2
0 (témoins)	100	100	100	100
5 ppm	48	53	53	21
50 ppm	47	51	51	25

Dans une troisième série d'expériences, nous avons suivi la croissance des populations en culture en fonction de différentes concentrations de malathion (Fig. 1 A). On peut voir que le malathion est toxique car il diminue nettement le taux de croissance dès la dose de 10 ppm et cela même après une courte période de contamination. On remarque que par ailleurs, une dose de 1 ppm de malathion produit une légère augmentation du taux de croissance.

*Action sur la teneur en chlorophylle*

On observe une nette diminution de la teneur en chlorophylles totales après 6 h et avec 5 ppm de

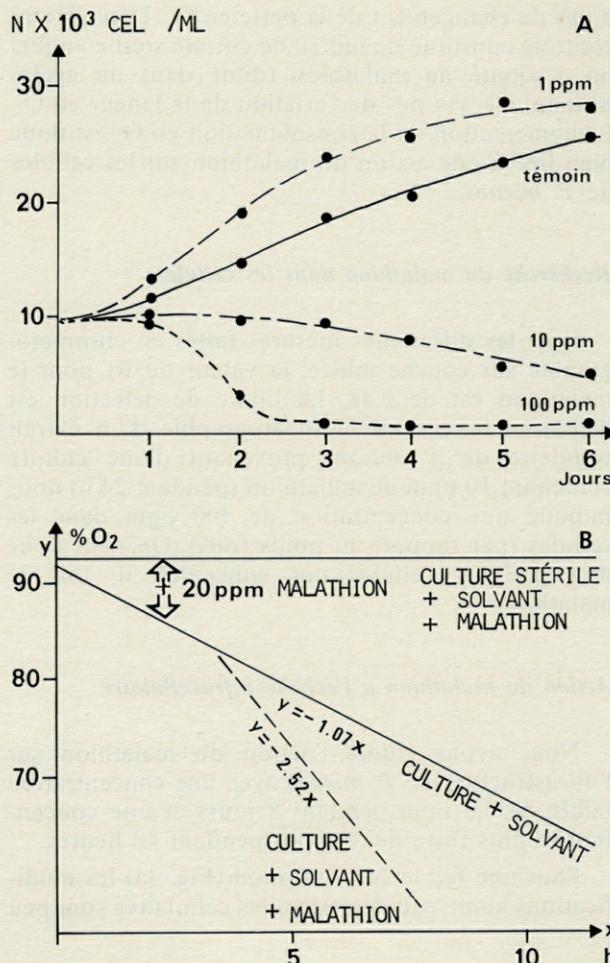


Fig. 1. — A, action du malathion à différentes concentrations sur la croissance de populations de *P. micans* en culture; B, action du malathion (20 ppm) sur la consommation en O<sub>2</sub> par les cultures de *P. micans* : la demande en O<sub>2</sub> est fortement accrue en présence du toxique.

A, the effects of different concentrations of malathion on the growth of *P. micans* in culture; B, action of 20 ppm malathion upon the O<sub>2</sub> consumption of *P. micans* in culture : the O<sub>2</sub> demand is strongly increasing in the presence of the toxic agent.

malathion (perte de 52 %). Il n'y a pas d'augmentation de la perte en chlorophylles pour 50 ppm (Tabl. I, B). On remarquera que le pourcentage de perte en chlorophylle est beaucoup plus important pour la chlorophylle c2 (- 79 %) que pour la chlorophylle a (- 47 %) et que là aussi, il n'y a pas de variation notable entre 5 ppm et 50 ppm de malathion.

*Action sur la consommation d'oxygène* (Fig. 1, B)

Quand on ajoute 20 ppm de malathion à la culture, la demande en oxygène augmente immédiatement. Dans le contrôle sans malathion mais avec le solvant (cyclohexane) à dose inférieure à 1 % il n'y

a pas de changement de la perte en  $O_2$ . Dans l'autre contrôle constitué de milieu de culture stérile auquel on a ajouté du malathion (dilué dans du cyclohexane) il n'y a pas de variation de la teneur en  $O_2$ . L'augmentation de la consommation en  $O_2$  est donc bien liée à une action du malathion sur les cellules de *P. micans*.

#### Recherche du malathion dans les cellules

Pour les différentes mesures faites en chromatographie sur couche mince, la valeur du Rf pour le malathion est de 0,48. La limite de détection est d'environ 0,5  $\mu\text{g}$ . La chromatographie d'un extrait cellulaire de *P. micans* provenant d'une culture contenant 10 ppm de malathion (pendant 24 h) nous indique une concentration de 300 ppm dans les cellules (par rapport au poids frais). On peut donc dire que les cellules ont concentré 30 fois le malathion.

#### Action du malathion à l'échelle infracellulaire

Nous avons étudié l'action du malathion sur l'ultrastructure de *P. micans* avec une concentration faible de 6,6 ppm pendant 8 jours et une concentration plus forte de 33 ppm pendant 48 heures.

Pour une faible concentration (Fig. 3a) les modifications au niveau des organites cellulaires sont peu

apparentes. On observe une vacuolisation plus marquée que chez les témoins (Fig. 2) et l'apparition de lysosomes de petite taille. Les mitochondries ne présentent pas d'altérations remarquables et les chloroplastes pas de modifications structurales si ce n'est l'apparition de plastoglobuli assez nombreux (Fig. 3a flèches). Les structures nucléaires ne sont pas modifiées par rapport aux témoins.

Pour une forte concentration (Fig. 3b et c) on observe une vacuolisation importante et des modifications structurales au niveau des chloroplastes qui prennent souvent une forme annulaire entourant des vésicules osmiophiles probablement de nature lipidique. De nombreuses vésicules osmiophiles sans relation avec les plastes sont également visibles dans le cytoplasme. Les mitochondries ne sont apparemment pas modifiées de même que les structures nucléaires.

#### DISCUSSION ET CONCLUSION

Si nous effectuons une comparaison entre nos résultats et ceux d'autres auteurs (Tabl. II) nous remarquons que *P. micans* est relativement sensible au malathion (10 ppm). Les doses toxiques annoncées pour cet organophosphoré chez différents vertébrés sont très variables suivant les organismes étudiés et les méthodes expérimentales utilisées. Les

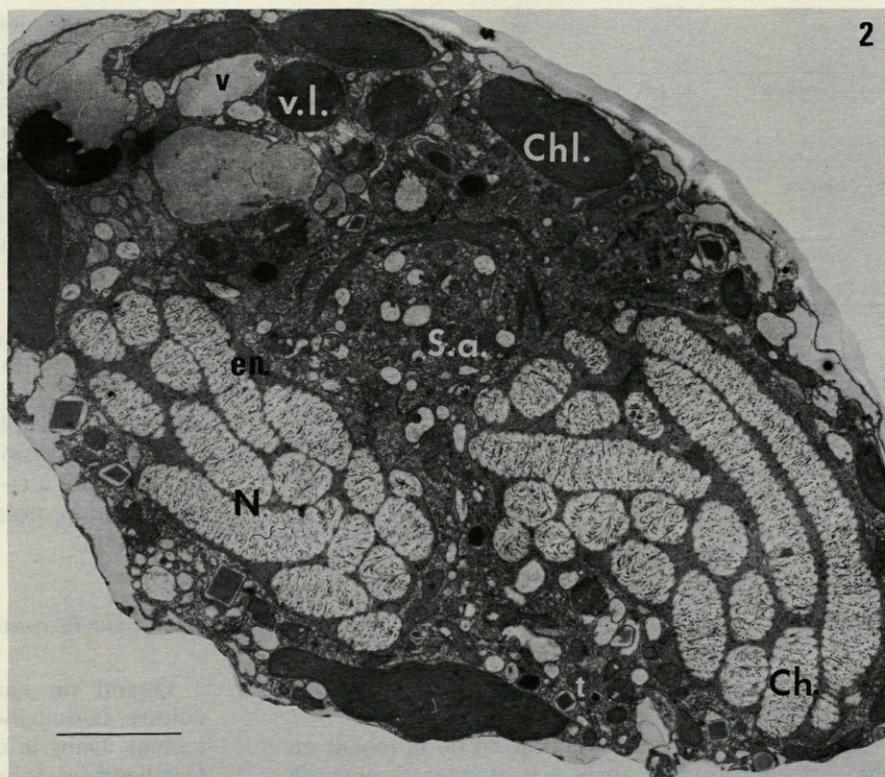


Fig. 2. — Coupe ultrafine d'une cellule de *P. micans* provenant d'une culture témoin. N. noyau, e.n. enveloppe nucléaire, Chl. chloroplaste, Vl. vacuole lipidique, v. vacuole, t. trichocyste, S.a. sphère archoplasmique. X 12 000, Barre = 2  $\mu\text{m}$ .

Ultrathin section of a *P. micans* cell from a control culture. N. nucleus, e.n. nuclear envelope, Chl. chloroplast, Vl. lipid vacuol, v. vacuol, t. trichocyst, S.a. archoplasmic sphere.  $\times 12\ 000$ . Bar = 2  $\mu\text{m}$ .

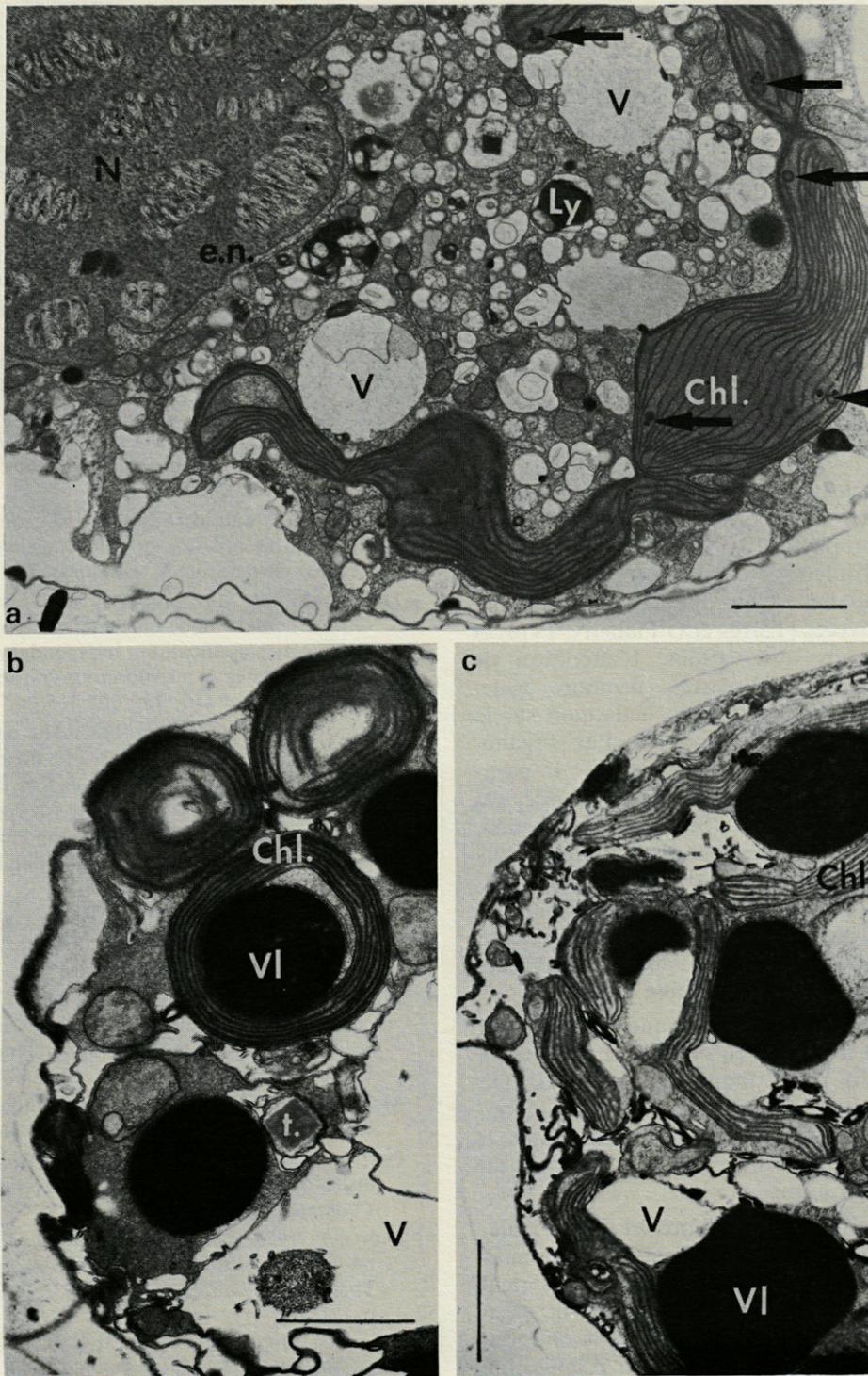


Fig. 3. — a, Coupe ultrafine d'une cellule de *P. micans* provenant d'une culture contaminée par 6,6 ppm de malathion pendant 8 jours. On observe une vacuolisation importante, la présence de lysosomes de petite taille ainsi que des plastoglobuli (flèches) dans les chloroplastes.  $\times 16\ 000$ . Barre =  $1\ \mu\text{m}$ ; c et d, coupes ultrafines de cellules de *P. micans* provenant d'une culture contaminée avec 33 ppm de malathion pendant 48 heures. Des chloroplastes annulaires entourent de nombreuses vacuoles lipidiques. La vacuolisation cellulaire est plus importante qu'avec 6,6 ppm de malathion. c  $\times 19\ 200$ ; d  $\times 17\ 500$ . Barres =  $1\ \mu\text{m}$ .

a, ultrathin section of a *P. micans* cell from a culture treated with 6.6 ppm malathion for 8 days. Vacuolisation can be observed, also the presence of small lysosomes and plastoglobuli (arrows) in the plastids.  $\times 16\ 000$ . Bar =  $1\ \mu\text{m}$ ; c and d, ultrathin sections of *P. micans* cells from a culture treated with 33 ppm malathion for 48 hours. Ring-shaped plastids surround numerous lipid droplets. Cell vacuolization is more marked with 33 ppm malathion for 48 hours than with 6.6 ppm for 8 days. c  $\times 19\ 200$ ; d  $\times 17\ 500$ . Bars =  $1\ \mu\text{m}$ .

Tabl. II. — Toxicités comparées du malathion.  
Comparative toxicities of malathion.

Organismes	Doses de malathion		Auteurs
Rat	DL50	1000 ppm	Merk Index, 1976
Rat	DL50	2500 ppm	Sutherland, 1964
Rat	DL50	1375 ppm	Eto, 1976
Souris	DL50	347 ppm	Eto, 1976
Saumon	CL50	0.1 ppm	Post et Schroeder, 1971
Truite	CL50	0.1 ppm	Edwards, 1977
<i>P. micans</i>	CL50 (48 h)	10 ppm	(ce travail)

valeurs retenues ne peuvent que donner un ordre de grandeur.

Cette sensibilité de *P. micans* se traduit par des modifications du métabolisme mises en évidence par une diminution des teneurs en chlorophylles, des altérations ultrastructurales et une augmentation de la demande en oxygène.

Le métabolisme de la photosynthèse semble être particulièrement touché; cette inhibition de la production de chlorophylles par le malathion (à partir de 1 ppm) a d'ailleurs été mise en évidence chez d'autres unicellulaires : Chlorophycées, Xanthophycées et Cyanophycées (Torrès et O'Flaherty, 1976) et concorde avec nos observations. L'altération de l'infrastructure des chloroplastes corrobore également l'hypothèse d'une action du malathion sur la photosynthèse. Cette action toxique d'un organophosphoré a par ailleurs été montrée avec le parathion sur des chloroplastes isolés d'épinards, au niveau du photosystème II (Suzuki et Uchiyama, 1977). Il est remarquable que les modifications observées au niveau des chloroplastes et en particulier la formation de plastoglobuli soient comparables à celles provoquées par le Bentazon, herbicide spécifique du photosystème II, dans les chloroplastes de radis (Meier et Lichtenthaler, 1982).

Outre l'action antiphotosynthétique du malathion sur *P. micans*, la demande en oxygène augmente en sa présence dans des cultures à l'obscurité. On retrouve aussi cette action chez *Enteromorpha intestinalis* incubé avec 100 ppm de malathion (Suteu et al., 1973). Ceci correspondrait à une modification du métabolisme respiratoire.

Un insecticide organophosphoré tel que le malathion utilisé surtout à cause de son action anticholinestérasique chez les Insectes entre autres, peut donc avoir un effet toxique marqué sur un organisme unicellulaire phototrophe comme le Dinoflagellé *P. micans* à cause de son pouvoir d'inhibition de la photosynthèse et ses effets sur le métabolisme respiratoire.

REMERCIEMENTS. Ce travail a été réalisé grâce à un contrat de recherche avec la Direction des Recherches et Etudes Techniques (DRET) de la Délégation ministérielle pour l'armement (n° 80061). Nous remercions tout particulièrement mesdames D. Saint-Hilaire, M. Albert et F. de Billy pour leur collaboration technique.

## BIBLIOGRAPHIE

- BARGNOUX H., D. PEPIN, J.L. CHABARD, F. VEDRINE, J. PETIT et J.A. BERGER, 1977. Etude chromatographique comparée de divers procédés de concentration et d'extraction de résidus de pesticides dans les eaux. *Analisis*, **5** (4) : 170-177.
- EDWARDS C.A., 1977. Nature and origin of pollution of aquatic system by pesticides. In « Pesticides in aquatic environments ». M.A.Q. Khan Ed., Plenum Press, N.Y. and London : 256 p.
- ETO M., 1976. In « Organophosphorus pesticides : organic and biological chemistry », Ed. CRC Press, Inc. : p. 387.
- HAAPALA O.K. and M.O. SOYER, 1973. Structure of Dinoflagellate chromosomes. *Nature New Biol.*, **244** (137) : 195-197.
- HAAPALA O.K. and M.O. SOYER, 1974. Absence of longitudinal differentiation of Dinoflagellate (*Prorocentrum micans*) chromosomes. *Hereditas*, **78** : 141-145.
- HERZOG M., S. von BOLETZKY and M.O. SOYER, 1984. Ultrastructural and biochemical nuclear aspects of Eukaryote classification : independant evolution of the Dinoflagellates as a sister group of the actual Eukaryotes ? *Origins of Life*, **13** : 205-215.
- HERZOG M. et M.O. SOYER, 1983. The native structure of dinoflagellate chromosomes and their stabilization by  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  cations. *Eur. J. Cell Biol.*, **30** : 33-41.
- JEFFREY S.W. and G.F. HUMPHREY, 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*<sub>1</sub> and *c*<sub>2</sub> in algae, phytoplankton and higher plants. *Bioch. Physiol. Pflanz.*, **167** : 191-194.
- LUFT J.H., 1973. Embedding media : old and new. In « Advanced techniques in biological electron-microscopy ». Springer Verlag : 1-34.
- MEIER D. and H.K. LICHTENTHALER, 1982. Special senescence stages in chloroplast ultrastructure of radish seedlings induced by the photosystem II — herbicide Bentazon. *Protoplasma*, **110** : 138-142.
- Merck Index, 9<sup>th</sup> Edition, Ed. M. Windholz, Pub. Merck & Co. Inc., 1976. Rahway, N.Y., USA.
- POST G. and T.R. SCHROEDER, 1971. The toxicity of four insecticides to four salmonid species. *Bull. Environm. Contamin. Toxicol.*, **6** (2) : 144-155.
- PRÉVOT P., 1979. Action d'un métal lourd, le cadmium, sur un Dinoflagellé marin libre, *Prorocentrum micans* E. Thèse Doct. 3<sup>e</sup> cycle, Université P. et M. Curie, Paris, p. 121.
- PRÉVOT et M.O. SOYER, 1978. Action du cadmium sur un Dinoflagellé marin libre, *Prorocentrum micans* E. Croissance et modifications cellulaires. *C.R. Hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, D*, **287** : 833-836.
- REYNOLDS S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **17** : 208-210.
- SOYER M.O., 1977a. Mise en évidence et rôle des microtubules paranucléaires chez *Prorocentrum micans* E. (Dinoflagellé libre). *C.R. Hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, **258** : 693-696.
- SOYER M.O., 1977b. Une modification de la technique de Karnovsky pour la préservation optimale des structu-

- res nucléaires chez les Dinoflagellés. *Biol. Cell.*, **30** (3) : 297-300.
- SOYER M.O., 1979. Etude ultrastructurale en cryofracture et en « freeze-etching » de *Prorocentrum micans* E., Dinoflagellé libre. *J. Protozool.*, **26**, 3 (1) : 69 A.
- STARR R.C., 1964. The culture collection of algae at Indian University. *Ann. J. Bot.*, **51** : 357-368.
- SUTEU S., A. ANDREICA, B. DIACONEASA, 1973. Citeva date asupra actiunii biologice a doua insecticide organofosforice la alga *Enteromorpha intestinalis*. *Studii Cerc. Biol. (Ser. Bot)*, **25** : 513-517.
- SUTHERLAND G.L., 1964. In « Analytical methods for pesticides and plant growth regulator » vol. 2 : Insecticides, Ed. Sherma, J. and Aweig, G., Acad. Press, N.Y. : 283-293.
- SUZUKI T. and M. UCHIYAMA, 1977. Inhibition of the photosynthetic system in spinach chloroplasts by the organophosphate insecticide parathion. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **1** : 263-269.
- TORRES A.M.R. and L.M. O'FLAHERTY, 1976. Influence of pesticides on *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Stigeoclonium* (Chlorophyceae), *Tribonema*, *Vaucheria* (Xanthophyceae) and *Oscillatoria* (Cyanophyceae). *Phycologia*, **15** (1) : 25-36.
- WEGMAN R.C.C. and P.A. GREVE, 1979. Organochlorines, cholinesterases inhibitors and aromatic amines in Dutch water samples, september 1962-december 1975. *Pestic. Monit. J.*, **12** (3) : 149-162.

Reçu le 14 décembre 1984; accepté le 28 janvier 1985.  
Received December 14, 1984; accepted January 28, 1985



# POLYMORPHISME DU RYTHME D'ÉMISSION DES CERCAIRES DE *SCHISTOSOMA MANSONI* ET SES RELATIONS AVEC L'ÉCOLOGIE DE LA TRANSMISSION DU PARASITE

*Polymorphism of the cercarial shedding pattern of Schistosoma mansoni  
and its relations with the ecology of the parasite*

André THÉRON

Département de Biologie animale  
UA 698 du CNRS, Université, avenue de Villeneuve,  
66025 Perpignan Cedex

*SCHISTOSOMA*  
CERCAIRES  
RYTHME D'ÉMISSION  
POLYMORPHISME  
ÉCOLOGIE  
TRANSMISSION

RÉSUMÉ. — L'étude comparative du rythme d'émergence des cercaires de *Schistosoma mansoni* appartenant à 9 populations prises dans le foyer guadeloupéen de schistosomose intestinale fait apparaître des différences dans le phénomène chronobiologique. En fonction de la position horaire du pic d'émergence des cercaires, trois types chronobiologiques (précoce, intermédiaire et tardif) ont été décrits. Ce polymorphisme chronobiologique des émissions cercariennes est analysé en relation avec d'une part la structure écologique des foyers d'origine des populations de schistosomes et d'autre part avec le degré de participation de l'hôte réservoir (*Rattus rattus*) dans le cycle du parasite. Les phénotypes précoces sont caractéristiques des schistosomes originaires des foyers de type urbanisé où l'Homme joue le rôle principal dans la transmission parasitaire. Les phénotypes tardifs sont fréquents dans les populations de schistosomes originaires des foyers sylvestres où la dynamique de transmission est à précellence murine. Les schistosomes à chronobiologie intermédiaire proviennent toujours des foyers de type arrière mangrove où l'Homme et le Rat sont impliqués dans la dynamique de transmission. Ces variations chronobiologiques sont considérées comme des processus adaptatifs favorisant la transmission du parasite à des hôtes différents.

*SCHISTOSOMA*  
CERCARIAE  
SHEDDING PATTERN  
POLYMORPHISM  
ECOLOGY  
TRANSMISSION

ABSTRACT. — The comparative study of the cercarial shedding rhythms of *Schistosoma mansoni* between 9 populations originating from the guadeloupean focus of intestinal schistosomiasis shows differences in the chronobiological phenomenon. Depending on the hourly position of the peak shedding three chronobiological patterns (early, intermediate and late) can be distinguished. This polymorphism of the cercarial shedding is analysed in relation to the ecological feature of each focus and to the participation of a host-reservoir animal (*Rattus rattus*) in the life cycle of the parasite. Early phenotypes are characteristic of schistosomes originating in urbanized focuses where man plays the main role in the parasite transmission. Late phenotypes are frequent in schistosome populations from sylvatic focuses where rat is the main host. Schistosomes with intermediate shedding pattern are always originating in swamp mangrove focuses where man and rat are involved in the parasite dynamics. These intraspecific variations in the chronobiology of cercariae are considered as an adaptative process favoring the transmission of the parasite to different hosts.

## INTRODUCTION

Au cours de leur cycle biologique, certains parasites mettent en jeu des processus de favorisation (Combes, 1980) visant à optimiser les chances de rencontre avec leur hôte-cible. Parmi ces processus, les phénomènes chronobiologiques occupent une place importante dans la mesure où ils contribuent à une meilleure localisation temporelle du parasite et de sa cible.

Chez les Vers Trématodes, ces phénomènes chronobiologiques concernent en particulier l'émergence des cercaires (larves libres produites par le Mollusque vecteur) dont le rythme d'émission est dans la plupart des cas étroitement corrélé aux périodes d'activité de l'hôte les plus favorables à son infestation (Combes et Théron, 1977). Selon l'espèce considérée et la nature de l'hôte impliqué dans le cycle, le pic d'émission des cercaires occupe des positions différentes dans le nyctémère. Dans le genre *Schistosoma* par exemple, les espèces parasites de l'homme telles que *S. mansoni* ou *S. haematobium* ont un pic d'émission cercarienne généralement situé à la mi-journée (Nojima et Sato, 1978); l'espèce *S. rhodaini* parasite de Rongeurs a un pic d'émergence crépusculaire (Pitchford *et al.*, 1969); pour l'espèce *S. margrebowiei* parasite d'Antilopes, le rythme d'émission est de type ultradien avec un pic matinal et un pic crépusculaire correspondant aux heures où ces animaux vont s'abreuver (Pitchford et Dutoit, 1976).

Si de nombreux auteurs ont fait état de cette variation interspécifique des rythmes d'émergence des cercaires, peu, à notre connaissance, ont abordé les problèmes touchant à la variation intraspécifique. Récemment une étude comparative du rythme d'émission des cercaires de deux populations de Schistosomes d'une même espèce (*S. mansoni*), originaires d'une même région d'endémie (le foyer guadeloupéen) nous a permis de mettre en évidence des différences chronobiologiques (Théron, 1984). Ce résultat posait dès lors le problème de l'existence d'un polymorphisme intraspécifique du rythme d'émission des cercaires. A partir du modèle *S. mansoni* en Guadeloupe où deux hôtes définitifs différents, l'Homme et le Rat, sont impliqués dans le cycle et par l'analyse comparée du rythme d'émergence des cercaires de 9 populations de Schistosomes, nous avons cherché à déterminer l'importance et les limites de cette variation intraspécifique ainsi qu'à préciser son origine et son intérêt dans l'écologie de la transmission du parasite.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Origine des populations de Schistosomes*

Notre étude a été réalisée à partir des cercaires de *S. mansoni* obtenus après infestation de *Biomphalaria glabrata* de Guadeloupe nés au laboratoire et de même origine géographique. Les Mollusques ont été infestés par des miracidiums issus d'œufs prélevés soit dans les selles de malades bilharziens, soit dans les fèces de Rats (*Rattus rattus*) capturés dans les sites de transmission. Les analyses effectuées concernent donc des cercaires issues d'un seul passage expérimental sur Mollusque.

La chronobiologie des émissions cercariennes a été étudiée pour 9 populations de Schistosomes, représentatives des différents sites de transmission (Théron, 1982) existant en Guadeloupe (Fig. 1, Tabl. I A) : sites en milieu courant de type urbanisé; sites en milieu stagnant de type marécage d'arrière mangrove; sites en milieu stagnant de type sylvestre.

### *Chronobiologie des émissions cercariennes*

Pour chaque population de Schistosomes, le rythme d'émission des cercaires a été analysé sur 10 Mollusques pris individuellement soit pendant 2 jours, soit pendant 3 jours. Pour 3 populations (5, 6 et 9), les expériences ont été répétées à 1 an d'intervalle. Pour un total de 120 Mollusques, 245 rythmes journaliers d'émission ont été étudiés pour les conditions expérimentales suivantes : fractionnement horaire sur 24 heures des émissions, réalisé automatiquement par un chronocercariomètre (Théron, 1982); température constante de l'eau à 25 °C; nourriture *ad libitum* des Mollusques avec de la laitue; photopériode équilibrée LD : 12-12, photophase 6 h — 18 h (2 000 lux) avec éclairage progressif à partir de 6 h, dégressif à partir de 18 h; comptage exhaustif des cercaires après filtration sur tissu polyamide (20 µm) et coloration au Lugol.

### *Présentation des résultats*

Compte tenu du nombre important de données et pour une présentation plus condensée des résultats, 2 paramètres ont été retenus pour caractériser chaque rythme journalier d'émission : la position horaire du pic d'émergence (P) et la position horaire de la demi-émission (E/2) c'est-à-dire l'heure à partir de laquelle 50 % de la production journalière sont émis par le Mollusque. Le diagramme de dispersion de E/2 sur P permet d'apprécier la variation intrapopulationnelle. L'histogramme des émissions horaires moyennes exprimées en % de la

production journalière reflète le profil d'émission du cours du nyctémère.

## RÉSULTATS

### 1. *Etendue et limites de la variation chronobiologique* (Fig. 2 A)

Si l'on considère l'ensemble des données, à savoir les 245 rythmes journaliers d'émission obtenus pour 9 populations différentes de Schistosomes, nous constatons une importante variation du rythme d'émission des cercaires de l'espèce *S. mansoni*. Pour des conditions expérimentales identiques, les pics individuels d'émergence se répartissent sur une durée de 9 h. Le pic le plus précoce est situé à 10 h, soit 4 h après le début de l'éclairement; le pic le plus tardif est situé à 19 h soit 1 h après le début de l'obscurité. Tous les rythmes analysés sont du type circadien.

### 2. *Types chronobiologiques et populations de Schistosomes* (Fig. 2 B)

Si l'on considère maintenant la distribution des données chronobiologiques et leurs limites de répartition en fonction des différentes populations étudiées, nous constatons le regroupement des populations selon 3 types chronobiologiques que nous qualifierons de précoce, d'intermédiaire et de tardif. Ces groupes apparaissent distinctement sur la figure 2 B où sont reportés les barycentres pour chaque population (les coordonnées représentent pour les x (P) : la moyenne des horaires des pics individuels d'émergence et pour les y (E/2) : la moyenne des horaires des demi-émissions individuelles).

#### a) *Chronobiologie de type précoce*

Ce type chronobiologique concerne les populations 1, 2 et 3 dont l'horaire moyen des pics d'émergence individuels est respectivement situé à 11 h 38, 11 h 40 et 11 h 18 (Fig. 2 B). Pour ces 3 populations, la variation individuelle s'étend sur 4 h, entre 10 h et 14 h; 54 % des rythmes ont un pic à 11 h, 36 % ont un pic à 12 h (Fig. 3).

Les histogrammes des émissions horaires moyennes (Fig. 4) montrent que l'émission des cercaires débute entre 7 et 8 h le matin, augmente rapidement jusqu'au maximum et diminue tout aussi rapidement pour cesser aux alentours de 17 h.

#### b) *Chronobiologie de type tardif*

Ce groupe concerne les populations n° 8, 9 a, et 9 b dont les horaires moyens des pics individuels

d'émergence sont respectivement à 16 h, 16 h 15 et 16 h 21 (Fig. 2 B). La variation dans la position des pics est de 5 h entre 14 h et 19 h (Fig. 3); 37 % des rythmes ont un pic à 16 h et 27 % à 17 h.

Les histogrammes des émissions horaires (Fig. 4) montrent que l'émergence des cercaires est plus étalée que dans le cas du type précoce. Les émissions débutent dès 6 h le matin, restent faibles jusqu'à 13 h, augmentent rapidement jusqu'au maximum et cessent aux environs de 22 h.

#### c) *Chronobiologie de type intermédiaire*

Ce type chronobiologique concerne les populations n° 4, 5 a, 5 b, 6 a, 6 b et 7 dont la position moyenne des pics individuels est respectivement à 13 h 30, 13 h 45, 13 h 20, 13 h 38, 14 h 36 et 13 h 48 (Fig. 2 B). La variation des pics à l'intérieur de ce groupe est de 5 h entre 11 h et 16 h; avec 26 % des pics à 13 h, 28 % à 14 h et 26 % à 15 h (Fig. 3).

Les histogrammes d'émissions horaires moyennes (Fig. 4) montrent des profils d'émergence étalés avec début d'émission entre 6 h et 7 h et fin d'émission aux environs de 20 h.

### 3. *Types chronobiologiques et écologie de la transmission du parasite*

Les enquêtes épidémiologiques et écologiques réalisées en Guadeloupe sur la schistosome intestinale (Combes *et al.*, 1975; Théron *et al.*, 1978; Pointier et Théron, 1979; Rioux *et al.*, 1977) ont révélé des dynamiques de transmission parasitaire différentes suivant les foyers considérés. Cette variation dans la dynamique de transmission est liée à 2 facteurs principaux qui sont : l'intervention de 2 hôtes définitifs, l'Homme et le Rat (*R. rattus*) dans le cycle du parasite et l'existence sur une faible superficie de sites de transmission écologiquement variés.

En tenant compte de ces deux originalités, nous avons recherché s'il existait une corrélation entre d'une part les types chronobiologiques précédemment définis pour les populations de Schistosomes étudiés et d'autre part les modalités de la dynamique de transmission de ces Schistosomes dans leur foyer d'origine.

a) Les populations de Schistosomes à chronobiologie de type précoce (populations n° 1, 2 et 3) ont toutes été obtenues à partir d'œufs prélevés dans les selles d'origine humaine fournies par des malades habitant dans des foyers de type urbanisé (communes de Marigot, S<sup>te</sup> Rose et Lamentin) dont les sites de transmission sont en eau courante (canaux d'irrigation ou ravines). Dans ces foyers, la dynamique de transmission est à précellence humaine avec forte prévalence d'infestation de la population humaine et des mollusques. Le Rat faiblement

Tabl. I. — A, origine et caractéristiques des différentes populations de *S. mansoni* du foyer guadeloupéen, utilisées pour l'étude chronobiologique des cercaires; B, corrélation entre les phénotypes chronobiologiques des cercaires de *S. mansoni* et le contexte éco-épidémiologique des différents foyers d'origine des populations de Schistosomes.

*A, origin and characteristics of the S. mansoni populations from the guadeloupean focus used for the chronobiological study of the cercarial emergence; B, correlation between the cercarial shedding patterns of S. mansoni and the eco-epidemiological feature of foci from the different populations of Schistosomes.*

A						
Populations N°	Code laboratoire	Localités	Type de foyer	Origine des oeufs	Année d'extraction	
1	Gh 1	Marigot	urbanisé	humaine	1981	
2	Gh 2	Ste Rose	urbanisé	humaine	1983	
3	Gh 3	Lamentin	urbanisé	humaine	1983	
4	Gm 30	Roujol	mangrove	murine	1982	
5	a Gm 50	Dubelloy	mangrove	murine	1982	
	b Gm 51				1983	
6	a Gm 60	Blain	mangrove	murine	1982	
	b Gm 61				1983	
7	Gm 80	Labithie	mangrove	murine	1983	
8	Gm 70	Raizet	mangrove	murine	1983	
9	a Gm 10	Grand	sylvestre	murine	1981	
	b Gm 40	Etang			1982	

B			
	Phénotypes chronobiologiques		
	Précoce	Intermédiaire	Tardif
	Pic moyen : 11 h - 12 h	Pic entre 13 h et 15 h	Pic moyen : 16 h
Dynamique parasitaire	Précurrence humaine	Humaine et murine	Précurrence murine
Foyer	Type urbanisé	Type marécage de mangrove	Type sylvestre et mangrove
Sites	Courant	Stagnant	Stagnant

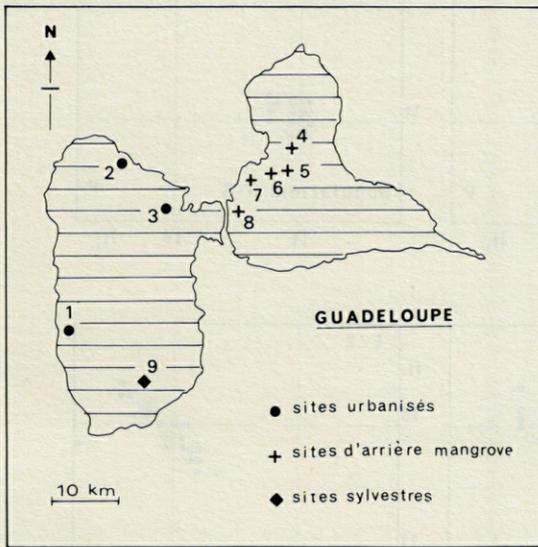


Fig. 1. — Localisation dans le foyer guadeloupéen des populations de *S. mansoni* et caractérisation de leurs sites de transmission.

Localization in the guadeloupean focus of *S. mansoni* populations and characteristics of their transmission sites.

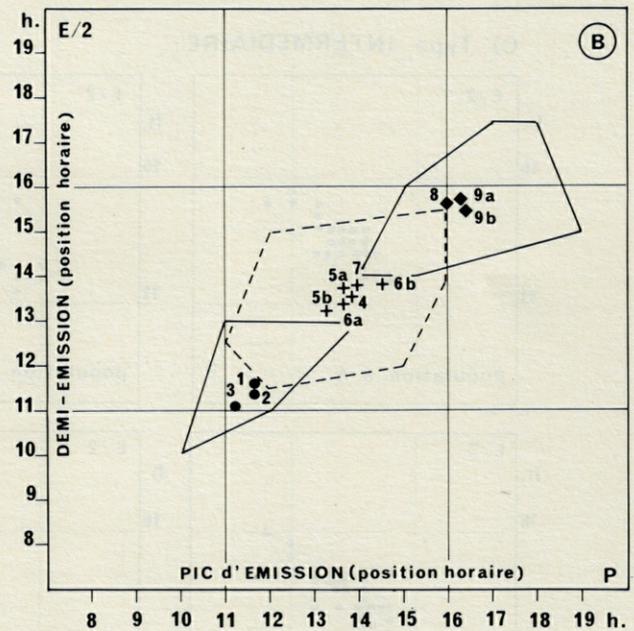
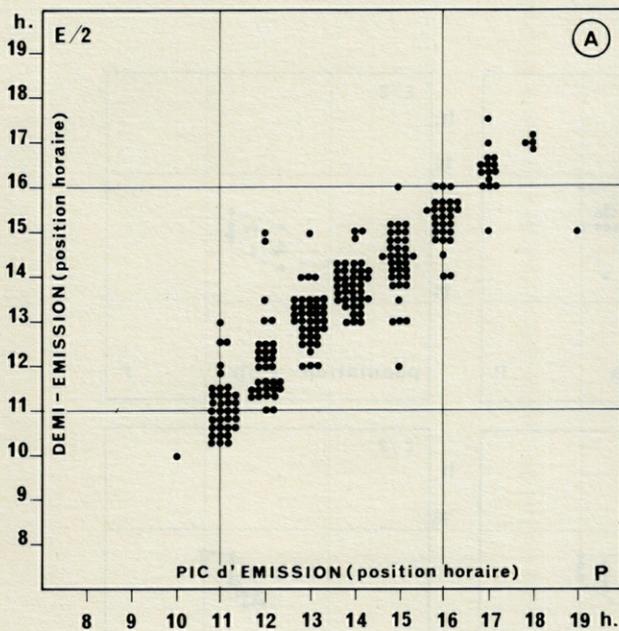


Fig. 2. — A, Variation intraspécifique du rythme d'émergence des cercaires de *S. mansoni* pour l'ensemble des 9 populations du foyer guadeloupéen; P = position horaire des pics d'émergence; E/2 = position horaire de la demi-émission cercarienne; B, Variation interpopulationnelle des rythmes d'émission des cercaires de *S. mansoni* en Guadeloupe; (●) chronobiologie de type précoce (schistosomes des foyers urbanisés); (+) chronobiologie de type intermédiaire (schistosomes des foyers de mangrove); (◆) chronobiologie de type tardif (schistosomes des foyers sylvestres et de mangrove).

A, Intraspecific variation of the shedding patterns of *S. mansoni* cercariae for the 9 populations studied in Guadeloupe: P = hourly position of the peak emergence; E/2 = half emission time in the nycthemere; B, interpopulational variation of the shedding patterns of *S. mansoni* cercariae from Guadeloupe; (●) early shedding pattern (schistosomes from urbanized foci); (+) intermediate shedding pattern (schistosomes from mangrove foci); (◆) late shedding pattern (schistosomes from sylvatic and mangrove foci).

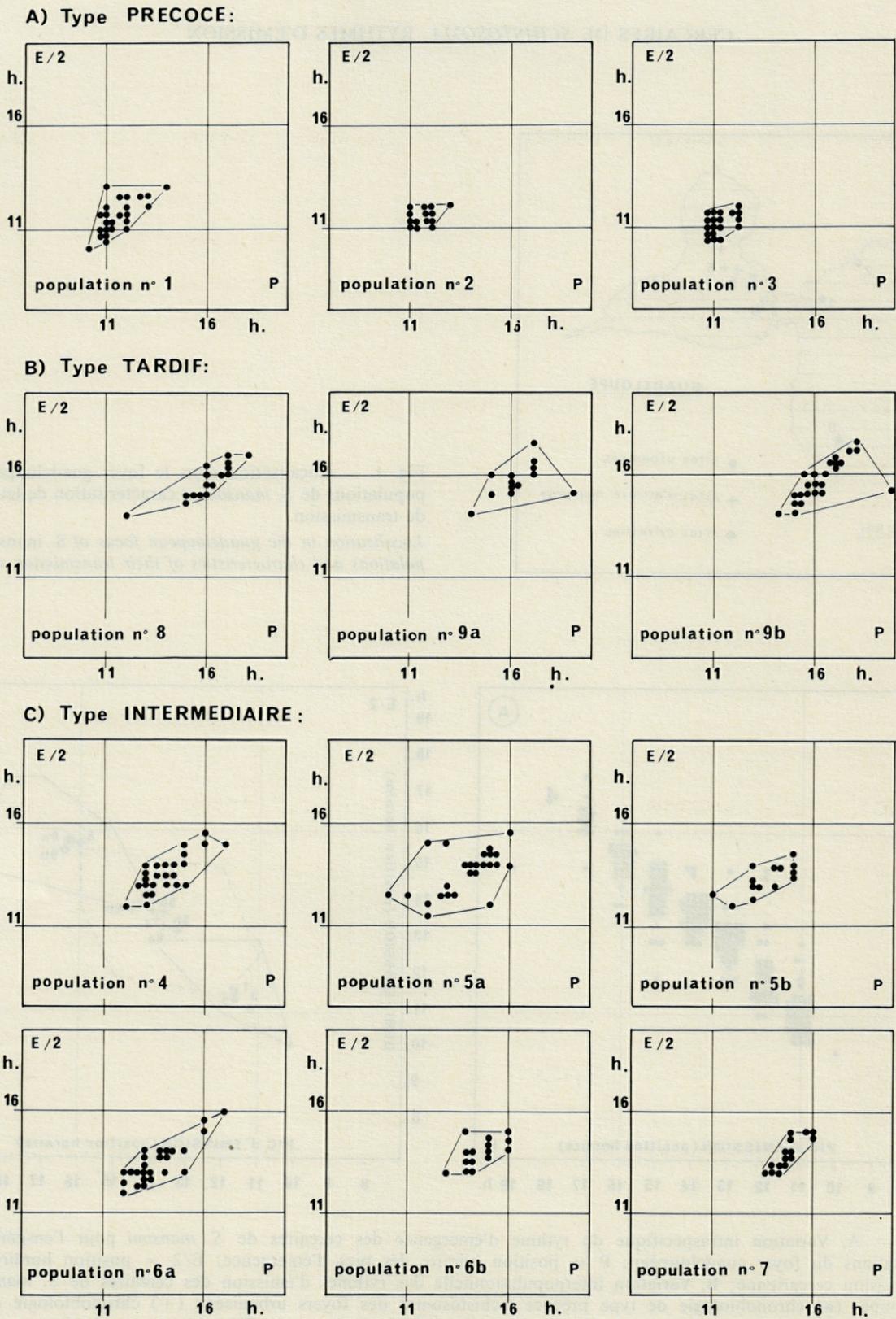


Fig. 3. — Variation intrapopulationnelle du rythme d'émission des cercaires de *S. mansoni*.

A — pour les populations à chronobiologie de type précoce,

B — pour les populations à chronobiologie de type tardif,

C — pour les populations à chronobiologie de type intermédiaire.

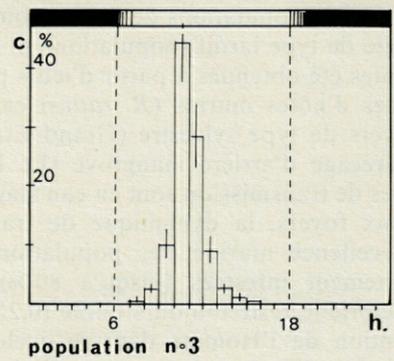
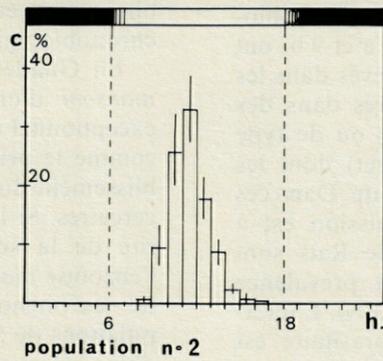
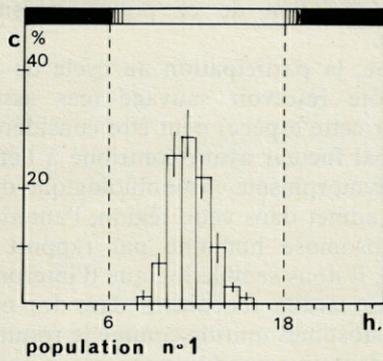
*Intrapopulationnal variation of the emergence rhythm of S. mansoni cercariae.*

*A — for the populations with an early shedding pattern,*

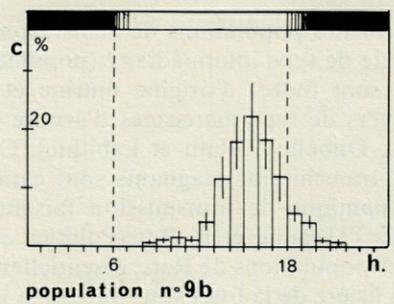
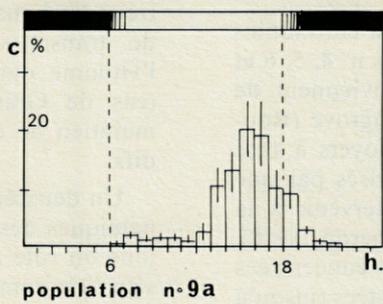
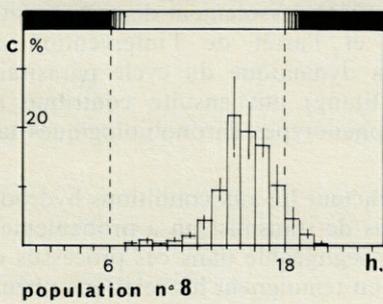
*B — for the populations with a late shedding pattern,*

*C — for the populations with an intermediate shedding pattern.*

## A) Type PRECOCE :



## B) Type TARDIF:



## C) Type INTERMEDIAIRE:

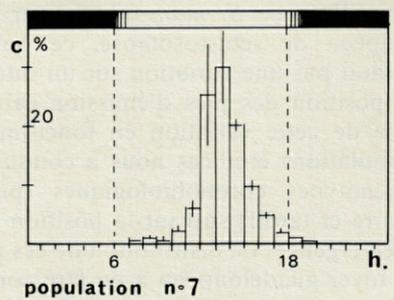
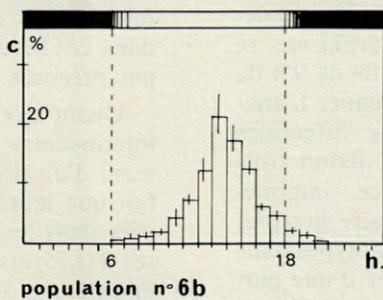
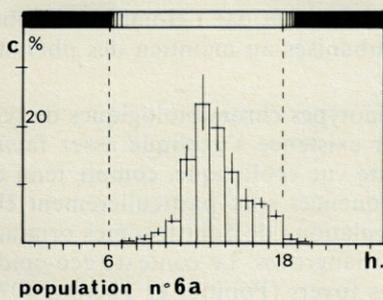
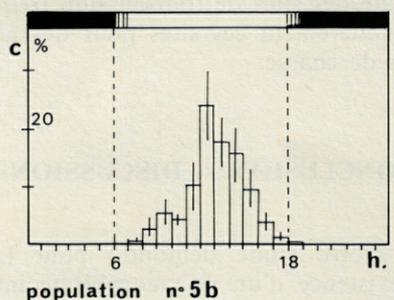
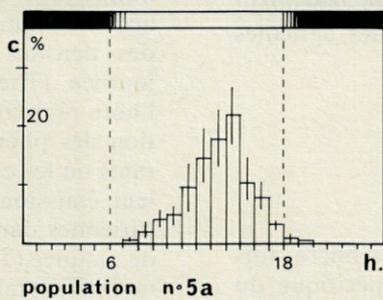
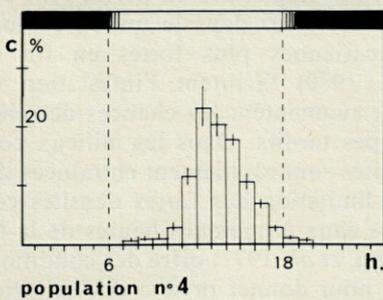


Fig. 4. — Histogrammes des émissions horaires moyennes des cercaires de *S. mansoni*.

A — pour les populations à chronobiologie de type précoce,

B — pour les populations à chronobiologie de type tardif,

C — pour les populations à chronobiologie de type intermédiaire.

*Hourly emergence of S. mansoni cercariae.*

A — for the populations with an early shedding pattern,

B — for the populations with a late shedding pattern,

C — for the populations with an intermediate shedding pattern.

parasité y est incapable d'entretenir seul la parasitose (Théron *et al.*, 1978).

b) Les populations de Schistosomes à chronobiologie de type tardif (populations n° 8, 9 a et 9 b) ont toutes été obtenues à partir d'œufs prélevés dans les fèces d'hôtes murins (*R. rattus*) capturés dans des foyers de type sylvestre (Grand Etang) ou de type marécage d'arrière mangrove (Le Raizet) dont les sites de transmission sont en eau stagnante. Dans ces deux foyers, la dynamique de transmission est à précellence murine; les populations de Rats sont fortement infestées (jusqu'à 80 %), la prévalence vectorielle reste toujours faible (0,25 à 3 %). L'intervention de l'Homme dans le cycle parasitaire est accidentelle (Grand Etang) ou limitée (Le Raizet) et le Rat peut entretenir seul la schistosomose (Théron, 1982).

c) Les populations de Schistosomes à chronobiologie de type intermédiaire (populations n° 4, 5, 6 et 7) sont toutes d'origine murine et proviennent de foyers de type marécages d'arrière mangrove (Roujol, Dubelloy, Blain et Labithie). Ces foyers à sites de transmission stagnants sont caractérisés par une dynamique de transmission faisant intervenir à la fois l'Homme et le Rat (Pointier et Théron, 1978). Les populations de Rats, essentiellement concentrées en lisière de la forêt sont fortement infestées (jusqu'à 60 % des individus sont positifs); l'Homme dont les habitations ne sont pas situées à proximité immédiate des sites de transmission fréquente cependant régulièrement ces sites pour des activités agricoles ou de chasse.

## CONCLUSION — DISCUSSION

Notre étude démontre pour la première fois l'existence d'un polymorphisme intraspécifique du rythme d'émergence des cercaires de Trématodes. Pour l'espèce *S. mansoni* et pour le foyer guadeloupéen de schistosomose, ce polymorphisme se traduit par une variation sur un intervalle de 9 h de la position des pics d'émission cercarienne. L'analyse de cette variation en fonction des différentes populations étudiées nous a conduit à définir trois phénotypes chronobiologiques (précoce, intermédiaire et tardif) suivant la position horaire des pics d'émergence. La distribution de ces phénotypes dans le foyer guadeloupéen a pu être corrélée d'une part à la structure écologique des sites de transmission et d'autre part à la dynamique de la transmission parasitaire dans ces sites. Cette corrélation entre le type chronobiologique des populations de Schistosomes et le contexte écologique du foyer d'origine est résumée dans le tableau I B.

L'ensemble des résultats obtenus et la démonstration récente du support génétique du rythme d'émergence des cercaires (Théron et Combes, 1983)

nous autorisent à avancer des hypothèses sur les causes et les facteurs susceptibles d'expliquer l'établissement et le maintien de ce polymorphisme chronobiologique.

En Guadeloupe, la participation au cycle de *S. mansoni* d'un hôte réservoir sauvage (cas assez exceptionnel pour cette espèce) peut être considérée comme le principal facteur ayant contribué à l'établissement du polymorphisme chronobiologique des cercaires. Si l'on admet dans cette région, l'antériorité de la schistosomose humaine par rapport à l'enzootie murine, il nous semble logique d'interpréter les phénotypes tardifs rencontrés dans les populations de Schistosomes murins comme le résultat d'une sélection adaptative conditionnée par le comportement crépusculaire des Rats et favorisée par le « turn-over » rapide des populations murines (Delatre et Le Louarn, 1981). L'isolement de certains sites de transmission et l'arrêt de l'intervention de l'Homme dans la dynamique du cycle parasitaire (cas de Grand Etang) ont ensuite contribué au maintien de ces phénotypes chronobiologiques tardifs.

Un deuxième facteur lié aux conditions hydrodynamiques des sites de transmission a probablement joué un rôle non négligeable dans ces processus de sélection comme en témoignent les relations phénotypes tardifs — milieux stagnants et phénotypes précoces — milieux courants qui se dégagent de notre étude. Les eaux stagnantes en permettant une accumulation des cercaires dans le milieu et donc des densités cercariennes plus fortes en fin de journée (Théron, 1980) facilitent l'infestation de l'hôte réservoir et augmentent les chances de sélection des phénotypes tardifs. Dans les milieux courants où les cercaires sont rapidement entraînées dès leur émission, la limitation des fortes densités cercariennes dans les eaux à quelques heures de la fin de matinée (Théron, *et al.*, 1977) offre des conditions moins favorables pour donner prise à une sélection des phénotypes tardifs par les Rats; l'importance du rejet d'œufs de *S. mansoni* par l'Homme contribue dans ces foyers urbanisés au maintien des phénotypes précoces.

Quant aux phénotypes chronobiologiques de type intermédiaire, leur existence s'explique assez facilement d'un point de vue écologique, compte tenu du fait que leurs fréquences sont particulièrement élevées dans les populations de Schistosomes originaires des foyers de mangroves. Le contexte éco-épidémiologique de ces foyers (Pointier et Théron, 1979) est en effet caractérisé par la participation à la fois de l'Homme et du Rat dans le maintien du cycle parasitaire. Le cas de la population n° 8 à chronobiologie de type tardif montre cependant que dans quelques foyers de mangrove le Rat peut entretenir seul le cycle parasitaire. Le déterminisme génétique de ces chronobiologies intermédiaires est plus difficile à définir et plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces phénotypes intermédiaires. Des re-

cherches portant sur la sélection expérimentale de phénotypes chronobiologiques et sur le croisement d'individus à chronobiologie différente devraient permettre une meilleure compréhension de ces problèmes.

En conclusion, il apparaît que l'hétérogénéité épidémiologique et écologique des foyers de schistosomose en Guadeloupe a fortement contribué à l'établissement du polymorphisme chronobiologique des cercaires de *S. mansoni*. Nos recherches confirment le caractère adaptatif des variants chronobiologiques dans la mesure où les différences observées vont dans le sens d'une favorisation de la transmission du parasite à des hôtes différents (Théron, 1984). Dans ce contexte, les phénotypes chronobiologiques peuvent être considérés comme marqueurs des populations de Schistosomes et permettre une approche nouvelle de certains problèmes touchant à l'écologie ou à la génétique des populations de Schistosomes.

La détermination des fréquences de phénotypes chronobiologiques, établies à partir de Mollusques parasités, directement prélevés dans les sites de transmission, permettra d'apprécier l'importance des hôtes réservoirs dans le maintien de la parasitose. Grâce à la technique de clonage par transplantation de sporocystes (Jourdan et Théron, 1980), il devient possible de maintenir expérimentalement des phénotypes chronobiologiques préalablement définis. Cette technique facilite au plan méthodologique les approches expérimentales de la génétique des Schistosomes, comme par exemple l'étude de la transmission de ces caractères chronobiologiques sur plusieurs générations de Schistosomes issues de parents à chronobiologie différente.

REMERCIEMENTS. — Cette recherche a reçu le support financier du Programme spécial P.N.U.D., Banque mondiale, O.M.S. de recherche et de formation concernant les maladies tropicales et du C.N.R.S. (ATP, Biologie des populations).

## BIBLIOGRAPHIE

- COMBES C., 1980. Les mécanismes de recrutement chez les Métazoaires parasites et leur interprétation en termes de stratégie démographique. *Vie Milieu*, **30** (1) : 55-63.
- COMBES C. et A. THERON, 1977. Rythmes d'émergence des cercaires de Trématodes et leur intérêt dans l'infestation de l'homme et des animaux. *Inst. Biol. Publicaciones especiales*, 4, Vol. in memoriam Prof. Caballero y Caballero : 141-150.
- COMBES C., N. LEGER et Y.J. GOLVAN, 1975. Le rôle du Rat dans la dynamique de l'endémie schistosomienne en Guadeloupe. *C.R. Séanc. Hebd. Acad. Sci. Paris*, **281**, Sér. D : 1059-1061.
- DELATTRE P. et H. LE LOUARN, 1981. Dynamique des populations du rat noir *Rattus rattus* en mangrove lacustre. *Mammalia*, **45** : 275-288.
- JOURDANE J. et A. THERON, 1980. *Schistosoma mansoni* : cloning by microsurgical transplantation of sporocysts. *Exper. parasitol.*, **50** : 349-355.
- NOJIMA H. et A. SATO, 1978. The emergence of schistosome cercariae from the snails. 1 — Hourly responses of the cercarial emergence of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* and effect of light-cut on their emergence. *Jap. J. Parasitol.*, **27** : 197-213.
- PITCHFORD R.J., A.H. MEYLING, J. MEYLING et J.F. DUTOIT, 1969. Cercarial shedding patterns of various schistosome species under outdoor conditions in the Transvaal. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, **63** : 359-371.
- PITCHFORD R.J. et J.F. DUTOIT, 1976. The shedding pattern of three little known African schistosomes under outdoor conditions. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, **70** : 181-187.
- POINTIER J.P. et A. THERON, 1979. La schistosomose intestinale dans les forêts marécageuses à *Pterocarpus* de Guadeloupe (Antilles françaises). *Ann. Parasitol.*, **54** : 43-56.
- RIOUX J.A., H. DESCAMPS, G. LANOTTE, C. COMBES, A. THERON, J.P. POINTIER, S. SEYTOR, P. DELATTRE, C. BOUGEROL, 1977. Ecologie de la schistosomose intestinale en Guadeloupe. Analyse du système épidémiologique. Documents pour un essai de modélisation. *Rev. Epidém. et Santé publ.*, **25** : 483-519.
- THERON A., 1980. Evaluation de la dérive cercarienne dans les sites de transmission des schistosomes à partir d'un prélèvement journalier unique. Exemple des foyers guadeloupéens à *Schistosoma mansoni*. *Rev. Epidém. et Santé publ.*, **28** : 131-139.
- THERON A., 1982. Le compartiment cercaire dans le cycle de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Ecologie de la transmission bilharzienne en Guadeloupe. Thèse d'Etat. Univ. Perpignan : 506 pp.
- THERON A., 1984. Early and late shedding patterns of *Schistosoma mansoni* cercariae : ecological significance in transmission to human and murine host. *J. Parasitol.*, **70** (5) : 652-655.
- THERON A. et C. COMBES, 1983. Analyse génétique du rythme d'émergence des cercaires de *Schistosoma mansoni* par croisement de souches à pics d'émission précoces ou tardifs. *C.R. Séanc. Hebd. Acad. Sci., Paris*, **297** : 571-574.
- THERON A., J.P. POINTIER et C. COMBES, 1977. Recherches sur les facteurs responsables des densités de cercaires de *Schistosoma mansoni* en Guadeloupe. *Ann. Parasitol.*, **52** : 421-433.
- THERON A., J.P. POINTIER et C. COMBES, 1979. Approche écologique du problème de la responsabilité de l'Homme et du Rat dans le fonctionnement d'un site de transmission de *Schistosoma mansoni* en Guadeloupe. *Ann. Parasitol.*, **53** : 223-234.

Reçu le 10 janvier 1985; received January 10, 1985

Accepté le 7 mars 1985; accepted March 7, 1985



# LA FIXATION DU CARBONE INORGANIQUE PAR LE PHYTOPLANCTON MARIN : DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES CARBOXYLASES ET LE RAPPORT ISOTOPIQUE $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

*Inorganic carbon fixation by marine phytoplankton :  
bibliographical review on carboxylating enzymes and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotopic ratio*

**DESCOLAS-GROS Chantal**

Laboratoire Arago, Université P. et M. Curie,  
CNRS, UA 117, 66650 Banyuls-sur-Mer

PHYTOPLANCTON  
FIXATION DU CARBONE  
CARBOXYLASES  
RAPPORT  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

**RÉSUMÉ.** — Cet article est une revue bibliographique des travaux effectués sur la fixation du carbone inorganique par le phytoplancton marin notamment en ce qui concerne le dosage de l'activité des carboxylases et la mesure du rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  du carbone organique.

PHYTOPLANKTON  
CARBON FIXATION  
CARBOXYLASES  
 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  RATIO

**ABSTRACT.** — This paper is a review on carbon fixation by marine phytoplankton in particular with respect to carboxylating enzyme assays and carbon isotope fractionation.

## INTRODUCTION

Le premier mécanisme de fixation du carbone mis en évidence chez les végétaux est le cycle des pentoses phosphates ou cycle de Calvin-Benson (Calvin *et al.*, 1951) encore appelé cycle  $\text{C}_3$ . D'autres mécanismes permettent l'assimilation du carbone inorganique, par fixation d'un deuxième groupement carboxyl ( $\beta$  carboxyl) sur un composé à trois atomes de carbone par une réaction appelée  $\beta$  carboxylation. Les végétaux qui fixent le  $\text{CO}_2$  atmosphérique par  $\beta$  carboxylation comprennent les espèces  $\text{C}_4$  et CAM. Cette nouvelle voie métabolique fut mise en évidence par Kortschak *et al.* (1965) sur la Canne à sucre puis confirmée par Hatch et Slack (1966). Il faut noter enfin, que des travaux récents ont mis en évidence des espèces dont le métabolisme est intermédiaire entre celui des espèces  $\text{C}_3$  et  $\text{C}_4$  (Brown et Brown, 1975; Rathnam et Chollet, 1979; Kennedy *et al.*, 1980).

Les travaux sont beaucoup moins nombreux sur les Algues et se sont surtout développés ces dernières années ainsi que le montrent les revues récentes de Kremer (1981 a); Ferron et Coudret (1984) sur les Macroalgues et celle de Trench et Fisher (1983) sur les Algues unicellulaires endosymbiotiques. Nous présentons ici une synthèse des travaux publiés sur l'étude des voies de fixation du carbone chez le phytoplancton marin, notamment en ce qui concerne les mesures de l'activité des carboxylases et du rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  du carbone organique.

La fixation du carbone inorganique peut être étudiée au niveau des mécanismes cellulaires ou des réponses physiologiques de l'ensemble de l'organisme considéré. Les techniques les plus utilisées chez les végétaux supérieurs sont les suivantes :

- 1) analyse des intermédiaires marqués par le  $^{14}\text{C}$  après assimilation par la plante de  $^{14}\text{CO}_2$ .
- 2) étude des caractéristiques de l'activité photosynthétique associée aux différents métabolismes

comme par ex. la mesure de la sensibilité de la photosynthèse à l'oxygène qui permet de mettre en évidence la photorespiration des plantes  $C_3$ .

- 3) étude de l'activité des enzymes impliquées dans la fixation du carbone inorganique.
- 4) mesure du rapport isotopique  $^{13}C/^{12}C$  du carbone organique des tissus végétaux.

Ces méthodes ont été appliquées aux Microalgues en culture et également aux communautés naturelles (Tabl. I). Le dosage de l'activité des carboxylases et la mesure du rapport isotopique  $^{13}C/^{12}C$  du carbone organique sont des méthodes qui peuvent être menées en parallèle car 1) elles s'adaptent aux faibles densités cellulaires rencontrées en mer, 2) elles permettent un grand nombre de mesures nécessaires à la description du milieu marin 3) elles mesurent directement la fonction physiologique que l'on désire caractériser.

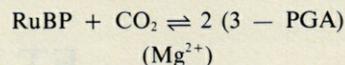
### 1. Données sur l'activité des carboxylases du phytoplancton marin

La fixation du carbone inorganique, selon la voie utilisée, peut être catalysée, par la ribulose —1,5—

bisphosphate carboxylase pour le cycle de Calvin-Benson ou par diverses carboxylases qui  $\beta$  carboxylent des composés en  $C_3$  (phosphoénolpyruvate, pyruvate).

#### 1.1. La ribulose —1,5— bisphosphate carboxylase (E.C.4.1.1.39)

Cette enzyme catalyse la réaction suivante :



La ribulose —1,5— bisphosphate carboxylase fixe le carbone sous forme  $CO_2$  (Cooper *et al.*, Raven, 1970, 1974; Lane et Mizioroko, 1978) et nécessiterait du magnésium comme cofacteur (Lane et Mizioroko, 1978).

Cette enzyme a donné lieu à de très nombreux travaux sur l'ensemble du règne végétal mais fort peu concernent les Microalgues phytoplanctoniques :

— Estep *et al.*, (1978 a) ont montré que la structure de la ribulose —1,5— bisphosphate carboxylase d'une diatomée, *Cylindrotheca*, était similaire à celle des plantes supérieures, donc constituée par deux

Tabl. I. — Méthodologies utilisées dans les principaux travaux pour caractériser la fixation du carbone inorganique sur des Algues en culture ou sur des communautés naturelles.

*Methods used to characterize algae inorganic carbon fixation in culture and in natural communities.*

Produits formés à court terme	Produits formés à long terme	Carboxylases	$\delta^{13}C$	Sensibilité à l'oxygène
	Morris & Farrell 1971 Wallen & Geen 1971a	Morris & Farrell 1971 Hellebust & Terborgh 1967	Degens <i>et al.</i> 1968a	Beardall & Morris 1975
	Morris <i>et al.</i> 1974 Pugh 1975	Paasche 1971 Bush & Sweeney 1972 Mukerji & Morris 1976 Holdsworth & Colbeck 1976 Beardall & Morris 1976 Holdsworth & Bruck 1977	Wong 1976 Wong & Sackett 1978	Morris & Glover 1981
Glover <i>et al.</i> 1975				
Kremer & Berks 1977 Mukerji <i>et al.</i> 1978	Kremer & Berks 1978 Mukerji <i>et al.</i> 1978	Kremer & Berks 1978 Mukerji <i>et al.</i> 1978 Mukerji & Morris 1978 Estep <i>et al.</i> 1978b Appleby <i>et al.</i> 1980 Descolas-Gros 1981	Estep <i>et al.</i> 1978b	
Beardall <i>et al.</i> 1976		Beardall <i>et al.</i> 1976  Glover & Morris 1979 Descolas-Gros 1983 Descolas-Gros & Fontugne 1983, 1985	Fontugne 1983 Descolas-Gros & Fontugne 1983, 1985	Beardall <i>et al.</i> 1976
	Degens <i>et al.</i> 1968b Wallen & Geen 1971b Morris & Skea 1978 Hitchcock 1978		Sackett <i>et al.</i> 1965 Degens <i>et al.</i> 1968b Deuser 1970 Fontugne & Duplessy 1978, 81 Rau <i>et al.</i> 1982	
	Dohler & Rosslenbroich, 1979 Smith & Morris 1980a,b Li <i>et al.</i> 1980 Morris <i>et al.</i> 1981 Li & Harrison 1982	Li <i>et al.</i> 1980 Morris <i>et al.</i> 1981 Platt <i>et al.</i> 1983 Smith <i>et al.</i> 1983, 85	Li <i>et al.</i> 1980	

Tabl. II. — Espèces du phytoplancton marin chez lesquelles le dosage de la ribulose -1,5- biphosphate carboxylase a été effectué.

*Ribulose -1,5- biphosphate carboxylase assay in marine phytoplankton species.*

ESPECES	AUTEURS
<b>Bacillariophyceae</b>	
<i>Coscinodiscus</i> sp.	Glover & Morris 1979
<i>Cylindrotheca</i> sp.	Estep <i>et al.</i> 1978b
<i>Fragilariopsis kerguelensis</i>	Descolas-Gros 1983
<i>Nitzschia turgiduloides</i>	Descolas-Gros 1983
<i>Phaeodactylum tricoratum</i>	Paasche 1971 Beardall & Morris 1975 Beardall & Morris 1976 Holdsworth & Colbeck 1976 Mukerji & Morris 1976 Beardall <i>et al.</i> 1976 Mukerji & Morris 1978 Glover & Morris 1979 Descolas-Gros 1983
<i>Skeletonema costatum</i>	Beardall <i>et al.</i> 1976 Descolas-Gros 1983
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Glover & Morris 1979
<b>Chlorophyceae</b>	
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Hellebust & Terborgh 1967 Morris & Farrell 1971 Beardall <i>et al.</i> 1976 Mukerji <i>et al.</i> 1978 Glover & Morris 1979
<i>Dunaliella marina</i>	Descolas-Gros 1983
<b>Coccolithophoridae</b>	
<i>Coccolithus pelagicus</i>	Glover & Morris 1979
<b>Cryptophyceae</b>	
<i>Chroomonas salina</i>	Glover & Morris 1979
<b>Chrysophyceae</b>	
<i>Isochrysis galbana</i>	Descolas-Gros 1983
<b>Cyanophyceae</b>	
<i>Oscillatoria thiebautii</i>	Li <i>et al.</i> 1980
<b>Dinophyceae</b>	
<i>Amphidinium carterae</i>	Appleby <i>et al.</i> 1980
<i>Gonyaulax polyedra</i>	Bush & Sweeney 1972
<i>Gonyaulax tamarensis</i>	Beardall <i>et al.</i> 1976
<i>Prorocentrum micans</i>	Descolas-Gros 1983

chaînes polypeptidiques formant une grande et une petite sous-unité (Akazawa, 1979), et qu'elle fractionnait les isotopes du carbone de la même manière.

— Holdsworth et Colbeck (1976) ont mis en évidence chez une autre diatomée, *Phaeodactylum tricoratum*, l'existence de deux formes, l'une à forte affinité pour le CO<sub>2</sub> et l'autre à faible affinité; ces deux formes existent également chez les végétaux supérieurs (Lorimer *et al.*, 1978). Les espèces chez lesquelles le dosage de la ribulose -1,5- biphosphate carboxylase a été effectué, figurent Tableau II.

## 1.2. Les enzymes responsables des β carboxylations

Une certaine confusion règne dans la littérature au niveau de l'appellation des enzymes responsables

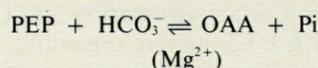
Tabl. III. — Les enzymes responsables des β carboxylations chez différentes espèces phytoplanctoniques marines selon les auteurs.

*β carboxylases found in different marine phytoplankton species.*

ESPECES	AUTEURS	PEPC	PEPCK	PC
<b>Bacillariophyceae</b>				
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	Appleby <i>et al.</i> 1980	X (Mn)		
<i>Coscinodiscus</i> sp.	Glover & Morris 1979	X		
<i>Cylindrotheca closterium</i>	Holdsworth & Bruck 1977 Appleby <i>et al.</i> 1980 Mukerji & Morris 1976		X	X
<i>Fragilariopsis kerguelensis</i>	Descolas-Gros 1983		X	X
<i>Nitzschia turgiduloides</i>	Descolas-Gros 1983		X	X
<i>Phaeodactylum tricoratum</i>	Beardall <i>et al.</i> 1976 Holdsworth & Bruck 1977 Mukerji & Morris 1976, 1978 Glover & Morris 1979 Appleby <i>et al.</i> 1980	X	X	X
<i>Skeletonema costatum</i>	Beardall <i>et al.</i> 1976 Descolas-Gros 1983	X		X
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Holdsworth & Bruck 1977 Glover & Morris 1979 Appleby <i>et al.</i> 1980		X	X
<b>Bangiophyceae</b>				
<i>Porphyridium cruentum</i>	Appleby <i>et al.</i> 1980	X (Mn)		
<b>Chlorophyceae</b>				
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Beardall <i>et al.</i> 1976 Mukerji <i>et al.</i> 1978 Glover & Morris 1979 Appleby <i>et al.</i> 1980	X	X	X
<i>Dunaliella marina</i>	Descolas-Gros 1983	X (Mn)		X
<b>Coccolithophoridae</b>				
<i>Coccolithus pelagicus</i>	Glover & Morris 1979	X		
<b>Cryptophyceae</b>				
<i>Chroomonas salina</i>	Glover & Morris 1979	X		
<b>Cyanophyceae</b>				
<i>Anabaena cylindrica</i>	Appleby <i>et al.</i> 1980	X (Mn)		
<i>Oscillatoria thiebautii</i>	Li <i>et al.</i> 1980	X		
<b>Dinophyceae</b>				
<i>Amphidinium carterae</i>	Appleby <i>et al.</i> 1980			X
<i>Gymnodinium</i> sp.	Appleby <i>et al.</i> 1980			X
<i>Gonyaulax tamarensis</i>	Beardall <i>et al.</i> 1976	X		
<i>Prorocentrum micans</i>	Descolas-Gros 1983	X		
<b>Prymnesiophyceae</b>				
<i>Pavlova lutheri</i>	Appleby <i>et al.</i> 1980		X	

des β carboxylations (Tab. III). Cela tient au fait que seuls les travaux d'Holdsworth et Bruck (1977) et Appleby *et al.*, (1980) ont clairement caractérisé les enzymes après purification. Ces enzymes ont en commun d'utiliser des composés C<sub>3</sub> (phosphoénolpyruvate ou pyruvate) pour fixer le carbone inorganique sous la forme HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Une espèce donnée ne posséderait qu'une seule de ces enzymes; trois sont actuellement répertoriées :

- a) *La phosphoénolpyruvate carboxylase.*  
(E.C.4.1.1.31) qui catalyse la réaction

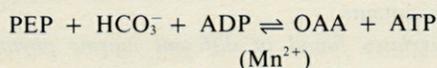


Cette enzyme nécessite du magnésium comme cofacteur et la présence de manganèse 5 mM augmenterait son activité chez certaines espèces. L'inhibition par le malate 5 mM varierait selon les espèces laissant supposer l'existence d'alloenzymes comme chez les végétaux supérieurs (Appleby *et al.*, 1980).

- b) *la phosphoénolpyruvate carboxykinase*  
(E.C.4.1.1.49)

Cette enzyme a été mise en évidence principalement chez les Diatomées (Holdsworth et Bruck,

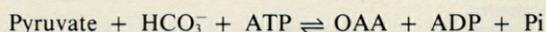
1977; Kremer et Berks, 1978) la réaction catalysée est la suivante :



Cette réaction requiert du manganèse et de l'ADP. Davies (1979) a attiré l'attention sur le fait qu'il existerait certaines phosphoénolpyruvate carboxylases qui seraient stimulées par l'ADP et que, pour justifier l'appellation phosphoénolpyruvate carboxykinase, il fallait mettre en évidence la formation d'ATP. Ceci a été démontré par Holdsworth et Bruck (1977). Cette enzyme qui conserve une partie de l'énergie du phosphoénolpyruvate sous forme d'ATP serait intéressante pour les Algues vivant à de faibles intensités lumineuses (Appleby *et al.*, 1980). Elle a été signalée également chez les Phéophycées (Kremer, 1981 a).

### c) La pyruvate carboxylase (E.C.6.4.1.1.)

Appleby *et al.*, (1980) ont trouvé cette enzyme, non signalée chez les plantes ou les Algues marines, dans deux espèces de Dinoflagellés. Son activité est fortement inhibée par les ions  $\text{Mn}^{2+}$ . La réaction qu'elle catalyse est :



## 2. Données sur le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du carbone organique du phytoplancton

Le carbone présente à l'état naturel deux isotopes stables, le  $^{12}\text{C}$  (98,89 %) et le  $^{13}\text{C}$  (1,11 %). On peut mesurer grâce à un spectromètre de masse le rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  d'un échantillon carboné. Il n'est pas possible d'accéder à la mesure directe de ce rapport, mais de toutes petites variations de celui-ci (vs standard) peuvent être estimées. Le rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  est donc exprimé comme écart relatif en pour mille, par rapport à ce standard (Craig, 1957) sous la forme :

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left[ \frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ échantillon}}{^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ standard}} - 1 \right] \times 1000$$

Le standard est le PDB qui a la composition isotopique du  $\text{CO}_2$  extrait du carbonate d'un rostre de Bélemnite du Crétacé (formation Pee Dee, Caroline du Sud, U.S.A.). La matière organique végétale et le  $\text{CO}_2$  atmosphérique étant plus pauvres en  $^{13}\text{C}$  que le standard, les valeurs habituellement rencontrées du  $\delta^{13}\text{C}$  sont négatives, d'autant plus que les échantillons sont appauvris en  $^{13}\text{C}$ .

On parle de fractionnement isotopique lorsque le rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  d'un composé carboné est modifié après un processus physique, chimique ou biologique (Fontugne, 1978). Le terme de discrimination contre le carbone-13 est utilisé lorsque l'on observe lors de cette transformation, une diminution du  $^{13}\text{C}$ .

Depuis une quinzaine d'années, les mesures de  $\delta^{13}\text{C}$  effectuées sur un grand nombre d'espèces végétales ont permis de mettre en évidence une relation étroite entre le  $\delta^{13}\text{C}$  des végétaux et leur type métabolique. Les premiers travaux sur ce sujet sont ceux de : Park et Epstein, 1960; Bender, 1968; 1971; Troughton, 1971; Smith et Epstein, 1971. Les plantes  $\text{C}_3$  sont caractérisées par de faibles valeurs du  $\delta^{13}\text{C}$  :  $-38 \text{‰} < \delta^{13}\text{C} < -22 \text{‰}$  et les plantes  $\text{C}_4$  par des valeurs élevées :  $-19 \text{‰} < \delta^{13}\text{C} < -9 \text{‰}$ . La valeur la plus fréquente est  $-27 \text{‰}$  pour les plantes  $\text{C}_3$  (Lerman, 1975). A partir de la même source de  $\text{CO}_2$  atmosphérique ( $\delta^{13}\text{C} = -7 \text{‰}$ ) les végétaux  $\text{C}_3$  sont appauvris en  $^{13}\text{C}$  par rapport aux végétaux  $\text{C}_4$ . L'essentiel de cette différence est lié à l'étape de carboxylation primaire. En effet, les carboxylations effectuées par la ribulose -1,5- bisphosphate carboxylase s'accompagnent d'un enrichissement des métabolites formés en  $^{12}\text{C}$  alors que la fixation du  $\text{CO}_2$  atmosphérique par la phosphoénolpyruvate carboxylase ne s'accompagne pas d'un tel phénomène (Whelan *et al.*, 1973; Deleens *et al.*, 1974; Christeller *et al.*, 1976; Reibach et Benedict, 1977; Estep *et al.*, 1978 a, b; Wong *et al.*, 1979).

Les mesures de  $\delta^{13}\text{C}$  effectuées sur des communautés phytoplanctoniques marines (Craig, 1953; Park et Epstein, 1961; Sackett *et al.*, 1965; Degens *et al.*, 1968 b; Deuser, 1970; Calder et Parker, 1973; Fontugne et Duplessy, 1978, 1981; Rau *et al.*, 1982) mettent en évidence un large éventail de valeurs allant de  $-9 \text{‰}$  à  $-31 \text{‰}$ . En mer, Fontugne et Duplessy (1978, 1981) observent une relation entre le  $\delta^{13}\text{C}$  et les masses d'eau et ils quantifient la relation entre le  $\delta^{13}\text{C}$  et la température mise en évidence par Sackett *et al.*, (1965); Rau *et al.*, (1982) montrent un effet de la latitude.

Sur des espèces isolées, cultivées en laboratoire, la même dispersion des valeurs a été retrouvée (Degens *et al.*, 1968 a; Calder et Parker, 1973; Pardue *et al.*, 1976; Wong, 1976; Wong et Sackett, 1978). Ces variations sont attribuées aux différences interspécifiques, à la température de culture, à la teneur en  $\text{CO}_2$  du milieu, au stade de croissance. Tout comme chez les végétaux supérieurs le  $\delta^{13}\text{C}$  du phytoplancton peut être influencé :

1) par la composition isotopique de la forme de carbone inorganique assimilé ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ) (Deuser et Degens, 1967) et par tous les facteurs intervenant sur l'équilibre gaz carbonique-acide carbonique-bicarbonates-carbonates, dans l'eau de mer, notamment la température (Wendt, 1968) et le pH.

2) par le métabolisme carboné des Algues. En effet, la ribulose -1,5- bisphosphate carboxylase des Algues peut discriminer contre le  $^{13}\text{C}$  de la même manière que celle des végétaux supérieurs (Estep *et al.*, 1978 a). Si on considère la large gamme des valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  observées, plusieurs hypothèses sont envisageables : ou bien il existe des espèces appartenant à chaque type métabolique (type  $\text{C}_3$  ou  $\text{C}_4$ ), ou

bien chaque espèce peut, comme les CAM, moduler son métabolisme en fonction des facteurs du milieu; enfin, il est également possible que, comme chez les angiospermes marines, des problèmes de perméabilité membranaire créent une compartimentation à l'intérieur des cellules et que la discrimination contre le <sup>13</sup>C de la ribulose -1,5- bisphosphate carboxylase ne s'exprime pas dans certaines conditions.

Le seul moyen de répondre à ces interrogations est d'effectuer simultanément, en mer et en conditions contrôlées sur des cultures, des mesures du δ <sup>13</sup>C du phytoplancton et des mesures permettant de caractériser le type métabolique des microalgues.

### 3. Discussion sur les voies de fixation du carbone inorganique utilisées par les Algues phytoplanctoniques (Fig. 1)

Les travaux sont encore peu nombreux compte tenu du grand nombre d'espèces des communautés phytoplanctoniques marines, et des incertitudes persistent sur les mécanismes associés à la fixation du carbone.

Il ressort de l'ensemble des travaux que la fixation du carbone extérieur se ferait d'une part grâce à l'activité de la ribulose -1,5- bisphosphate carboxylase et le cycle de Calvin-Benson, d'autre part par β carboxylation. Les β carboxylations mises en évidence chez les Algues diffèrent de celles rencontrées pour la fixation du CO<sub>2</sub> atmosphérique à la lumière chez les espèces C<sub>4</sub> et CAM. En effet, si comme chez ces dernières, le premier produit formé après fixation du carbone inorganique est bien un composé à quatre atomes de carbone (oxaloacétate), il n'y a aucune preuve de sa décarboxylation.

L'existence de cette double fixation du carbone inorganique par le cycle de Calvin-Benson et par β carboxylation est reconnue par l'ensemble des auteurs mais l'importance relative de l'un des mécanismes par rapport à l'autre donne lieu à des controverses. Les travaux de Kremer et Berks (1978); Kremer 1981 b; Holdsworth et Colbeck (1976) Holdsworth et Bruck (1977), Appleby *et al.*, (1980); Descolas-Gros 1983; Descolas-Gros et Fontugne (1985) mettent en évidence une prépondérance de la fixation par la ribulose -1,5- bisphosphate carboxylase dans tous les cas étudiés. Ceux de Beardall *et al.*, (1976), Mukerji et Morris (1976), Morris (1980) montrent que les β carboxylations peuvent être responsables de l'essentiel de la fixation du carbone chez certaines espèces et que l'état physiologique des cellules intervient directement sur le pourcentage de carbone fixé par l'un ou l'autre mécanisme. Pour Morris (1980), Morris et Darley (1982), il existe dans le phytoplancton marin un spectre de types métaboliques entre les deux extrêmes (fixation par la ribulose -1,5- bisphosphate carboxylase, fixation

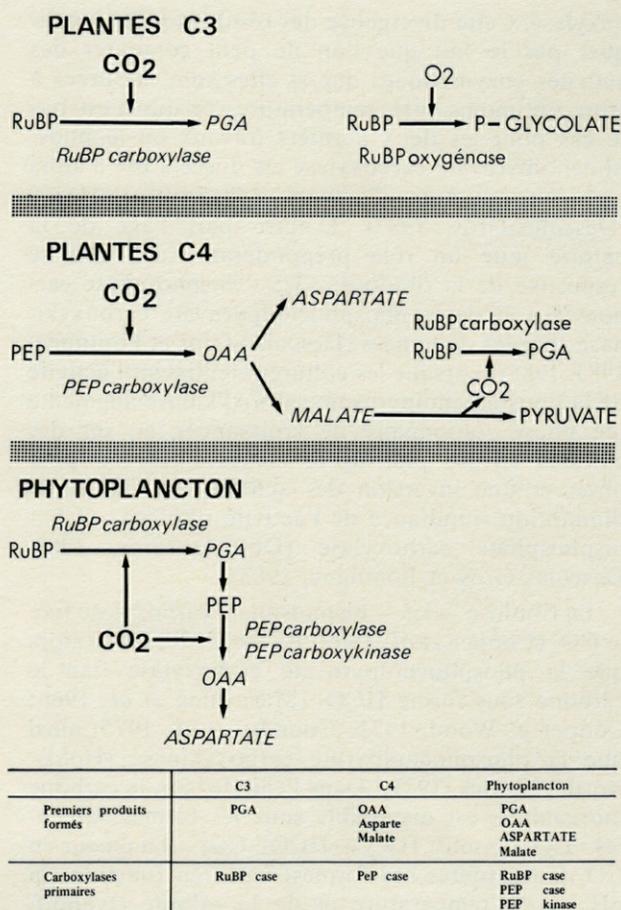


Fig. 1. — Schéma comparatif des voies de fixation du carbone inorganique des espèces C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub> et de celles hypothétiques rencontrées chez les espèces phytoplanctoniques marines.

Comparison between C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> pathways of carbon dioxide fixation and the hypothetical one for marine phytoplankton species.

par β carboxylation). Il est cependant surprenant de noter que les résultats de ces deux groupes d'auteurs sont contradictoires sur les mêmes espèces aux niveaux 1— de l'importance des β carboxylations 2— de la nature des β carboxylases. En effet, nous avons mis en évidence une activité phosphoenolpyruvate carboxykinase chez toutes les Diatomées étudiées qu'elles soient originaires d'eaux tempérées (*Skeletonema costatum*, *Phaeodactylum tricornerutum*) ou d'eaux froides (*Nitzschia turgiduloides*, *Fragilariopsis kerguelensis*) (Descolas-Gros, 1983; Descolas-Gros et Fontugne; 1985). La présence de phosphoenolpyruvate carboxykinase avait également été trouvée chez *Phaeodactylum tricornerutum* par Holdsworth et Bruck (1977) et Kremer et Berks (1978). Par contre Mukerji et Morris (1976), Beardall *et al.*, (1976) ont mis en évidence une activité phosphoenolpyruvate carboxylase chez *Phaeodactylum tricornerutum* et *Skeletonema costatum*, activité supérieure à celle de la ribulose -1,5- bisphosphate car-

boxylase. Cette divergence des résultats peut s'expliquer par le fait que l'on ne peut comparer des activités enzymatiques que si elles sont mesurées à leurs optimums (pH, température) ce qui n'est pas le cas pour les deux derniers travaux où la phosphoénolpyruvate carboxylase est dosée à pH 8 alors que son optimum d'activité s'observe à pH 6,8 (Descolas-Gros, 1983). D'autre part l'âge de la culture joue un rôle prépondérant sur l'activité respective de la ribulose —1,5— bisphosphate carboxylase et de la phosphoénolpyruvate carboxykinase chez les diatomées (Descolas-Gros et Fontugne, 1983, 1985). Lorsque les cultures vieillissent l'activité de la phosphoénolpyruvate carboxykinase augmente (en phase stationnaire de croissance), et, sur des cultures encore plus âgées (senescentes) on peut observer une inversion des activités du fait de la diminution simultanée de l'activité ribulose —1,5— bisphosphate carboxylase (Descolas-Gros, 1983, Descolas-Gros et Fontugne, 1983).

La ribulose —1,5— bisphosphate carboxylase fixe le  $\text{CO}_2$  (Cooper *et al.*, 1969; Raven, 1970, 1974) alors que la phosphoénolpyruvate carboxylase fixe le carbone sous forme  $\text{HCO}_3^-$  (Maruyama *et al.*, 1966; Cooper et Wood, 1971; Coombs *et al.*, 1975) ainsi que la phosphoénolpyruvate carboxykinase (Holdsworth et Bruck, 1977). Dans l'eau de mer, le carbone inorganique est disponible sous les formes suivantes :  $\text{CO}_2$  dissous,  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ . La teneur en  $\text{CO}_2$  (sous toutes ses formes) varie en fonction du pH, de la température et de la salinité (Ivanoff, 1972). Aux pH habituels de l'eau de mer : 7,8-8,2, les ions  $\text{HCO}_3^-$  représentent 90 % de la totalité du  $\text{CO}_2$  disponible, ce qui pourrait être un facteur limitant pour les algues fixant le carbone inorganique par la ribulose —1,5— bisphosphate carboxylase. Cette limitation est vraisemblablement minimisée par l'existence des deux mécanismes suivants : 1) la présence d'anhydrase carbonique (E.C.4.2.1.1.) qui catalyse à l'intérieur des cellules l'hydratation réversible du  $\text{CO}_2$  (Raven, 1970; Graham et Smillie, 1976); 2) l'existence de mécanisme concentrant le  $\text{CO}_2$  chez plusieurs espèces de Chlorophycées et chez une Cyanophycée (Beardall et Raven 1981; Raven et Beardall, 1981); ce mécanisme expliquerait la faible photorespiration apparente observée chez les Microalgues. En effet une forte teneur en  $\text{CO}_2$  intracellulaire limiterait la fonction oxygénase de la ribulose —1,5— bisphosphate carboxylase.

Il ressort de l'ensemble de ces travaux que le type photosynthétique  $\text{C}_4$  des végétaux supérieurs n'a pas été mis en évidence chez le phytoplancton marin, pas plus d'ailleurs que chez les Macroalgues benthiques (Kremer, 1981 a; Ferron et Coudret, 1984).

En effet :

— il n'existe aucune preuve de la décarboxylation du composé  $\text{C}_4$ , donc de la fixation secondaire du  $\text{CO}_2$  intracellulaire libéré par la ribulose —1,5— bisphosphate carboxylase;

— il n'y a aucune compartimentation tissulaire du type parenchyme périvasculaire-mésophylle chez les Microalgues.

Par contre :

— la photorespiration est généralement faible;

— la forme sous laquelle le carbone inorganique est le plus abondant dans l'eau de mer est  $\text{HCO}_3^-$  et la présence d'anhydrase carbonique ou de mécanismes concentrant le  $\text{CO}_2$  ne sont pas généralisés à tous les composants du phytoplancton;

— la fixation du carbone inorganique par  $\beta$  carboxylation à la lumière peut être élevée; elle est supérieure à celle rencontrée chez certains végétaux  $\text{C}_3$  comme la *Chlorelle* où elle atteint 5 % (Raven, 1970).

Aussi, pour lever toute ambiguïté de terminologie, Benedict (1978) conseille l'emploi du terme plus général de *Métabolisme  $\text{C}_4$* ; Beardall et Raven (1981) utilisent les appellations  *$\text{C}_3$  like et  $\text{C}_4$  like* selon les comportements physiologiques mis en évidence et suivant que ceux-ci se rapprochent du comportement théorique d'une espèce  $\text{C}_3$  ou  $\text{C}_4$  mise dans les mêmes conditions.

Il apparaît que si les Microalgues phytoplanctoniques marines ont, pour fixer le carbone inorganique, des mécanismes communs avec les végétaux supérieurs (cycle de Calvin-Benson), elles possèdent aussi des mécanismes originaux directement liés au milieu dans lequel elles vivent et à ses contraintes. Les  $\beta$  carboxylations nous apparaissent comme un mécanisme adaptatif temporaire destiné à compenser un défaut de fixation du carbone inorganique par le cycle  $\text{C}_3$  dû à des conditions du milieu défavorables ou à un mauvais état physiologique des cellules. Le facteur défavorable ne semble pas avoir d'effet spécifique : une diminution de l'intensité lumineuse ou le vieillissement des cultures (Descolas-Gros, 1983) provoque une diminution de l'activité de la ribulose —1,5— bisphosphate carboxylase et une augmentation des  $\beta$  carboxylations.

## BIBLIOGRAPHIE

- AKAZAWA T., 1979. Ribulose —1,5— bisphosphate carboxylase. *In* : Encyclopedia of Plant Physiology, volume 6. M. Gibbs and E. Latzko ed. Springer Verlag, 208-225.
- APPLEBY G., J. COLBECK, E.S. HOLDSWORTH and H. WADMAN, 1980.  $\beta$  carboxylation enzymes in marine phytoplankton and isolation and purification of pyruvate carboxylase from *Amphidinium carterae* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, **16** : 290-295.
- BEARDALL J. and I. MORRIS, 1975. Effects of environmental factors on photosynthesis patterns in *Phaeodactylum tricoratum* (Bacillariophyceae). II. Effect of oxygen. *J. Phycol.*, **11** : 430-434.

- BEARDALL J. and I. MORRIS, 1976. The concept of light intensity adaptation in marine phytoplankton : some experiments with *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Biol.*, **37** : 377-387.
- BEARDALL J., D. MUKERJI, H.E. GLOVER and I. MORRIS, 1976. The path of carbon in photosynthesis by marine phytoplankton. *J. Phycol.*, **12** : 409-417.
- BEARDALL J. and J. RAVEN, 1981. Transport of inorganic carbon and the « CO<sub>2</sub> concentrating mechanism » in *Chlorella emersonii* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, **17** : 134-141.
- BENDER M.M., 1968. Mass spectrometry studies of carbon 13 variations in corn and other grasses. *Radiocarbon*, **10** : 468-472.
- BENDER M.M., 1971. Variations in the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ratios of plants in relation to the pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation. *Phytochemistry*, **10** : 1239-1244.
- BENEDICT C.R., 1978. Nature of obligate photoautotrophy. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **29** : 67-93.
- BROWN R.H. and W.V. BROWN, 1975. Photosynthetic characteristics of *Panicum milioides*, a species with reduced photorespiration. *Crop Sci.*, **15** : 681-685.
- BUSH K. and B.M. SWEENEY, 1972. The activity of ribulose diphosphate carboxylase in extracts of *Gonyaulax polyedra* in the day and the night phases of the circadian rhythm of photosynthesis. *Plant. Physiol.*, **50** : 446-451.
- CALDER J.A. and P.L. PARKER, 1973. Geochemical implications of induced changes in C<sup>13</sup> fractionation by blue-green algae. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **37** : 133-140.
- CALVIN M., J.A. BASSHAM A.A., BENSON, V.H. LYNCH, C. QUELET, L. SCHOU, W. STEPKA, and N.E. TOLBERT, 1951. Carbon dioxide assimilation in plants. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **5** : 284-305.
- CHRISTELLER, J.T., W.A. LAING, and J.H. TROUGHTON, 1976. Isotope discrimination by ribulose -1,5- Diphosphate carboxylase. No effect of temperature or HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration. *Plant Physiol.*, **57** : 580-582.
- COOMBS J., S.L. MAW and C.W. BALDRY, 1975. Metabolic regulation in C<sub>4</sub> photosynthesis : the inorganic substrate for PEP carboxylase. *Plant Science Letters*, **4** : 97-102.
- COOPER T.G., D. FILMER, M. WISHNICK and M.D. LANE, 1969. The active species of « CO<sub>2</sub> » utilized by ribulose diphosphate carboxylase. *J. Biol. Chem.*, **244** : 1081-1083.
- COOPER T.G. and H.G. WOOD, 1971. The carboxylation of phosphoenolpyruvate and pyruvate. II The active species of « CO<sub>2</sub> » utilized by phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.*, **246** : 5488-5490.
- CRAIG H., 1953. The geochemistry of the stable carbon isotopes. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **3** : 53-92.
- CRAIG H., 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **12** : 133-149.
- DAVIES D.D., 1979. The central role of phosphoenolpyruvate in plant metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **30** : 131-158.
- DEGENS E.T., R.R.L. GUILLARD, W.M. SACKETT and J.A. HELLEBUST, 1968a. Metabolic fractionation of carbon isotopes in marine plankton. I. Temperature and respiration experiments. *Deep Sea Res.*, **15** : 1-9.
- DEGENS E.T., M. BEHRENDT, B. GOTTHARD and E. REPPMANN, 1968b. Metabolic fractionation of carbon isotopes in marine plankton. II. Data on samples collected off the coasts of Peru and Ecuador. *Deep Sea Res.*, **15** : 11-20.
- DELEENS E., J.C. LERMAN, A. NATO and A. MOYSE, 1974. Carbon isotope discrimination by the carboxylating reactions in C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and CAM plants. Proc. 3rd Int. Cong. Photosynth. 2, M. Avron ed. Elsevier, 1267-1276.
- DESCOLAS-GROS C., 1982. Données sur l'activité des carboxylases de quelques diatomées marines en culture. Pub CNEXO (Actes de Colloques), **14** : 123-130.
- DESCOLAS-GROS C., 1983. Les voies d'incorporation photosynthétique du carbone du phytoplancton. Signification écologique de l'activité des carboxylases en milieu marin. Comparaison avec le rapport isotopique <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C du carbone organique du phytoplancton. Thèse Doct. ès Sciences, Paris VI, 117 p.
- DESCOLAS-GROS C. et M. FONTUGNE, 1983. L'assimilation du carbone par le phytoplancton. Relations entre le rapport <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C et l'activité des carboxylases. *Oceanis*, **9** (3) : 163-168.
- DESCOLAS-GROS C. and M. FONTUGNE, 1985. Carbon fixation in marine phytoplankton : stable carbon isotope ratios and carboxylase activities. Physiological and Paleoclimatological aspects. *Mar. Biol.*, **87** : 1-6.
- DEUSER W.G., 1970. Isotopic evidence for diminishing supply of available carbon during diatom bloom in the Black Sea. *Nature*, **215** : 1033-1035;
- DOHLER G. and H.J. ROSSLENBROICH, 1979. Diurnal variation in photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation of marine phytoplankton populations. *Z. Pflanzenphysiol.*, **94** : 417-425.
- ESTEP M.F., F.R. TABITA, P.L. PARKER and C. VAN BAALEN, 1978a. Carbon isotope fractionation by ribulose -1,5-bisphosphate carboxylase from various organisms. *Plant Physiol.*, **61** : 680-687.
- ESTEP M.F., F.R. TABITA and C. VAN BAALEN, 1978b. Purification of ribulose -1,5- bisphosphate carboxylase and carbon isotope fractionation by whole cells and carboxylase from *Cylindrotheca sp.* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, **14** : 183-188.
- FERRON F. and A. COUDRET, 1984. Metabolic pathways of photosynthesis in marine algae; a bibliographical review. *Physiol. Veg.*, **22** : 103-113.
- FONTUGNE M.R., 1978. Etude de la composition isotopique du carbone organique du plancton marin. Application à la paléocéanographie. Thèse 3<sup>e</sup> cycle, Univ. Bordeaux I.
- FONTUGNE M.R., 1983. Les isotopes stables du carbone organique dans l'océan. Applications à la paléoclimatologie. Thèse Doctorat ès Sciences Orsay, 228 p.
- FONTUGNE M.R. and J.C. DUPLESSY, 1978. Carbon isotope ratio of marine plankton related to surface water masses. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **41** : 365-371.
- FONTUGNE M.R. and J.C. DUPLESSY, 1981. Organic isotopic fractionation by marine plankton in the temperature range - 1 to 31 °C. *Oceanol. Acta.*, **4** : 85-90.
- GLOVER H., J. BEARDALL and I. MORRIS, 1975. Effects of environmental factors on photosynthesis patterns in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). I. Ef-

- fect of nitrogen deficiency and light intensity. *J. Phycol.*, **11** : 424-429.
- GLOVER H.E. and I. MORRIS, 1979. Photosynthetic carboxylating enzymes in marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **24** : 510-519.
- GRAHAM D. and R.M. SMILLIE, 1976. Carbonate dehydratase in marine organisms of the great barrier reef. *Austr. J. Plant Physiol.*, **3** : 113-119.
- HATCH M.D. and C.R. SLACK, 1966. Photosynthesis by sugar-cane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochem. J.*, **101** : 103-111.
- HELLEBUST J.A. and J. TERBORGH, 1967. Effects of environmental conditions on the rate of photosynthesis and some photosynthetic enzymes in *Dunaliella tertiolecta*. *Limnol. Oceanogr.*, **12** : 559-567.
- HITCHCOCK G.L., 1978. Labelling patterns of carbon — 14 in net plankton during a winter-spring bloom. *J. exp. mar. biol. Ecol.*, **31** : 141-153.
- HOLDSWORTH E.S. and J. COLBECK, 1976. The pattern of carbon fixation in the marine unicellular alga *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Biol.*, **38** : 189-199.
- HOLDSWORTH E.S. and K. BRUCK, 1977. Enzymes concerning with  $\beta$  carboxylation in marine phytoplankton purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **182** : 87-94.
- IVANOFF A., 1972. Le système gaz carbonique-bicarbonates-carbonates. In : Introduction à l'océanographie. Tome I. *Vuibert*, 137-151.
- KENNEDY R.A., J.L. EASTBURN and K.G. JENSEN, 1980. C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> photosynthesis in the genus *Mollugo* : Structure, physiology and evolution of intermediate characteristics. *Amer. J. Bot.*, **67** : 1207-1217.
- KORTSCHAK H.P., C.E. HARTT and G.O. BURR, 1965. Carbon dioxide fixation in sugar-cane leaves. *Plant. Physiol.*, **40** : 209-213.
- KREMER B.P. and R. BERKS, 1978. Photosynthesis and carbon metabolism in marine and freshwater diatoms. *Z. Pflanzenphysiol.*, **87** : 149-165.
- KREMER B.P., 1981a. Aspects of carbon metabolism in marine macroalgae. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, **19** : 41-94.
- KREMER B.P., 1981b. Dark reactions of photosynthesis. In : Physiological bases of phytoplankton ecology, T. Platt ed. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sciences*, **210** : 44-54.
- LANE M. and H.M. MIZIORKO, 1978. Mechanism of action of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. In : Photosynthetic carbon assimilation. Basic life Sciences vol. 11. H.W. Siegelman and G. Hind eds. Plenum Press, 19-40.
- LERMAN J.C., 1975. How to interpret variations in the carbon isotope ratio of plants : biologic and environmental effects. In : Environmental and biological control of photosynthesis. R. Marcelle ed. W. Junk B.V., 323-335.
- LI W.K.W., H.E. GLOVER and I. MORRIS, 1980. Physiology of carbon photo-assimilation by *Oscillatoria thiebautii* in the Caribbean Sea. *Limnol. Oceanogr.*, **25** : 447-456.
- LI W.K.W. and W.G. HARRISON, 1982. Carbon flow into the end products of photosynthesis in short and long incubations of a natural phytoplankton population. *Mar. Biol.*, **72** : 175-182.
- LORIMER G.H., M.R. BADGER and H.W. HELDT, 1978. The activation of ribulose -1,5- biphosphate carboxylase/oxygenase. In : Photosynthetic carbon assimilation. Basic Life Sciences, vol. 11, H.W. Siegelman and G. Hind eds. Plenum Press, 283-306.
- MARUYAMA H., R.L. EASTERDAY, H.C. CHANG and M.D. LANE, 1966. The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate. I. Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.*, **241** : 2405-2412.
- MORRIS I., 1980. Paths of carbon assimilation in marine phytoplankton. In : Primary Productivity in the Sea. Falkowski P.G. ed; Plenum press., 139-159.
- MORRIS I. and K. FARRELL, 1971. Photosynthetic rates, gross patterns of carbon dioxide assimilation and activities of ribulose diphosphate carboxylase in marine algae at different temperatures. *Physiol. Plant.*, **25** : 372-377.
- MORRIS I., H.E. GLOVER and C.S. YENTSCH, 1974. Products of photosynthesis by marine phytoplankton : the effect of environmental factors on the relative rates of protein synthesis. *Mar. Biol.*, **27** : 1-9.
- MORRIS I. and W. SKEA, 1978. Products of photosynthesis in natural populations of marine phytoplankton from the gulf of Maine. *Mar. Biol.*, **47** : 303-312.
- MORRIS I. and H. GLOVER, 1981. Physiology of photosynthesis by marine coccoid cyanobacteria some ecological implications. *Limnol. Oceanogr.*, **26** : 957-961.
- MORRIS I., A.E. SMITH and H.E. GLOVER, 1981. Products of photosynthesis in phytoplankton off the Orinoco river and in the Carribean Sea. *Limnol. Oceanogr.*, **26** : 1034-1044.
- MORRIS I. and M. DARLEY, 1982. Physiology and biochemistry of algae : introduction and bibliography. In : Selected papers in phycology, II Bd., by J.R. Rosowski and B.C. Parker. Pub. by Phycological society of american Inc. Kansas.
- MUKERJI D. and I. MORRIS, 1976. Photosynthetic carboxylating enzymes in *Phaeodactylum tricornutum* : Assay, methods and properties. *Mar. Biol.*, **36** : 199-206.
- MUKERJI D. and I. MORRIS, 1978. Measurement of carboxylases (RuDP case and PEP case) in cell suspensions of *Phaeodactylum tricornutum* treated with organic solvents. *Z. Pflanzenphysiol.*, **90** : 95-99.
- MUKERJI D., H.E. GLOVER and I. MORRIS, 1978. Diversity in the mechanism of carbon dioxide fixation in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, **14** : 137-142.
- PAASCHE E., 1971. Effect of ammonia and nitrate on growth, photosynthesis, and ribulose diphosphate carboxylase content of *Dunaliella tertiolecta*. *Physiol. Plant.*, **25** : 294-299.
- PARDUE J.W., R.S. SCALAN, C. VAN BAALEN and P.L. PARKER, 1976. Maximum carbon isotope fractionation in photosynthesis by a blue-green algae and a green algae. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **40** : 309-312.
- PARK R. and S. EPSTEIN, 1960. Carbon isotope fractionation during photosynthesis. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **21** : 110-126.
- PARK R. and S. EPSTEIN, 1961. Metabolic fractionation of C<sup>13</sup> and C<sup>12</sup> in plants. *Plant Physiol.*, **36** : 133-138.
- PLATT T., D.V. SUBBA RAO, J.C. SMITH, W.K. LI, B. IRWIN, E.P.W. HORNE and D.D. SAMEOTO, 1983. Photosynthetic

- cally competent phytoplankton from the aphotic zone of the deep Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **10** : 105-110.
- PUGH P.R., 1975. Variations in the biochemical composition of the diatom *Coscinodiscus eccentricus* with culture age and salinity. *Mar. Biol.*, **33** (3).
- RATHNAM C.K.M. and R. CHOLLET, 1979. Photosynthetic carbon metabolism in *Panicum milioides*, a C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate species : evidence for a limited C<sub>4</sub> dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem. Biophys. Acta*, **548** : 500-519.
- RAU G.H., R.E. SWEENEY and I.R. KAPLAN, 1982. Plankton <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ratio changes with latitude : differences between northern and southern oceans. *Deep Sea Res.*, **29** : 1035-1039.
- RAVEN J.A., 1970. Exogenous inorganic carbon sources in plant photosynthesis. *Biol. Rev.*, **45** (2) : 167-222.
- RAVEN J.A., 1974. Carbon dioxide fixation. In: *Algal physiology and biochemistry*. W.O.P. Stewart ed. Berkeley Univ. California press., 434-455.
- RAVEN J.A. and J. BEARDALL, 1981. Respiration and photorespiration. In: *Physiological bases of phytoplankton ecology*. T. Platt ed., *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.*, **210** : 55-82.
- REIBACH P.H. and C.R. BENEDICT, 1977. Fractionation of stable carbon isotopes by phosphoenolpyruvate carboxylase from C<sub>4</sub> plants. *Plant Physiol.*, **59** : 564-568.
- SACKETT W.M., W.R. ECKELMANN, M.L. BENDER and A.W.H. BE, 1965. Temperature dependence of carbon isotopes in marine plankton and sediments. *Science*, **148** : 235.
- SMITH A.E. and I. MORRIS, 1980 (a). Synthesis of lipid during photosynthesis by phytoplankton of the Southern Ocean. *Science*, **207** : 197-199.
- SMITH A.E. and I. MORRIS, 1980 (b). Pathways of carbon assimilation in phytoplankton from the Antarctic Ocean. *Limnol. Oceanogr.*, **25** : 865-872.
- SMITH B.N. and S. EPSTEIN, 1971. Two categories of <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ratios for higher plants. *Plant Physiol.*, **47** : 380-384.
- SMITH J.C., T. PLATT and W.G. HARRISON, 1983. Photoadaptation of carboxylating enzymes and photosynthesis during a spring bloom. *Prog. Oceanogr.*, **12** : 425-459.
- SMITH J.C., T. PLATT, W.K.W. LI, E.P.W. HORNE, W.G. HARRISON, D.V. SUBBA RAO and B.D. IRWIN, 1985. Arctic marine photoautotrophic picoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **20** (3) : 207-220.
- TRENCH R.K. and C.R. FISHER, 1983. Carbon dioxide fixation in *Symbiodinium microadriaticum* : problems with mechanisms and pathways. In: *Endocytobiology*. Ed. by H.E.A. Schenk and W. Schwemmler Berlin : Walter and Gruyter & CO.
- TROUGHTON J.H., 1971. Aspects of the evolution of the photosynthetic carboxylation reaction in plants. In: *Photosynthesis and Photorespiration*. M.D. Hatch, C.B. Osmond, R.O. Slatyer eds. *Wiley Interscience*, 124-129.
- WALLEN D.G. and G.H. GEEN, 1971a. Light quality in relation to growth photosynthetic rates and carbon metabolism in two species of marine plankton algae. *Mar. Biol.*, **10** : 34-43.
- WALLEN D.G. and G.H. GEEN, 1971b. The nature of the photosynthate in natural phytoplankton populations in relation to light quality. *Mar. Biol.*, **10** : 157-168.
- WENDT I., 1968. Fractionation of carbon isotopes and its temperature dependence in the system CO<sub>2</sub> gas-CO<sub>2</sub> in solution and HCO<sub>3</sub>-CO<sub>2</sub> in solution. *Earth. Planet. Sci. Lett.*, **4** : 64-68.
- WHELAN T., W.M. SACKETT and C.R. BENEDICT, 1973. Enzymatic fractionation of carbon isotopes by phosphoenolpyruvate carboxylase from C<sub>4</sub> plants. *Plant Physiol.*, **51** : 1051-1054.
- WONG W.W.L., 1976. Carbon isotope fractionation by marine phytoplankton. *PhD thesis Texas A & M University*, 116 p.
- WONG W.W. and W.M. SACKETT, 1978. Fractionation of stable carbon isotopes by marine phytoplankton. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **42** : 1809-1815.
- WONG W.W., C.R. BENEDICT and R.J. KOHEL, 1979. Enzymatic fractionation of the stable carbon isotopes of carbon dioxide by ribulose -1,5- bisphosphate carboxylase. *Plant Physiol.*, **63** : 852-856.

Reçu le 19 février 1985; accepté le 15 avril 1985

Received, February 19, 1985; accepted April 15, 1985



# SURVIVAL AND GROWTH OF *MOLGULA SOCIALIS* ALDER, 1863 AT DIFFERENT TEMPERATURE-SALINITY COMBINATIONS\*

R. BRUNETTI (1), L. BEGHI (2), M.G. MARIN (3), M. BRESSAN (3)

(1) Dipartimento di Biologia, Università di Padova  
Via Loredan 10, 35131 Padova, Italy

(2) Seminario Matematico, Università di Padova,  
Bia Belzoni 7, 35131 Padova, Italy

(3) Stazione Idrobiologica, Università di Padova,  
Sestiere Canali 3, 30015 Chioggia, Italy

ÉCOLOGIE EXPÉRIMENTALE  
*MOLGULA SOCIALIS*  
LAGUNE DE VENISE

RÉSUMÉ. — Les effets conjugués de la température et de la salinité sur *Molgula socialis* Alder, 1863 de la Lagune de Venise ont été étudiés sur deux séries d'échantillons; l'une constituée d'animaux « jeunes » âgés de trois jours (paroi branchiale avec protostigmates), l'autre d'animaux adultes âgés d'un mois (paroi branchiale avec stigmates définitifs). L'expérience dura 15 jours; des températures de 5° à 35 °C et des salinités de 15 ‰ à 45 ‰ furent testées. A la fin de l'expérience, les dimensions du corps des animaux et pour les jeunes celles du sac rénal ont été mesurées. Les « surfaces de réponse » du taux de survie des jeunes et des adultes ont été évaluées en soumettant les données à une régression polynomiale aux moindres carrés. Les résultats montrent que les animaux jeunes sont plus résistants aux températures élevées que les adultes qui supportent mieux des températures plus basses. Une interaction négative entre température et salinité a également été soulignée; l'intervalle optimal de tolérance de la salinité est situé entre 25 ‰ et 40 ‰.

EXPERIMENTAL ECOLOGY  
*MOLGULA SOCIALIS*  
LAGOON OF VENISE

ABSTRACT. — Combined effects of temperature and salinity on *Molgula socialis* Alder, 1863 from the Venetian Lagoon have been studied in two series of experimental samples. The first one consisted of young animals three days old (branchial wall with protostigmata), the second one of animals more than one month old (branchial wall with definitive stigmata). The experiment lasted 15 days; temperatures from 5° to 35 °C and salinities from 15 ‰ to 45 ‰ were tested. At the end of the experiment size of the body and for young animals, those of the renal sac were measured. The percentages of survival were processed in order to obtain a response surface. The species is more eurytherm than euryhaline, and the young individuals are very resistant to high temperature; on the contrary the adults exhibit a greater tolerance of low temperatures. On both parameters survival rate and growth, there is a weak temperature-salinity interaction of the type high-low. The greatest tolerated range of salinity is from 25 ‰ to 40 ‰.

(\*) This investigation was supported by grants from MPI (Ministry of Public Education).

## INTRODUCTION

In all members of the Molgulidae family a puzzling organ, the renal sac, is present, in which complex calcareous deposits (Saffo and Lowenstam, 1978) are found. The meaning of these structures is uncertain (Saffo, 1978), but recent works (Miller and Packer, 1977; Gaill and Lasserre, 1977) suggest that they could play a role in osmoregulation.

The combined effect of temperature and salinity on *Molgula socialis* Alder 1863, a largely diffused species of the Venetian Lagoon (Brunetti and Menin, 1977) is presented in this paper, as a necessary preliminary work to further studies on its possible osmoregulatory power.

## MATERIAL AND METHODS

*M. socialis* Alder and *M. manhattensis* De kay are very similar species, frequently considered as synonymous; they morphologically differ only as far as gonad structure is concerned (Monniot, 1969). Electrophoretic analyses (Bisol *et al.*, in preparation) evidenced a degree of biochemical difference, according to Nei technique, as found in the presence of different species.

Two experimental series were considered. The first one consisted of three day old animals with horizontal protostigmata in their branchial wall, the second one of more than one month old animals with definitive protostigmata, we labelled the two series as « young » and « adult » animals respectively. They were obtained on glass slabs by metamorphosis of larvae generated from artificially fecundated animals collected in the lagoon.

Before treatment the animals were maintained in aquaria with continuously flowing water at  $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperature and 30-35 ‰ salinity.

On the first series 49 different thermo-haline combinations were tested (Table I) and 35 on the second one (Table II). The treatment lasted 15 days.

The animals were gradually brought to the experimental conditions over a period of 12 hours. The experiments were carried out in thermostated three liter containers. Water was renewed every 24 hours and food consisted of *Dunaliella sp.* Salinity variations were obtained by adding either distilled water or salt for artificial sea water to filtered sea water.

At the end of treatment the mortality rate was registered and in young animals the body and renal sac dimensions were measured. Due to the elliptic shape of the animals, their size (variable x) was expressed as the product of axes; for the sake of homogeneity that of renal sac was evaluated in the same way.

Table I. — Percent mortality at the 15th day in the samples of young animals. In italic characters the sample size.

T°C	5	10	15	20	25	30	35
S‰ <sub>100</sub>	<i>15</i>	<i>20</i>	<i>16</i>	<i>18</i>	<i>20</i>	<i>21</i>	<i>20</i>
15	100	100	75	38.88	100	100	100
20	<i>14</i>	<i>20</i>	<i>16</i>	<i>24</i>	<i>20</i>	<i>30</i>	<i>25</i>
	100	100	62.5	16.66	90	100	100
25	<i>21</i>	<i>19</i>	<i>28</i>	<i>25</i>	<i>26</i>	<i>30</i>	<i>21</i>
	80.95	63.15	3.57	0	11.53	100	100
30	<i>25</i>	<i>31</i>	<i>21</i>	<i>23</i>	<i>26</i>	<i>20</i>	<i>20</i>
	48	45.16	0	0	8	80	100
35	<i>25</i>	<i>23</i>	<i>25</i>	<i>24</i>	<i>24</i>	<i>25</i>	<i>27</i>
	52	47.82	0	0	4.16	52	100
40	<i>14</i>	<i>20</i>	<i>18</i>	<i>13</i>	<i>22</i>	<i>15</i>	<i>22</i>
	100	55	50	15.38	63.6	60	100
45	<i>25</i>	<i>28</i>	<i>13</i>	<i>14</i>	<i>20</i>	<i>17</i>	<i>25</i>
	100	85.71	61.53	64.28	95	100	100

Table II. — Percent mortality at the 15th day in the samples of adult animals. In italic characters the sample size.

T°C	7	10	18	25	30
S‰ <sub>100</sub>	<i>22</i>	<i>28</i>	<i>24</i>	<i>23</i>	<i>22</i>
15	100	100	4.2	100	100
20	<i>29</i>	<i>24</i>	<i>23</i>	<i>23</i>	<i>27</i>
	100	0	0	13	100
25	<i>24</i>	<i>24</i>	<i>22</i>	<i>24</i>	<i>20</i>
	0	0	0	4.2	100
30	<i>22</i>	<i>24</i>	<i>23</i>	<i>21</i>	<i>25</i>
	0	0	0	14.3	100
35	<i>25</i>	<i>22</i>	<i>23</i>	<i>24</i>	<i>22</i>
	0	0	0	12.5	100
40	<i>23</i>	<i>22</i>	<i>23</i>	<i>22</i>	<i>22</i>
	17.4	0	8.7	9.1	100
45	<i>22</i>	<i>24</i>	<i>25</i>	<i>24</i>	<i>23</i>
	100	4.2	4	25	100

In order to single out a possible differential growth of the organ versus the whole animal size, the following statistical analyses were performed on the data (Tabl. III, 1) : after having pooled together the zero mortality samples from the optimal survival area (temperatures of 15 °C and 20 °C, salinities of 30 ‰ and 35 ‰) a linear regression between y and x variables was first performed (Table III, 1, Sect. A). Then, for every treatment lying outside the optimal area, the experimental y values were compared by means of the variance analysis with those obtained through the linear relationship of Table III, 1, Sect. A. The results are summarized in Table III, 1, Sect. B.

In both young and adult animals data referring to mortality rate were finally processed according to the response surface procedure (Box, 1954; Box and Youle, 1955; Alderdice, 1972) : the percent mortality m was expressed as a polynomial function of 2nd degree of the environmental parameters T (temperature in °C) and S (‰ salinity); the regression coefficients were obtained according to a least squares procedure (Draper and Smith, 1966). Contour lines (ellipses) for m = 50 % and m = 80 % were then drawn, thus evidencing the optimal survival area.

Table III. — 1, sect. A : linear regression of variable Y (renal sac size, mm<sup>2</sup>), with respect to variable X (body size, mm<sup>2</sup>) within the optimal survival area (T : 15 °C, 20 °C; S : 30 ‰, 35 ‰). Sect. B : comparisons between experimental values of Y and those estimated through linear relationship Y = bX + c (Sect. A), within samples lying at the border or outside the optimal survival area, by means of the analysis of variance. For each sample the value of F ratio and the degrees of freedom are given. \* significant difference with p slightly above 0.05; \*\* significant difference (p ≤ 0.05); \*\*\* significant difference (p ≤ 0.01); 2, sect. A : means body size X (mm<sup>2</sup>) of young animals, standard deviation s, sample size n of the experimental samples. Sect. B : comparisons between mean body sizes X of experimental samples of young animals at the same temperature and salinities 30 ‰ and 35 ‰ respectively by means of the Kruskal-Wallis test (Sokal and Rohlf, 1981). ns not significant (p > 0.05), \* significant difference (p ≤ 0.05).

1 Sect. A					
Y = bX + c					
b = 0.0433 ; c = 2.6.10 <sup>-5</sup> ; correlation coefficient, r = 0.95 ; sample size, n = 75					
Sect. B					
T°C	10	15	20	25	
S‰					
15			18.96 (1/20)		***
20		7.16 (1/10)	48.31 (1/32)		**
25				17.01 (1/36)	***
30	11.28 (1/30)			32.40 (1/36)	***
35	11.55 (1/20)				***
40		5.02 (1/8)	7.30 (1/8)		*
2 Sect. A					
T°C	5	10	15	20	25
S‰					
n			20	20	19
25 X			5.50	6.51	5.48
s			1.89	4.70	1.64
n	12	16	19	18	19
30 X	7.71	23.04	20.15	47.9	14.71
s	1.93	5.22	12.38	15.25	5.40
n	9	11	19	19	19
35 X	10.78	20.24	28.14	38.32	33.26
s	3.32	7.45	8.14	19.92	18.65
Sect. B					
30	ns	ns	ns	ns	*
35					

**RESULTS**

**Survival**

The results of treatment on the experimental samples are summarized in Tables I and II. In both series the center of the optimal area (Fig. 1) turned out to lie at a temperature between 16 °C and 19 °C and at a salinity between 30 ‰ and 33 ‰, with only a slight interaction of the high-low type. The almost circular shape of the contour lines in the case of young animals indicates an equal influence of the two considered environmental parameters. Adults on the contrary appear to be more influenced by temperature.

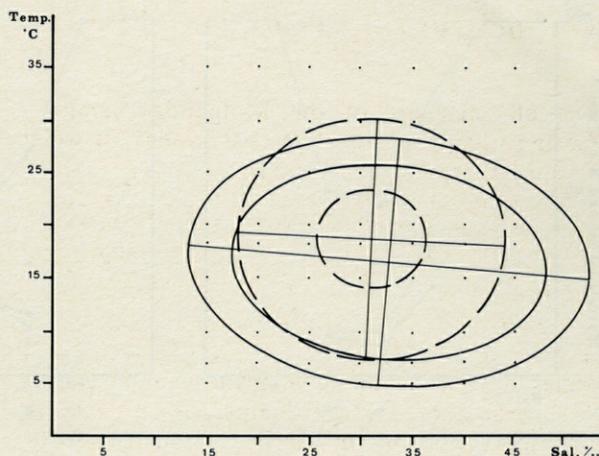


Fig. 1. — Response surfaces of survival rate P as a polynomial function of 2nd degree of temperature T (°C) and salinity S (‰) for young (broken line) and adult (solid line) animals. Only contour lines at P = 50 % and P = 80 % are drawn. Polynomial regression; young animals: P = 316.54 - 20.25 T - 13.29 S + 0.27 T<sup>2</sup> + 0.006 T S + 0.2 S<sup>2</sup>; r<sup>2</sup> = 0.71; deg = 87.09; centre : T = 18.66, S = 30.99; adults : P = 373.75 - 20.25 T - 14.40 S + 0.56 T<sup>2</sup> + 0.06 TS + 0.21 S<sup>2</sup>; r<sup>2</sup> = 0.74; deg. 85.16; centre : T = 16.46, S = 32.62; r<sup>2</sup> = explained variance / total variance ratio for the considered polynomial regression; inclination of the major axis of the contour lines (ellipses) with respect to the abscissa, in degrees.

The resistance of adults to the experimental conditions is greater than that of young animals : for these the zero mortality area is practically restricted to a point (Fig. 1).

**Growth**

In Figure 2 the mean values of body and renal size of young animals are plotted against salinity, for the different temperatures.

In order to better evaluate these results, we must also take into account the mortality rates and the general living conditions of survivors as well, as they can be inferred by morphologic observations.

In the samples with salinity higher than 40 ‰ a space was seen between the visceral mass and tunic : in the absence of histological preparations, we believe that the hypertonic environment caused dehydration almost exclusively of the tissues internal to the tunic, so that they would be disconnected from the latter, presumably at the level of the mantle. The tunic would be relaxed, thus hiding the dehydration effect on the animal's size.

During these observations the presence of food in the intestinal lumen, which is a sign of filtrating activity, was noticed (Fig. 2).

In hypotonic environment the animals inflate; this phenomenon takes place at temperatures from 15 °C to 25 °C, for salinities under 25 ‰. At extreme

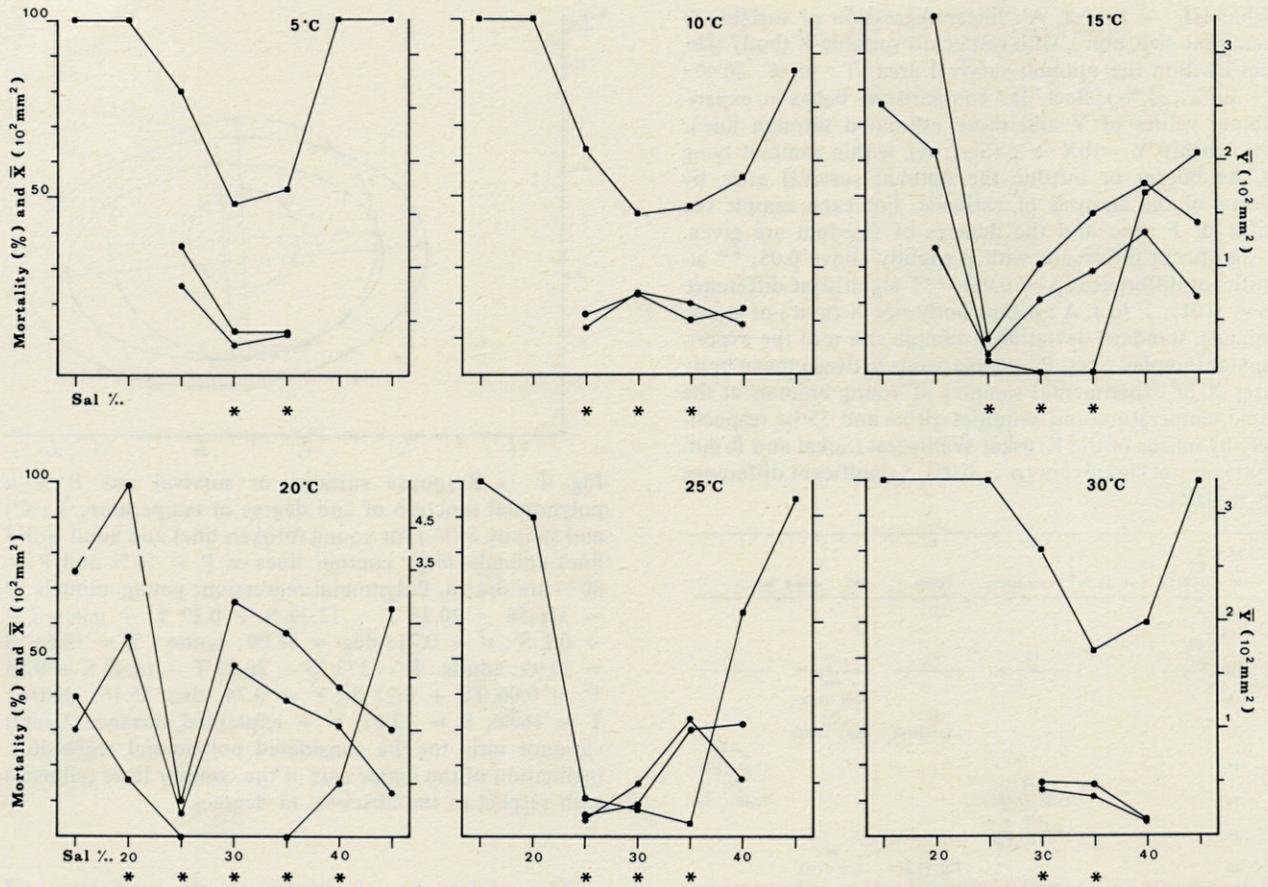


Fig. 2. — Mortality (squares), body size (stars) and renal sac size (points) in all samples of young animals. Asterisks indicate the presence of food in the internal loop.

temperatures (5, 10, 30 °C) the phenomenon is already noticed at salinities under 25 ‰.

The size of the renal sac follows that of the entire animal, but at low salinities it grows much more; even though less marked, this phenomenon appears also at the 40 ‰ salinity (Table III, 1).

In Figure 2 the mean values of body size are plotted against temperature, for salinities S = 25, 30, 35 ‰ (corresponding to a mortality rate under 50 %) (Table III, 2). These results confirm the high-low type of interaction already found for mortality; the optimal temperature (maximal growth) is 20 °C.

A statistical comparison between samples at 30 ‰ and 35 ‰ salinities (non parametric Kruskal-Wallis test) (Sokal and Rohlf, 1981) shows a not significant effect of salinity with exception of samples at a temperature of 25 °C (Table III, 2 B).

**DISCUSSION**

Even though the optimality conditions for survival more or less coincided in young and adult animals, a slightly greater tolerance of young

molgulae to high temperature and a considerable resistance of adults to the low ones are evidenced. This is understandable for a species with a spring-summer reproductive period and in which part of

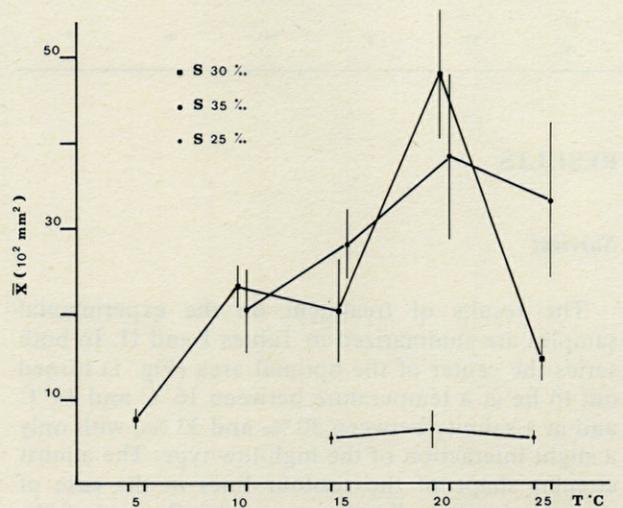


Fig. 3. — Mean body size ( $\text{mm}^2$ ) and confidence interval ( $p = 0.05$ ) at the end of experiment in samples of animals with 50 % mortality.

the population winters to reproduce the following year (Sabbadin, 1957). The tolerance exhibited by adults at low temperature contradicts the hypothesis suggested by Brunetti and Menin (1977) of a strong mortality in winter. The population decrease observed by these authors is probably due to a drop of biomass caused by the death of larger specimens (which are therefore the older ones), that reproduced in the previous season. Most of the new generation animals wintering to reproduce the next year were not noticed because of their small size for the adopted sampling technique.

Thermo-haline values for survival and growth rate indicate that the species is strongly eurytherm and moderately euryhaline, and therefore well adapted to a coastal environment and not that well to an estuarine one.

The abundant population of *M. socialis* in the Venetian Lagoon (Brunetti and Menin, 1977) is due to the hydrological characteristics of this basin, where for a great extension haline excursions are damped (Brunetti *et al.*, 1984).

Finally our data indicate that the lowest salinity value tolerated by the species is 25‰; this fact differentiates *M. socialis* from *M. manhattensis*, that seems to tolerate much lower salinities (Millar, 1971; Kott, 1976; Nakauchi and Hajihara, 1981).

## BIBLIOGRAPHIE

- ALDERDICE D.F., 1972. Factor combinations. Responses of marine poikilotherms to environmental factors acting in concert. *In*: Kinne, O. (ed.), *Marine ecology*, 1 (3) 1659-1722: Wiley, London.
- BISOL P.M., E. BETTIO, A. VALENTI. Distanza genetica tra *Molgula socialis* e *M. manhattensis* (in preparation).
- BOX G.E.P., 1954. The exploration and exploitation of response surface: some general consideration and examples. *Biometrics*, 10: 16-60.
- BOX G.E.P., P.V. YOULE, 1955. The exploration and exploitation of response surfaces: an example of the link between the fitted surface and the basic mechanism of the system. *Biometrics*, 11: 287-323.
- BRUNETTI R., F. MENIN, 1977. Ascidiens of the Laguna Veneta. II. Distribution and ecological observations. *Boll. Zool.*, 44: 337-352.
- BRUNETTI R., BEGHI L., BRESSAN M., M.G. MARIN, 1984. Study of the pollution in the Venetian Lagoon's lower basin during the period 1974-1981. *Riv. Idrobiol.*, 22 (1): 27-58.
- DRAPER N.R., H. SMITH, 1966. Applied regression analysis, J. Wiley, New York, pp. 128-159.
- GAILL F., P. LASSERRE, 1977. Modifications osmotiques dans le sang et l'urine de l'Ascidie *Molgula manhattensis* (Ascidiacea) adaptée à différentes salinités. *C.R. Séan. Hebd. Acad. Sci. Paris*, 285 (ser. D): 1343-1346.
- KOTT P., 1976. Introduction of the North Atlantic ascidian *Molgula manhattensis* (De Kay) to two Australian river estuaries. *Mem. Qd. Mus.*, 17 (3): 449-455.
- MILLAR R.H., 1971. The biology of Ascidiens. pp. 1-100. *In*: Russel *et al.*, (ef.), *Advance in marine biology*, 9, Academic Press, London & New York.
- MILLER M.A., R.K. PACKER, 1977. A structural and functional study of the role of the renal sac ionic regulation in the tunicate *Molgula manhattensis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 57 (A): 423-427.
- Monniot, C., 1969. Les Molgulidae des mers européennes. *Mém. Mus. nat. Paris, Zool.*, 60: 171-272.
- NAKAUCHI M., T. HAJIHARA T., 1981. Notes on *Molgula manhattensis* (a solitary ascidian) in Japanese waters: its new localities, growth, and oxygen consumption. *Rep. USA mar. biol. Inst.*, 3: 61-66.
- SABBADIN, A., 1957. Il ciclo biologico di *Ciona intestinalis* (L.), *Molgula manhattensis* (De Kay) e *Styela plicata* nella Laguna Veneta. *Archo. Oceanogr. Limnol.*, 11 (1): 1-28.
- SAFFO M.B., 1978. Studies on the renal sac of the ascidian *Molgula manhattensis*. I. Development of the renal sac. *J. Morph.*, 155: 287-310.
- SAFFO M.B., et H.A. LOWENSTAM, 1978. Calcareous deposits in the renal sac of a molgulid tunicate. *Science*, 200: 1166-1168.
- SOKAL R.R., and F.J. ROHLF, 1981. Biometry (II. Ed.), Freeman & Co., S. Francisco, p. 859.

Reçu le 17 juillet 1984; received July 17, 1984  
 Accepté le 12 octobre 1984; accepted October 12, 1984



# INFLUENCE DE FACTEURS EXTERNES SUR LE DÉVELOPPEMENT GEMMULAIRE D'UNE DÉMOSPONGE MARINE

*Influence of external factors on the gemmular development  
in a marine Demosponge*

R. CONNES et M. GIL

Laboratoire de Biologie animale  
U.S.T.L., 34060 Montpellier Cedex

SUBERITES DOMUNCULA  
GEMMULES  
DÉVELOPPEMENT  
TEMPÉRATURE  
LUMINOSITÉ  
pH  
pO<sub>2</sub>  
SALINITÉ

RÉSUMÉ. — Des gemmules de la Démosponge marine *Suberites domuncula* dont les biotopes méditerranéens ne connaissent que de légères variations au cours de l'année, ont été cultivées dans différentes conditions de température, luminosité, pH, pression partielle en oxygène et surtout salinité. L'action de chaque facteur a fait l'objet d'une discussion permettant d'établir des comparaisons entre gemmules d'Eponges marines et d'eau douce. Non indispensables au déroulement complet du cycle biologique, les gemmules de *Suberites domuncula* apparaissent avant tout comme une préadaptation favorable à l'espèce pour sa survie en milieux instables. Cette hypothèse est replacée dans le contexte évolutif de la famille des Suberitidae.

SUBERITES DOMUNCULA  
GEMMULES  
DEVELOPMENT  
TEMPERATURE  
LIGHT INTENSITY  
pH  
pO<sub>2</sub>  
SALINITY

ABSTRACT. — The gemmules of the marine Demosponge *Suberites domuncula* which occur in mediterranean biotopes with only slight annual variations of environmental factors were cultivated under various conditions of temperature, photoperiod, pH, pO<sub>2</sub> and especially salinity. The action of each factor is discussed in order to compare gemmules of marine and freshwater sponges. The gemmules of *Suberites domuncula*, which are not necessary to complete the life cycle, are considered as a preadaptation for the species to survive in unstable environments. This hypothesis is discussed within the context of evolution of the family Suberitidae.

## INTRODUCTION

Parmi les nombreux modes de reproduction asexuée rencontrés chez les Métazoaires inférieurs et en particulier chez les Eponges, les gemmules représentent certainement le plus évolué. Elles sont constituées, en effet, d'une seule catégorie cellulaire rappelant les blastomères d'une morula et protégées par une épaisse couche de collagène, armée ou non de spicules. Leur forme, leur taille, leur nombre et surtout leur richesse en réserves et leur enveloppe protectrice en font des éléments parfaitement adaptés à la dissémination et à la résistance.

Si leur intérêt est évident chez les Spongillidae qui sont appelés, en raison de leur habitat en eau douce,

à subir d'importantes variations saisonnières de l'environnement, il l'est moins chez les Eponges marines. La plupart des espèces qui en sont pourvues vivent, en effet, dans des milieux dont les conditions physico-chimiques varient très peu au cours de l'année. C'est le cas, notamment, pour *Suberites domuncula* des côtes méditerranéennes.

Adhérent fortement les unes aux autres et à la surface d'une coquille unique, les gemmules de *Suberites* ont peu de chances d'être séparées et de contribuer à la dissémination de l'espèce.

Pourvues d'une enveloppe de spongine qui contrôle les relations avec le milieu extérieur, elles sont par contre susceptibles de résister à des conditions défavorables, incompatibles avec la persistance des adultes. Elles constitueraient donc un facteur de

préadaptation à la vie en milieu instables (étangs saumâtres, zones d'estuaires).

Une série d'expériences a été entreprise pour étayer cette hypothèse, en testant l'effet de plusieurs facteurs naturels sur la différenciation cellulaire et la morphogénèse.

## MÉTHODES D'ÉTUDE

Les gemmules utilisées dans nos expériences ont été prélevées dans des *Suberites* obtenues par chalutage sur les fonds marins sétois, à une profondeur de 30 à 60 m.

Ces bourgeons grossièrement sphériques, de 150 à 1 000  $\mu\text{m}$  de diamètre, adhèrent fortement entre eux ainsi qu'à la coquille de Gastéropode sur laquelle l'Eponge-mère a pris naissance. Chacun d'eux est séparé de ses voisins, de son support, et des tissus maternels, avec le maximum de précaution pour éviter toute perforation susceptible d'influer sur le développement. Compte-tenu des difficultés d'isolement complet, certaines expériences ont été réalisées à partir de petits groupes de 3 ou 4 individus. 15 à 20 gemmules sont cultivées simultanément dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre, renfermant 50 ml d'eau de mer filtrée sur millipore (0,2  $\mu\text{m}$ ) et placée durant 1 h sous une rampe U.V. afin de limiter la prolifération des microorganismes. Celle-ci étant inévitable, il s'est avéré préférable de repiquer les gemmules dans un milieu frais tous les deux jours, plutôt que de changer l'eau des boîtes.

L'état de développement des gemmules a été testé par observation au microscope stéréoscopique et au moyen de coupes à la paraffine, colorées à la laque chromique de gallocyanine.

Cette coloration permet de mettre en évidence, avant la germination 4 catégories cellulaires dont nous ne mentionnerons ici que les traits les plus caractéristiques, leur description détaillée ayant fait l'objet d'une publication antérieure (Connes et coll., 1978) :

— les thésocytes initiaux ou thésocytes primaires sont bourrés de plaquettes vitellines et ont un noyau difficilement visible (diamètre cellule : 14  $\mu\text{m}$  — diamètre noyau : 2,8  $\mu\text{m}$ );

— les thésocytes en différenciation ou thésocytes secondaires montrent un noyau volumineux et à gros nucléole, au sein d'une plage cytoplasmique claire (diamètre noyau : 3,3 à 4  $\mu\text{m}$  — diamètre nucléole : 1,5 à 2  $\mu\text{m}$ );

— les archéocytes rappellent, par leurs lysosomes notamment, ceux que l'on rencontre dispersés dans les tissus de l'adulte (diamètre cellule : 8 à 12  $\mu\text{m}$  — diamètre noyau : 3,5 à 4  $\mu\text{m}$  — diamètre nucléole : 1,5 à 2  $\mu\text{m}$ );

— les histoblastes ont un cytoplasme clair et un

noyau anucléolé (diamètre cellule : 7  $\mu\text{m}$  — diamètre noyau : 3 à 3,5  $\mu\text{m}$ ).

Le nombre de jours de culture est calculé à partir du moment où les gemmules sont extraites de l'Eponge mère et placées dans des boîtes de Pétri.

Tout résultat repose au minimum sur l'observation de 3 gemmules ayant fait l'objet de coupes sériées de 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les 10 coupes de plus fort diamètre de chaque gemmule sont examinées au microscope.

Les cellules en début de différenciation (thésocytes secondaires et archéocytes) sont comptées sur chaque coupe et la moyenne par coupe, figurant sur les tableaux, est donc établie à partir de 30 comptages. Un pourcentage de cellules en début de différenciation par rapport au nombre initial de thésocytes primaires est ensuite calculé. Ce dernier est, en moyenne, de 52 par coupe.

A partir du début de la germination, 3 stades de développement ont été définis : — stade 1 : germination en cours, — stade 2 : jeune Eponge avec spicules, mais sans oscule. — stade 3 : Eponge avec oscule.

## RÉSULTATS

### 1. Témoins

Les cultures témoins ont été réalisées dans des conditions de température, de salinité, de pH et d'oxygénation considérées comme optimales en fonction de résultats partiels obtenus au cours d'essais préalables : température : 18 °C — salinité : 37 ‰ pH : 7 — pO<sub>2</sub> : 160 torrs.

Au bout de 12 j, la morphogénèse est déjà bien ébauchée et un mois après le début de la mise en culture, il ne reste plus que quelques thésocytes au fond des coques (Tabl. I). Les cellules à gros noyau nucléolé observées dès les premières heures de la

Tabl. I. — Evaluation quantitative et qualitative du développement gemmulaire en conditions optimales.

*Quantitative and qualitative estimation of gemmular development under optimal conditions.*

Nbre de jours	Nbre de cellules en début de différenciation	% de cellules en début de différenciation par rapport aux thésocytes initiaux	Observations
0	1	1,9 %	Gemmules au repos
2	3	5,8 %	Début de différenciation non significatif
4	9	17,3 %	Nette amorce de différenciation dans la région micropylaire
5	11	21,1 %	Premières mitoses
6	17	32,7 %	Apparition d'histoblastes
8	26	50 %	Premières germinations
10	35	67,3 %	Nombreuses germinations

mise en culture correspondent à des thésocytes primaires n'ayant pas achevé leur maturation plutôt qu'à des thésocytes secondaires. Même au moment de leur prélèvement, en effet, les gemmules ne sont jamais composées à 100 % de thésocytes quiescents rigoureusement identiques.

## 2. Action de la température

Des gemmules fraîchement extraites de l'Eponge mère sont placées dans des conditions différentes de température et des gemmules ayant subi un refroidissement ou un réchauffement de 1 à 4 j sont replacées dans des conditions optimales. La salinité est maintenue dans les deux cas à 37 ‰.

1. A 6 °C, on n'observe aucune trace de différenciation et de germination, même après 2 mois de culture (Tabl. II, A). A 10 °C, la différenciation est ébauchée au bout d'un mois; aucune germination ne se produit par la suite. A 29 °C, les thésocytes ne sont rapidement altérés et il n'y a ni différenciation, ni germination.

Avec une salinité de 37 ‰, les températures favorables au développement gemmulaire sont donc comprises entre 13 et 21 °C, avec un optimum entre 18 ° et 21 °C. Le taux de germination est alors de 90 à 100 %. Dans ces conditions optimales, le laps de temps entre le début de la différenciation et la germination est toujours de 6 jours.

2. Des gemmules conservées à 6 °C pendant 1, 2 3 ou 4 jours après leur extraction, se comportent comme des gemmules fraîchement extraites lorsqu'on les replace dans des conditions optimales. Par contre, si le séjour au froid est prolongé au-delà du quatrième jour, le pourcentage de germination décroît.

Des gemmules maintenues pendant les mêmes durées à 29 °C ne récupèrent pas leurs capacités morphogénétiques lorsqu'elles sont replacées à 18 °C ou 21 °C.

## 3. Action de la luminosité

Des cultures ont été maintenues à l'obscurité totale, avec une photopériode de 10 h de jour/14 h de nuit ou de 12 h de jour/12 h de nuit (température : 17 °C; salinité : 37 ‰).

Dans tous les cas, 85 % des gemmules ont germé au bout de 10 j.

## 4. Action du pH

Le pH du milieu de culture non modifié était de 6,8 à 7. En maintenant la température à 18 °C et la salinité à 37 ‰, ce milieu a été acidifié par addition d'HCl ou alcalinisé par addition de NaOH.

Tabl. II. — A, Influence de la température sur le déclenchement de la différenciation et de la germination; B, variation du taux de germination en fonction du pH.

A, Influence of temperature on the releasing of differentiation and germination; B, variation of the germination rate according to the pH.

A		
T °C	Début de différenciation	Début de germination
6°	—	—
10°	1 mois	—
13°	7 jours	16 jours
16°	5 jours	10-11 jours
18°	4 jours	9-10 jours
21°	3 jours 1/2	9 jours
29°	—	—

B	
pH	Taux de germination
< 5	nul
5 < pH < 6	très faible
6,8 < pH < 7,5	maximum
7,5 < pH < 8,5	moyen
> 9	nul

Les résultats du Tableau II, B, bien que non quantifiés, montrent que les gemmules de *Suberites* sont plus sensibles aux pH acides que basiques.

## 5. Action de la pression partielle en oxygène (pO<sub>2</sub>)

Les cultures ont été réalisées dans des tubes à prélèvement hermétiquement fermés, contenant de l'eau enrichie en O<sub>2</sub> par barbotage d'air comprimé ou appauvrie par barbotage d'azote. La pO<sub>2</sub> du milieu témoin, ni enrichi, ni appauvri était de 160 torrs. Toutes les cultures ont été remises à une pO<sub>2</sub> de 205 au bout de 20 j.

Une chute de la pression partielle en oxygène (Tabl. III) inhibe le développement des gemmules, la limite inférieure se situant aux alentours de 125 torrs. Cette inhibition est réversible et immédiate avec une bonne oxygénation (pO<sub>2</sub> = 205 torrs).

Tabl. III. — Variation du taux de germination en fonction de la pO<sub>2</sub>.

Variation of the germination rate according to the pO<sub>2</sub>.

pO <sub>2</sub> en torrs	Taux de germination après 15 j de culture	Stade de développement au bout de 20 j	Taux de germination après remise à pO <sub>2</sub> 205 torrs
160	80 %	stades 1 et 2	20 %
205	95 %	stades 2 et 3	5 %
169	90 %	stades 2 et 3	10 %
125	20 %	stade 1	80 %
65	0 %	—	100 %

### 6. Action de la salinité

En maintenant la température à 17,5 °C, différentes salinités ont été obtenues en laissant s'évaporer de l'eau de mer naturelle ou en y ajoutant de l'eau distillée.

Trois séries de tests ont été réalisées :

— sur des gemmules n'ayant pas ébauché leur différenciation : une seule salinité ou deux salinités successives.

— sur des gemmules en différenciation : des lots de gemmules sont placés dès leur extraction dans des conditions optimales de température et de salinité (18 °C — 38 ‰) pendant des laps de temps variables leur permettant d'atteindre un stade de développement plus ou moins évolué; elles sont ensuite transférées pendant 10 j dans un milieu à 20 ‰, puis remises en conditions favorables.

— sur de jeunes Eponges.

#### 1. Action de la salinité sur des gemmules n'ayant pas ébauché leur différenciation

— Une seule salinité (Tableau IV)

Sur le plan histologique, les gemmules qui ne germent pas ne présentent ni thésocytes secondaires, ni archéocytes. Lorsque la germination est tardive, la différenciation cellulaire l'est également. Si les gemmules qui sont placées en eau douce ne sont pas altérées au cours de leur prélèvement, leurs thésocytes restent en parfait état durant les deux premiers jours.

— Deux salinités successives (Tableau V)

#### 2. Action de la salinité sur des gemmules en différenciation (Tableau V)

Plus le séjour initial à 38 ‰ est long, plus le début de la germination est tardif. Les gemmules qui ont germé (10 j) ou dépassé ce stade (20 j) sont victimes de la chute de salinité.

Le suivi histologique de la différenciation cellulaire révèle que les gemmules n'ayant subi que deux séjours à salinités différentes (10 j à 20 ‰ — 25 j à 38 ‰) manifestent un retard de 8 à 9 j par rapport aux témoins. Mais une fois amorcée, la différenciation s'effectue normalement jusqu'à la germination.

Ce même suivi permet également de constater que le séjour à 20 ‰ succédant à celui à 38 ‰ fait chuter le nombre de cellules en voie de différenciation (essentiellement des archéocytes) par rapport à celui des témoins. Cette diminution va de 44 % pour les gemmules ayant passé initialement 4 j dans une eau à 38 ‰, à 67 % pour celles qui y sont restées 10 j. Le nombre de thésocytes primaires n'augmente pas pour autant : il est au contraire plus faible que chez les témoins.

Tabl. IV. — Influence de la salinité sur le taux et le délai de germination.

*Influence of the salinity on the rate and time of germination.*

Salinité	Germination
16 ‰	0 % après 20 j
18 ‰	0 % après 20 j
20 ‰	0 % après 20 j
25 ‰	0 % après 20 j
28 ‰	6 % après 23 j
30 ‰	100 % après 13 j
33 à 38 ‰	100 % après 10 j
40 ‰	50 % après 18 j - 70 % après 25 j
42 ‰	52 % après 20 j - 80 % après 32 j
44 ‰	58 % après 18 j
48 ‰	0 % après 20 j
54 ‰	0 % après 20 j
eau douce	0 % après 20 j

Tabl. V. — A, Action d'une salinité optimale sur la germination après un séjour dans un milieu à salinité défavorable; B, influence des variations successives de salinité sur la germination.

*A, Action of optimal salinity on the germination after remaining in a medium with unfavourable salinity; B, influence of successive variations of salinity on the germination.*

A	1ère salinité	Durée du séjour	2e salinité	Durée du séjour	Germination
	16 ‰	7 j - 10 j - 20 j	37 ‰	1 mois	0 %
	18 ‰	7 j 10 j 20 j	37 ‰	24 j » »	50 % 47 % 0 %
	20 ‰	5 j 10 j 22 j	37 ‰	24 j » »	53 % 75 % 13 %
	28 ‰	7 j 10 j 24 j	37 ‰	13 j 24 j »	100 % 80 % 67 %
	48 ‰ 54 ‰	10 j 10 j	37 ‰ 37 ‰	24 j 24 j	60 % 0 %
	eau douce	1 j 1/2 3 j	33 ‰ 33 ‰	1 mois 1 mois	42 % 0 %

B	1er séjour à 38 ‰	Séjour à 20 ‰	2e séjour à 38 ‰	Germination
	0 j	10 j	25 j	90 %
	2 j	10 j	25 j	90 %
	4 j	10 j	25 j	67 %
	6 j	10 j	25 j	49 %
	10 j	10 j	25 j	46 %
	20 j	10 j	25 j	0 %

### 3. Action de la salinité sur de jeunes Eponges

Devant les difficultés rencontrées pour conserver en élevage des *Suberites domuncula* adultes, même dans les conditions les plus favorables, nous avons soumis aux mêmes variations de salinité que les gemmules, de jeunes Eponges avec ou sans oscule. Nous avons alors constaté que leur survie n'était possible qu'entre 30 et 44 ‰, c'est-à-dire dans les limites de l'éclosion gemmulaire.

## DISCUSSION

### Action de la température

Selon le rapport d'H. Tournier (1969) établi au cours de campagnes effectuées dans le golfe du Lion en 1966 et 1967, la température varie entre février et août de 10 ° 67 à 21 ° 50 en surface, de 10 ° 77 à 15 ° 24 à 25 m et de 10 ° 70 à 15 ou 16 ° à 50 m de profondeur.

Les variations annuelles sur les fonds de 50 m où sont récoltées nos Eponges sont donc de l'ordre de 5 ° et aucune de ces températures extrêmes n'est incompatible avec la survie des adultes.

Il faut noter cependant, compte tenu des résultats expérimentaux, que les températures hivernales ne permettent pas le développement de *Suberites* alors que les températures estivales lui sont, au contraire, très favorables.

Contrairement à ce qui se produit pour certaines Eponges d'eau douce comme *Ephydatia mülleri* (Rasmont, 1962) ou marines, comme *Haliclona loosanoffi* (Fell, 1974), aucune vernalisation n'est nécessaire à la germination des gemmules de *Suberites*, qui ne présentent pas de diapause. Le maintien à une faible température immédiatement après l'extraction de l'Eponge mère, constitue plutôt un handicap qu'un facteur stimulant pour la morphogénèse.

### Action de la luminosité

Brøndsted et Brøndsted (1953) ont montré que les gemmules vertes de *Spongilla lacustris*, renfermant des Zoochlorelles, germaient plus vite et à plus basse température que les gemmules brunes de la même espèce dépourvues de symbiotes. La vitesse de développement étant la même à la lumière et à l'obscurité, ce n'est certainement pas l'oxygène qui est responsable de cette différence mais probablement un facteur de croissance synthétisé par les Zoochlorelles.

Rasmont et Schmidt (1967) ont observé que les gemmules d'*Ephydatia fluviatilis*, bien que dépourvues d'algues symbiotiques, consommaient davantage d'oxygène le jour que la nuit mais ils ne mentionnent aucun fait concernant l'action de la lumière sur la germination.

Strekal et McDiffet (1974) ne notent aucune différence de comportement entre les gemmules de *Spongilla fragilis* cultivées à l'obscurité totale et celles soumises à l'alternance régulière de 12 h de jour/12 h de nuit.

Compte-tenu des faibles profondeurs auxquelles vivent les Spongillidae, il est possible que la luminosité ait dans certains cas une action sur le développement de leurs gemmules, avec ou sans intervention

d'Algues symbiotiques. Il n'en est pas de même pour les *Suberites* qui ne reçoivent, à 50 m de profondeur, qu'une faible partie de la lumière bleue.

### Action du pH

Plus sensibles aux pH acides que basiques, les gemmules de *Suberites* ont un comportement qui rappelle celui d'*Ephydatia mülleri* (Benfey et Reising, 1982). Chez cette espèce, en effet, des pH de l'ordre de 5,8 à 6,5 ne modifient en rien le taux de germination de gemmules cultivées à 20 °C mais font baisser ce dernier dans le cas d'une incubation préalable de 7 j à 5 °C.

### Action de la pO<sub>2</sub>

L'élévation de la consommation d'oxygène au cours des premières étapes du développement embryonnaire est un phénomène bien connu chez de nombreux Invertébrés. Lindohl et Holter, par exemple, ont noté dès 1940 que la consommation d'oxygène par les œufs d'Oursin doublait durant le premier quart d'heure après la fécondation. Il n'est donc pas surprenant que le même phénomène se manifeste au début de l'embryogenèse somatique correspondant au développement gemmulaire. Brøndsted et Løvtrup (1953) ont ainsi observé un accroissement de la consommation d'oxygène durant la période de prégermination chez les gemmules de *Spongilla lacustris* avec ou sans Zoochlorelles. Rasmont (1962) confirme cette observation chez *Ephydatia mülleri* dont les gemmules activées multiplient par trois leur exigence en oxygène lorsque est levée la diapause hivernale.

On comprend dans ces conditions que les gemmules de *Suberites domuncula* soient sensibles à la pression partielle en oxygène et se développent mieux et plus vite lorsque celle-ci est élevée. Le manque de ce gaz pendant une période relativement longue (25 j) ne lèse pas les éléments reproducteurs mais inhibe leur différenciation; le développement démarre dès que l'oxygénation redevient normale ou supérieure à la moyenne.

### Action de la salinité

Les limites de salinité compatibles avec l'éclosion des gemmules de *Suberites domuncula* sont de 30 à 44 ‰, valeurs qui ne sont jamais atteintes dans les zones méditerranéennes où vit cette espèce. Selon H. Tournier (1969), en effet, la salinité varie en surface de 33 à 37,75 ‰ entre février et août et, à 50 m de profondeur de 37,50 à 37,90 ‰ entre les mêmes mois. De part et d'autres de ces limites, les gemmules peuvent résister à une hyposalinité de 18 ‰ ou à une hypersalinité de 48 ‰ et germer lorsque les

conditions redeviennent optimales, si le séjour en conditions extrêmes n'a pas été trop prolongé. Le fait que les jeunes Eponges ne survivent que dans la même fourchette de salinités est en parfait accord avec ces observations.

L'histologie révèle que les gemmules incapables de germer par suite des mauvaises conditions de salinité, ne présentent ni thésocytes secondaires, ni archéocytes. Taux de germination et capacité de différenciation évoluent donc de façon parallèle. On peut ainsi penser que l'inhibition du développement gemmulaire ou tout au moins sa non-activation, se manifeste très tôt, en empêchant les thésocytes primaires de commencer leur différenciation.

La population homogène de thésocytes primaires contenue dans une gemmule fraîchement extraite étant capable de résister à une salinité de 20 ‰, il était tentant de savoir comment se comportait dans les mêmes conditions, la population hétérogène de thésocytes primaires ou secondaires et d'archéocytes d'une gemmule en voie de développement. La deuxième expérience a prouvé que les gemmules résistaient d'autant plus mal à l'hyposalinité qu'elles étaient plus différenciées.

Des cultures placées à 20 ‰ après avoir séjourné durant 20 j à 38 ‰ sont irrémédiablement lésées : le nombre de cellules différenciées est trop important, par rapport aux quelques thésocytes restant encore au fond des coques pour permettre la résistance à l'hyposalinité. Par contre, si l'incubation à 38 ‰ est limitée à 10 j, durée qui permet chez les témoins d'atteindre la germination tout en conservant un fort pourcentage de thésocytes primaires, les gemmules en phase d'éclosion sont capables de supporter une salinité de 20 ‰ pendant 10 j. On assiste donc, entre le 10<sup>e</sup> et le 20<sup>e</sup> jour de culture, à un renversement du rapport thésocytes/cellules différenciées, qui détermine une évolution à sens unique. On peut admettre, pour expliquer la deuxième situation, que le micropyle de gemmules en train d'éclore est secondairement obturé par une sécrétion de spon-gine.

Ainsi se trouverait isolé du milieu extérieur un lot de thésocytes suffisant pour redonner une Eponge dans des conditions favorables.

L'étude histologique a montré que le séjour à 20 ‰ faisait chuter le nombre d'archéocytes dans des gemmules en cours de développement après incubation à 38 ‰. Puisque le nombre absolu de thésocytes n'augmente pas corrélativement, c'est que les archéocytes sont incapables de se différencier dans ces conditions. Ils ne peuvent pas phagocyter leurs semblables pour reconstituer du vitellus somatique et ils disparaissent après s'être désintégrés. La modification des propriétés membranaires au cours de la différenciation ne leur permet certainement pas de supporter les variations de la pression osmotique liées à l'hyposalinité du milieu. Les thésocytes secondaires, par contre, effectuent un

retour en arrière et ne se distinguent plus des thésocytes primaires.

## CONCLUSION

L'intervention qui vient d'être mise en évidence de plusieurs facteurs externes sur le développement gemmulaire d'une Démospone marine, permet de mieux comprendre la finalité de la reproduction asexuée chez cette espèce. *Suberites domuncula* se rencontre dans des zones du plateau continental où les différents facteurs physico-chimiques ne subissent que de très légères variations, incapables de provoquer d'importantes vagues de mortalité. Dans des conditions écologiques aussi stables, la mort des individus doit être échelonnée dans le temps en fonction de leur âge et, compte-tenu de la durée de vie pluriannuelle de cette espèce, la reproduction sexuée suffit, a priori, pour assurer sa pérennité.

*Suberites* n'est pourtant pas à l'abri d'accidents. Associée à un Pagure qui la déplace en permanence, elle est condamnée à mourir si le Crustacé l'abandonne. Elle subit alors une putréfaction qui n'atteint pas les gemmules, comme le prouve une expérience réalisée au laboratoire et que nous n'avons pas relatée dans ce travail. Lorsque les courants d'eau ont fait disparaître les tissus nécrosés, les gemmules retrouvent des conditions d'oxygénation favorables et elles commencent à se développer.

À la suite d'une mort naturelle ou accidentelle, la reproduction asexuée assure donc la reconstitution rapide des individus et, par voie de conséquence, le maintien de la population.

Les capacités de résistance à des températures et à des salinités inconnues dans les biotopes à *Suberites domuncula* montrent, en outre, que les gemmules représentent pour cette espèce, un élément de préadaptation à la vie en milieux variables, en particulier en eaux saumâtres. Cette préadaptation est encore imparfaite.

La résistance aux basses températures est, par exemple, bien inférieure à celle des Eponges d'eau douce, peut-être en raison de la structure de la coque qui n'assure pas une bonne isolation thermique. En outre, les gemmules de *Suberites* ne présentent pas de diapause et aucune vernalisation n'est nécessaire pour lever celle-ci.

La préadaptation aux variations de salinité est, par contre, beaucoup plus évidente et doit permettre à l'espèce de subsister près de l'embouchure de certains fleuves, qui déversent de façon intermittente, d'importantes quantités d'eau douce. Aucune prospection systématique n'a été faite pour l'instant mais une telle situation se rencontre dans la région de Perpignan où *Suberites domuncula* est abondante sur les roches Torréilles dont les eaux sont parfois très déssalées par suite des apports irréguliers d'eau

douce provenant de l'Agly et de la Têt (J. Paris, communication personnelle).

Il est frappant de constater (Simpson et Fell, 1974) que trois familles seulement de Démospouges marines, les Suberitidae, les Clionidae et les Haliclonidae, fabriquent des gemmules et que, parmi elles, les Suberitidae comportent plusieurs genres et plusieurs espèces adaptées à l'eau saumâtre et même à l'eau douce. *Suberites massa* fréquente dans l'étang de Thau et la lagune de Venise et *Laxosuberites lacustris* signalée par Annandale (1915) dans le lac Chilka en sont les deux meilleurs exemples. *Laxosuberites* forme des gemmules à l'approche de la saison chaude, lorsque le niveau de l'eau baisse et que la salinité augmente. Vacelet (1959) signale que *Terpios fugax* est abondante dans la grotte de Port Miou (près de Marseille) dont les eaux sont très dessalées en raison des apports d'eau douce. Chez les Haliclonidae, *Haliclona loosanoffi*, présente tout l'année dans le « Mystic estuary » (Connecticut) ne passe l'hiver que grâce à ses gemmules dont la diapause est levée lorsque la température augmente (Fell, 1974). Elles peuvent résister, en conditions expérimentales, à des hypo- ou à des hypersalinités (Fell, 1975).

A côté de cela, comme *Suberites domuncula*, plusieurs espèces strictement marines possèdent des gemmules qui ne leur sont pas indispensables. C'est le cas chez les Suberitidae de *Suberites carnosus*, *Ficulina ficus*, *Prosuberites epiphytum* (Topsent, 1900) ou *Prosuberites microsclerus* (Wells et coll., 1964) et chez les Haliclonidae de *Haliclona oculata* (Fell, 1974).

Quelle que soit l'importance prise par les gemmules dans le cycle biologique des Eponges marines, il semble que les espèces qui en possèdent puissent s'adapter plus facilement que d'autres à de fortes variations écologiques, sans se situer pour autant exclusivement dans les zones sujettes à ces variations. Elles se comportent ainsi comme des espèces très eurythermes et très euryhalines. Deux Clionidae, par exemple, *Cliona truitti* et *Cliona vastificata*, productrices de gemmules, sont d'après Hartmann (1958) les Eponges pouvant pénétrer le plus loin dans les estuaires à faible salinité. Hopkins (1956, 1962) utilise en Caroline du Sud la distribution de certaines Cliones comme indicatrice des salinités et de leurs variations : *Cliona celata*, dépourvue de gemmules, indique une salinité élevée et stable.

Une meilleure connaissance de la répartition de *Suberites domuncula* et de son environnement physico-chimique devrait permettre de mieux cerner la voie évolutive adoptée par cette espèce pour conquérir, comme d'autres Suberitidae, des biotopes de plus en plus instables.

## BIBLIOGRAPHIE

ANNANDALE N., 1915. Fauna of the Chilka Lake sponges. *Mem. Ind. Mus.*, 5 : 23-54.

- BENFEY T.J. et H.M. REISWIG, 1982. Temperature, pH, and photoperiod effects upon gemmule hatching in the freshwater sponge, *Ephydatia mülleri* (Porifera, Spongillidae). *J. exper. Zool.*, 221 : 13-21.
- BRØNDSTED A. et H.V. BRØNDSTED, 1953. The effect of symbiotic Zoochlorellae on the germination rate of gemmules of *Spongilla lacustris*. *Vidensk. Medd. fra Dansk naturh. Foren.*, 115 : 133-144.
- BRØNSTED H.V. et E. LØVTRUP, 1953. The respiration of sponge gemmules without and with symbiotic algae. *Vidensk. Medd. fra Dansk naturh. Foren.*, 115 : 145-157.
- CONNES R., D. CARRIERE et PARIS J., 1978. Etude du développement des gemmules chez la Démospouge marine : *Suberites domuncula* (Olivi) Nardo. *Ann. Sci. Nat., Zool. Biol. animale*, 20 : 357-385.
- FELL P.E., 1974. Diapause in the gemmule of the marine sponge, *Haliclona loosanoffi*, with a note on the gemmules of *Haliclona oculata*. *Biol. Bull.*, 141 : 333-351.
- FELL P.E., 1975. Salinity tolerance and desiccation resistance of the gemmules of the brackish-water sponge, *Haliclona loosanoffi*. *J. exper. Zool.*, 194 : 409-412.
- HARTMAN W.D., 1958. Natural history of the marine sponges of southern New England. *Bull. Peabody Mus. Nat. Hist.*, 12 : 1-155.
- HOPKINS S.H., 1956. Notes on the boring sponges in Gulf Coast estuaries and their relation to salinity. *Bull. mar. Sci. Gulf Caribbean*, 6 : 44-58.
- HOPKINS S.H., 1962. Distribution of species of *Cliona* (boring sponge) on the eastern shore of Virginia in relation to salinity. *Chesapeake Sci.*, 3 : 121-124.
- LINDAHL P.E. et H. HOLTER, 1940. Respiration et fécondation chez les œufs d'Oursin. *C.R. Lab. Carlsberg Danem.*, 23 : 249-257.
- RASMONT R., 1962. The physiology of gemmulation in fresh water Sponges. *Symp. Soc. Study Develop. Growth*, 20 : 3-25.
- RASMONT R. et I. SCHMIDT, 1967. Mise en évidence du caractère photosensible de la respiration des gemmules de Spongillides. *Comp. Biochem. Physiol.*, 23 : 959-967.
- SIMPSON T.L. et P.E. FELL, 1974. Dormancy among the porifera : gemmule formation and germination in fresh-water and marine sponges. *Trans. amer. micr. Soc.*, 93 : 544-577.
- STREKAL T.A. et W.F. Mc DIFFETT, 1974. Factors affecting germination, growth and distribution of the freshwater sponge, *Spongilla fragilis Leidy* (Porifera). *Biol. Bull.*, 146 : 267-278.
- TOPSENT E., 1900. Etude monographique des Spongiaires de France III. Monaxodina (Hadromerina). *Arch. Zool. expér., gén.*, 8 : 1-331.
- TOURNIER H., 1969. Hydrologie saisonnière du golfe du Lion entre 1966 et 1967. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, 33 : 265-300.
- VACELET J., 1959. Répartition générale des Eponges et systématique des Eponges cornées de la région de Marseille et quelques stations méditerranéennes. *Rec. Trav. Stn. ma. Endoume*, 16 : 39-101.
- WELLS H.W., M.J. WELLS et I.E. GRAY, 1964. Ecology of sponges in Hatteras Harbor, North Carolina. *Ecology*, 45 : 752-767.

Reçu le 14 novembre 1984; accepté le 7 mars 1984  
Received November 14, 1984; accepted March 7, 1984



# SUR LA PRÉSENCE D'UNE ESPÈCE DU GENRE *SARCONEMA* (SOLIERIACEAE, RHODOPHYTA) EN GRÈCE

*The occurrence of a species of Sarconema  
(Solieriaceae, Rhodophyta) in Greece*

A. DIAPOULIS \*, M. VERLAQUE \*\*, P. HUVÉ \*\*  
et C.F. BOUDOURESQUE \*\*

\* Institute of Oceanographic and Fisheries Research,  
G.R.-16604, Hellinikon, Athens-Greece

\*\* laboratoire de Biologie Végétale Marine,  
Université de Luminy, 13288 Marseille cedex 2, France

*SARCONEMA SCINAIOIDES*  
RHODOPHYTA  
GRÈCE

RÉSUMÉ. — *Sarconema scinaoides* Børgesen, espèce nouvelle pour la Méditerranée, a été récoltée en abondance au voisinage d'Athènes. Une brève description des spécimens est donnée.

*SARCONEMA SCINAIOIDES*  
RHODOPHYTA  
GREECE

ABSTRACT. — *Sarconema scinaoides* Børgesen is reported for the first time in Mediterranean waters. An account of the vegetative and reproductive structure of the collected specimens is given.

## HISTORIQUE

En l'état actuel des connaissances, la famille des Solieriaceae (Gigartinales) est peu représentée en Méditerranée.

En Méditerranée occidentale, Cinelli et Guglielmi (1977) ont récolté à Collioure (Pyrénées-Orientales, France) une Solieriaceae qui, en l'absence d'organes reproducteurs, n'a pu être déterminée; par son anatomie, elle présenterait des affinités avec *Solieria chordalis* (C. Agardh) J. Agardh de l'Atlantique. Cette dernière espèce a d'ailleurs été signalée de la région de Marseille par Decrock (1914).

En Méditerranée orientale, les observations sont plus abondantes. Aleem (1948) signale, dans la région de Suez (Port-Saïd, Egypte), *Sarconema furcellatum* Zanardini. Plus tard, le même auteur rencontre également dans ce secteur *Solieria dura* (Zanardini) Schmitz (Aleem, 1950). Sur les côtes israéliennes, Rayss (1963) récolte et décrit *Sarconema filiforme* (Sonder) Kylin ainsi que *Solieria dura*. Enfin, Mayhoub (1976) retrouve ces deux dernières espèces le long des côtes syriennes.

## MATÉRIEL ÉTUDIÉ

Les spécimens étudiés ont été récoltés à Agios Kosmas, près d'Athènes (Golfe et Saronikos), dans une cuvette abritée bien éclairée, en communication avec la mer, à 0.2-0.3 m sous le zéro biologique (limite entre les étages médiolittoral et infralittoral); les espèces dominantes sont, outre le *Sarconema*, *Polysiphonia sp.*, *Stypocaulon scoparium* (Linnaeus) Kützinger, *Ceramium rubrum* (Hudson) C. Agardh, et *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamouroux. La salinité est de 38 ‰, la température moyenne de février 11-12 °C et celle de juillet 26-27 °C.

Spécimen F-1154 : récolté le 27.2.1980; tétrasporophyte.

Spécimen H-2219 : récolté le 10.4.1980; tétrasporophyte.

Spécimens H-2220, 2221 : récoltés le 6.10.1980; procarpes et gonimoblastes.

Spécimen F-1153 : récolté le 7.10.1980; procarpes et gonimoblastes.

L'ensemble de ces spécimens ont été récoltés par A. Diapoulis et sont déposés dans l'herbarium du

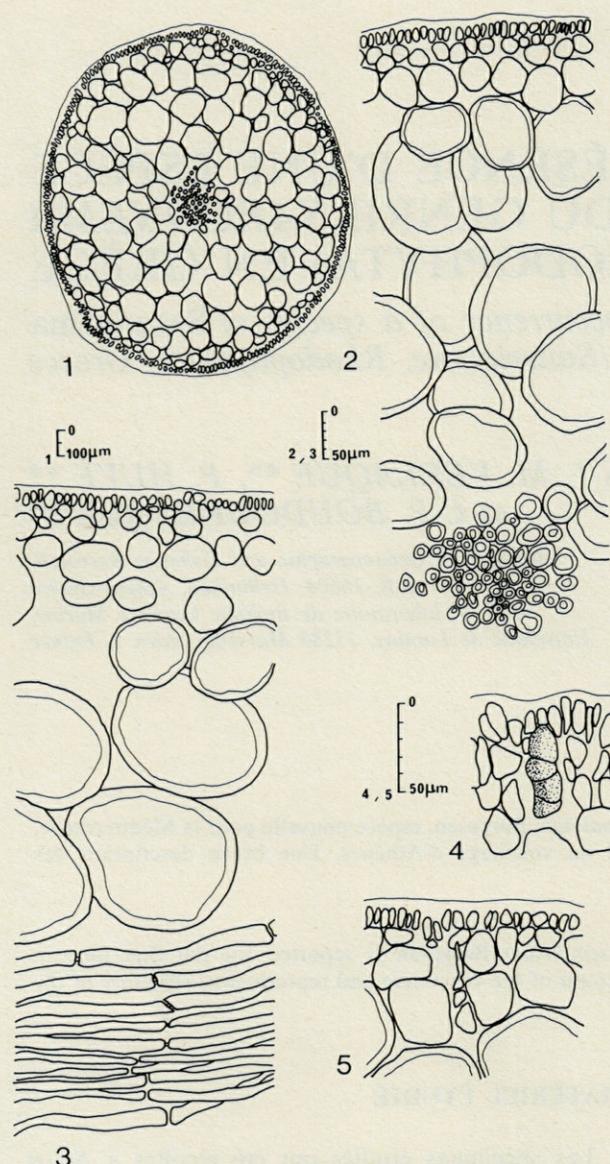


Fig. 1-5. — 1, coupe transversale d'un axe, à 7 cm de l'apex; 2, détail d'une coupe transversale; 3, détail d'une coupe longitudinale, près de la base; 4, détail d'une coupe transversale, avec tétrasporocyste; 5, détail d'une coupe transversale, avec rameau carpogonial.

1, cross section of an axis, 7 cm from the apex; 2, detail of a cross section; 3, detail of a longitudinal section, near the basis; 4, detail of a cross section, with tetrasporocyst; 5, detail of a cross section, with carpogonial branch.

Laboratoire de Biologie végétale marine de l'Université de Luminy (Marseille); des spécimens provenant des mêmes récoltes sont conservés à l'Institute of Oceanographic and Fisheries Research, Athènes.

## DESCRIPTION

Les tétrasporophytes sont constitués par des axes subcylindriques, abondamment ramifiés dans les

parties supérieures; la ramification est irrégulière à pseudodichotome; le diamètre des axes atteint 2 mm (Fig. 6). L'anatomie (Fig. 1, 2, 3), la disposition et le mode de division des tétrasporocystes (Fig. 4) sont caractéristiques de la famille des Solieriaceae (Gabrielson et Hommersand, 1982).

Les gamétophytes femelles diffèrent des précédents par leur ramification régulièrement pseudodichotome (Fig. 6); le diamètre des axes atteint également 2 mm. Par la disposition des rameaux carpogoniaux (Fig. 5), le développement et l'organisation des cystocarpes, avec notamment un pore latéral, une importante cellule de fusion de forme irrégulière, et l'absence de filaments péricarpiques, nos échantillons appartiennent au genre *Sarconema*. On remarque toutefois que l'insertion du rameau carpogonial sur la cellule support est plus interne que latérale (Fig. 5).

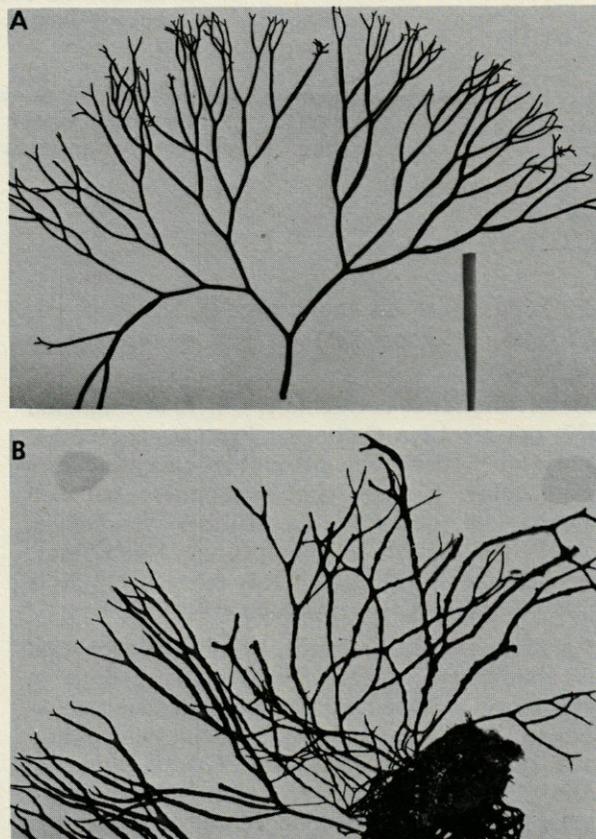


Fig. 6. — A, Tétrasporephyte; B, Gamétophyte femelle. A, Tetrasporophyte; B, female gametophyte.

## DISCUSSION

Dans leur révision récente du genre *Sarconema*, Papenfuss et Edelstein (1974) ne retiennent que deux espèces :

- *Sarconema filiforme* (Sonder, 1845) Kylin, 1932
  - *Sarconema furcellatum* Zanardini, 1858
  - *Sarconema montagnei* (Grunow, 1873-74); Kylin, 1932;
  - *Sarconema indicum* (J. Agardh, 1852); Kylin, 1932;
  - *Sarconema furcatum* Børgesen, 1934.

Cette espèce, polymorphe, a une large répartition géographique : Méditerranée orientale, Mer Rouge, Océan indien, Pacifique.

- *Sarconema scinaoides* Børgesen, 1934.

Cette espèce n'a été signalée que de l'Océan indien.

Malgré des différences spécifiques peu marquées, les auteurs considèrent ces deux taxa comme bien distincts (Børgesen, 1934, Papenfuss et Edelstein, 1974; Jaasund, 1976).

L'Algue récoltée en Grèce diffère de *Sarconema filiforme* sur le plan morphologique par le diamètre élevé de ses axes (jusqu'à 2 mm) et par sa texture plus molle, et sur le plan anatomique par le diamètre plus grand et la disposition plus lâche des cellules du cortex interne; contrairement à *Sarconema filiforme*, l'Algue séchée adhère bien au papier. Par l'ensemble de leurs caractères, nos spécimens nous paraissent référables à *Sarconema scinaoides*.

## BIBLIOGRAPHIE

- ALEEM, A.A., 1948. The recent migration of certain indo-pacific algae from the Red Sea into the Mediterranean. *New Phytol.*, **41** (1) : 88-94.
- ALEEM A.A., 1950. Some new records of marine algae from the Mediterranean Sea. *Medd. Bot. Sverige*, **18** : 275-288.
- BØRGESEN F., 1934. Some Indian Rhodophyceae, especially from the shores of the Presidency of Bombay : IV. *Kew Bull.*, **1** : 1-30.
- CINELLI F. et G. GUGLIELMI, 1977. Sur la présence, sur la côte des Albères (Pyrénées orientales), d'une algue de la famille des Solieriacees (Rhodophycées, Gigartinales). *Vie Milieu*, **27** (2A) : 293-296.
- DECROCK E., 1914. Phytogéographie. II. Végétation marine. Les Bouches-du-Rhône, Encyclopédie départementale, **12** : 402-439.
- GABRIELSON P.W. et M.H. HOMMERSAND, 1982. The Atlantic species of *Solieria* (Gigartinales, Rhodophyta) : their morphology, distribution and affinities. *J. Phycol.*, **18** : 31-45.
- JAASUND E., 1976. Intertidal seaweeds in Tanzania (First edition). Univ. Tromso, 1-159.
- MAYHOUB H., 1976. Recherches sur la végétation marine de la côte syrienne. Etude expérimentale sur la morphogénèse et le développement de quelques espèces peu connues. Thèse Doct. Etat, Univ. Caen : 1-286 + 1 carte + 16 pl. h.t.
- PAPENFUSS G.F. et T. EDELSTEIN, 1974. The morphology and taxonomy of the red alga *Sarconema* (Gigartinales : Solieriaceae). *Phycologia*, **13** (1) : 31-44.
- RAYSS T., 1963. Sur la présence dans la Méditerranée orientale des algues tropicales de la famille des Solieriacees. *Acta Bot. Horti Buc.*, 1961-1961 : 91-106.

Reçu le 6 novembre 1984; received November 6, 1984.  
 Accepté le 6 février 1985; accepted February 6, 1985.



## ANALYSES D'OUVRAGES *Book reviews*

J.C. von VAUPEL KLEIN (1984). Towards a monograph of *Euchirella*. E.J. Brill ed., 510 p.

---

Cet ouvrage de 510 pages est la somme de plus de dix années de recherches sur la morphologie et la répartition géographique des espèces de Copépodes du genre *Euchirella*. La modestie du titre de cet ouvrage de synthèse, comme l'appellation peu connue de ce nom de genre, masquent l'importance de l'œuvre de von Vaupel Klein pour les non spécialistes de ce groupe de Crustacés.

La définition rigoureuse des caractères morphologiques, précisés par l'utilisation du microscope à balayage (SEM), permet à l'auteur d'établir la codification indispensable en vue d'un groupement des espèces selon leurs affinités. Un essai sur les relations phylogénétiques chez *Euchirella* fournit à l'auteur l'occasion de rappeler les principes sur lesquels elles se fondent et de tester les diverses méthodes taxonomiques ; systématique évolutive, taxonomie numérique, systématique phylogénétique. Ce chapitre est paru également dans *Crustaceana*, supplément 9 : 1-194, 33 figures, 2 planches in *Studies on Copepoda*, III, A phylogeny of *Euchirella*.

L'auteur, au cours de la description des structures morphologiques, introduit des définitions nouvelles concernant les organes tégumentaires par exemple et discute de l'interprétation de certaines d'entre-elles comme celles des tubercules frontaux portant les soies frontales, la chétotaxie de l'aire buccale, la structure de l'urosome.

Les considérations fonctionnelles de ces structures sont développées par une argumentation qui s'appuie sur une revue exhaustive de la littérature. Ce livre dépasse largement le cadre intéressant les seuls spécialistes des Copépodes pélagiques.

Claude RAZOULS

SCHMIDT R.F. (1978). « Fundamentals of Sensory Physiology » (Données fondamentales de la physiologie sensorielle). Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 286 p. avec 139 figures. Prix : 33,60 DM

---

Cette publication, destinée plus particulièrement aux étudiants qui possèdent déjà un minimum de

connaissances biologiques, traite des données de base de la physiologie sensorielle, et notamment de celle de l'Homme. Les dessins, pour la plupart polychromes, illustrent très bien le fonctionnement de nos organes sensoriels, qu'il s'agisse de la vue, de l'ouïe, de l'odorat ou de la gustation.

SCHMIDT R.F. (1978). « Fundamentals of Neurophysiology » (Données fondamentales de la neurophysiologie). Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 339 p. avec de nombreuses figures. Prix : 42,- DM

---

La 2<sup>e</sup> édition de ce traité a été sérieusement révisée et considérablement élargie. Les nombreux dessins en couleurs facilitent la compréhension des complexes neurophysiologiques et de leurs fonctions. Ce volume complète le traité sur la « Physiologie sensorielle ».

Armin HEYMER

BRODEUR P. (1980). « Mikrowellen — die verheimlichte Gefahr » (Micro-ondes — le danger caché). Udo Pfriemer Verlag, München, 224 p., 17 fig. Prix : 39,80 DM

---

Ces dernières années, l'utilisation des micro-ondes s'est rapidement répandue. Elles ont des applications aujourd'hui non seulement dans la navigation, la télévision, la communication par téléphone et par satellite ainsi que dans de nombreux procédés de fabrication industrielle, mais aussi dans le domaine domestique, par exemple sur des grils ou des fours. On les utilise également pour la commande d'installations d'alarme et de dispositifs d'ouverture et de fermeture de portes de garage ainsi que pour la torréfaction du café ou le collage de contre-plaqué.

Mais les micro-ondes ne sont pas sans danger, elles peuvent provoquer des maladies graves, surtout lorsque leur émission n'est pas contrôlée. On peut même parler de pollution électronique de l'environnement, voire de 'smog' électronique, dans certaines agglomérations des Etats-Unis. Jusqu'à présent, on a passé sous silence la menace que présentent les micro-ondes. Alors qu'en URSS par exemple, la

manipulation des micro-ondes fut réglementée dès les années 30, l'Occident n'a guère pris de mesures de protection.

Dans son livre, Paul Brodeur a réuni et dépouillé les données et les avis d'un grand nombre de spécialistes de différents pays. La publication de ces documents pose des questions embarrassantes aux responsables politiques et économiques, notamment celle de savoir pourquoi on a passé sous silence la contamination de l'environnement par les micro-

ondes et le danger qu'elles représentent pour la vie et la santé des personnes concernées. En effet, il est pratiquement prouvé que les rayons non ionisants provoquent une accélération de la division cellulaire des lymphocytes.

L'auteur a eu le courage de rompre le tabou qui entourait ces problèmes et présente des faits qui exigent une réponse.

Armin HEYMER

Directeur gérant de la publication : J. SOYER

---

*Tous droits de traduction, d'adaptation et de reproduction par tous procédés réservés pour tous pays.*

La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite » (alinéa 1<sup>er</sup> de l'article 40).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code pénal.

# INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

Les auteurs sont priés de se conformer aux indications suivantes :

## TEXTE

Les manuscrits, dactylographiés en double interligne sur le recto seulement de feuilles numérotées (ne pas excéder 20 pages) sont présentés en trois jeux complets, sous leur forme définitive.

Le titre du manuscrit doit être le plus court possible; il est suivi du prénom et du nom de l'auteur (ou de chacun des auteurs) ainsi que de l'adresse (ou des adresses) du Laboratoire dans lequel a été effectué le travail.

Chaque manuscrit comportera :

- un résumé en français de 15 lignes maximum figurant en début d'article, suivi de sa traduction en anglais,
- des mots clés français et anglais (6 au maximum) permettant un traitement rapide par les revues analytiques,
- un titre abrégé pour haut de page (60 signes et espaces au plus),
- la traduction anglaise du titre de l'article,
- une liste hors texte des légendes des illustrations et leur traduction en anglais,
- une liste hors texte des légendes des tableaux numérotés en chiffres romains et traduites en anglais.

Les noms d'auteurs figurent en capitale ou soulignés d'un double trait, les noms scientifiques (genres, espèces, sous-espèces) en italiques ou soulignés d'un seul trait.

Les références bibliographiques des auteurs cités dans le texte sont regroupées à la fin du manuscrit dans l'ordre alphabétique des noms d'auteur; elles doivent être conformes aux modèles suivants :

GRIFFITHS C.L., and J.A. KING, 1979. Some relationships between size, food availability and energy balance in the Ribbed Mussel *Aulacomya ater*. *Mar. Biol.*, **51** (2) : 141-150.

EAGLE R.A. and P.A. HARDIMAN, 1977. Some observations on the relative Abundance of species in a benthic community. In *Biology of Benthic Organisms*. Edited by B.F. Keegan, P.O. Ceidigh and P.J.S. Boaden, Pergamon Press, Oxford-New York, 197-208.

Le titre des périodiques doit être abrégé d'après les règles internationales (World list of Scientific Periodicals).

Les notes infrapaginales et les remerciements seront aussi brefs que possible.

## ILLUSTRATIONS

Les figures au trait doivent être soigneusement exécutées à l'encre de chine sur papier calque assez fort, bristol, carte à gratter, papier millimétré bleu. Il est exigé des lettres et chiffres « transfert » par caractères autocollants (de préférence « Futura ») pour le lettrage et la numérotation, dont la taille tient compte de la réduction à supporter. Les figures sont regroupées au maximum en planches dont la justification pleine page est 17 × 24,35 cm une fois réduites (penser à retrancher la légende de ces dimensions); largeur d'une colonne : 8,1 cm. Méthode des « rectangles homologues » pour la réduction : tracer les diagonales d'un rectangle de 17/24,35 cm, les prolonger; tout rectangle admettant ces prolongements comme diagonales correspondra à la justification après réduction. Indiquer le numéro d'ordre des figures en chiffres arabes et le nom de l'auteur au crayon bleu au recto ou au dos. Ne pas inscrire de légende sur les illustrations.

Regrouper les similis (photographies, lavis...) en planches. Employer une échelle graphique qui sera réduite avec la figure, et un lettrage par transfert. Tableaux et planches similis sont numérotés de I à N en chiffres romains. Limiter le nombre des tableaux et ne retenir que ceux qui sont indispensables à la compréhension du travail.

La revue publie gratuitement 2 planches au trait pleine page et 1 seule planche en simili; les illustrations supplémentaires ou en couleurs sont facturées aux auteurs.

## ÉPREUVES ET TIRÉS À PART

Un jeu d'épreuves accompagné du manuscrit est envoyé à l'auteur qui doit retourner l'ensemble après correction et indication de la place des illustrations dans le texte, dans un délai maximum de 15 jours.

25 tirés à part par article sont offerts. Les exemplaires supplémentaires, facturés directement par l'imprimeur doivent être commandés dès réception de l'imprimé spécial joint aux épreuves.

# VIE ET MILIEU, 1985, 35 (1)

## SOMMAIRE — SUMMARY

Recherche de l'argent chez quelques Mollusques marins, dulcicoles et terrestres. Formes chimiques et localisation histologique. <i>A survey of silver in some marine, freshwater and land molluscs. Chemical forms and histological localization.</i> M. MARTOJA, J.M. BOUQUEGNEAU, M. TRUCHET et R. MARTOJA	1
Effets du malathion, insecticide organophosphoré, sur le Dinoflagellé marin <i>Prorocentrum micans</i> E. <i>Effects of the organophosphorus insecticide malathion on the marine Dinoflagellate Prorocentrum micans</i> E. P. PRÉVOT et M.O. SOYER-GOBILLARD	15
Polymorphisme du rythme d'émission des Cercaires de <i>Schistosoma mansoni</i> et ses relations avec l'écologie de la transmission du parasite. <i>Polymorphism of the cercarial shedding pattern of Schistosoma mansoni and its relation with the ecology of the parasite.</i> A. THÉRON	23
La fixation du carbone inorganique par le phytoplancton marin : données bibliographiques sur les carboxylases et le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ . <i>Inorganic carbon fixation by marine phytoplankton : bibliographical review on carboxylation enzymes and <math>^{13}\text{C}/^{12}\text{C}</math> isotopic ratio.</i> C. DESCOLAS-GROS	33
Survival and growth of <i>Molgula socialis</i> Alder, 1863, at different temperature-salinity combinations. R. BRUNETTI, L. BEGHI, M.G. MARIN and M. BRESSAN	43
Influence de facteurs externes sur le développement gemmulaire d'une Démosponge marine. <i>Influence of external factors on the gemmular development in a marine Demosponge.</i> R. CONNES et M. GIL	49
Sur la présence d'une espèce du genre <i>Sarconema</i> (Solieriaceae, Rhodophyta) en Grèce. <i>The occurrence of a species of Sarconema (Solieriaceae, Rhodophyta) in Greece.</i> A. DIAPOULIS, M. VERLAQUE, P. HUVE et C.F. BOUDOURESQUE	57
Analyses d'ouvrages / <i>Book reviews</i>	61