

Honoraires respectueux de l'auteur,

J. Stiévenart

133518

Extrait des *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique*
Tome 100, 1970, fasc. 3, pp. 139 à 158

(Communication reçue le 14 mars 1970.)

RECHERCHES HISTOLOGIQUES SUR LA TUNIQUE
DE DEUX ASCIDIACES PHLEBOBRANCHES :
ASCIDIELLA ASPERSA MÜLL.
et PHALLUSIA MAMMILLATA CUV.

par Jeannine STIÉVENART

Université de Liège, Institut Ed. Van Beneden,
Laboratoire de Morphologie,
Systématique et Écologie animales

RÉSUMÉ

L'étude d'*Ascidia aspersa* Müll. et *Phallusia mammillata* Cuv., espèces appartenant à deux familles voisines de la classe des Ascidiacés phlébobranches, révèle de très nettes différences de constitution de leurs revêtements tunicaux.

Trois catégories de substances ont été mises en évidence : des mucopolysaccharides acides, des protéines et des polysaccharides neutres, par des réactions histochimiques combinées à des traitements chimiques. La localisation et les proportions de ces trois constituants diffèrent d'une espèce à l'autre.

Cette étude nous amène à conclure que le revêtement des Tuniciers phlébobranches ne possède pas l'uniformité de structure et de composition que l'on admet généralement.

I. INTRODUCTION

Les Urochordés se distinguent des autres Chordés par divers caractères originaux. Ces animaux sont notamment protégés par un revêtement particulier, la *tunique*, sorte de sac dans lequel ils sont appendus (Tunicata, LAMARCK, 1816). Chez l'adulte, la tunique n'adhère à l'ectoderme qu'au niveau des deux siphons et, chez certaines formes solitaires, au point d'émergence des lacunes sanguines qui s'irradient dans sa substance, souvent envahie par des cellules (d'origine hémocoelienne principalement).

Institut voor Zeezoölogie en Zeeonderzoek
Instituut für Meereszoologie und Meeresforschung
Prinses Elisabethlaan 18
9101 Bredene - Belgique - Tel. 6622

La tunique est plastique; elle a été qualifiée de mésenchyme périphérique (BRIEN, 1937) et de conjonctif physiologique (PÉRÈS, 1948).

La consistance de la tunique varie d'un ordre à l'autre, beaucoup plus qu'il n'en ressort de la lecture des travaux sur la question : elle est soit gélatineuse (Ascidies aplousobranches, certaines Ascidies phlébobranches, Thaliacés), soit cartilagineuse (la plupart des Ascidies phlébobranches), soit coriacée (Ascidies stolidobranches solitaires).

Il est classiquement admis depuis les recherches de SCHMIDT (1845) que la tunique est constituée de cellulose (tunicine de BERTHELOT, 1872); toutefois des observations plus récentes ont montré qu'à côté de la fraction polyglucidique se trouve une quantité non négligeable de produits azotés, parfois difficiles à éliminer (*).

BRIEN (1930) et surtout PÉRÈS (1948, a, b) se sont attachés à définir la composition de la tunique et à préciser l'intervention des cellules hémocoeliennes dans l'élaboration et dans la régénération postopératoire chez diverses Ascidies (notamment *Clavelina lepadiformis* Müll. et *Ciona intestinalis* L.). ENDEAN (1955, 1961) s'est particulièrement occupé des tuniques de *Phallusia mammillata* Cuv. et de *Pyura stolonifera* Hell. au point de vue histologique et histochimique. GODEAUX (1964) a orienté ses travaux vers la classe des Thaliacés et procédé à l'étude histochimique de *Iasis zonaria* Pall. et de *Pyrosoma atlanticum* Les. Dans diverses publications, BARRINGTON et ses collaborateurs (1957, 1960, 1964, 1968) se sont intéressés à la composition chimique de la tunique et de sa zone superficielle, la cuticule. La présence de chitine n'a pu être prouvée (BARRINGTON, 1960, chez *Ciona intestinalis* et *Halocynthia papillosa*; JEUNIAUX, 1963, chez *Ascidia mentula* et *Ciona intestinalis*).

Sans doute en raison du fait que peu d'espèces ont été étudiées de façon systématique, les informations sur la composition chimique de la tunique restent imprécises. Si l'existence d'une certaine quantité de polyosides neutres, la cellulose pour les uns,

(*) Pour la bibliographie concernant cette question, voir GODEAUX, 1961.

la tunicine pour les autres, paraît hors de doute, l'intervention d'autres substances, notamment mucopolysaccharides acides ou protéines, ne peut être exclue. De plus, les différences (évidentes pour qui a quelque peu manipulé les Tuniciers) dans la consistance des tuniques pourraient s'interpréter par des variations relatives des constituants, sinon par la nature de ces derniers.

Dans notre travail, nous avons repris l'étude de deux espèces d'Ascidies phlébobranches appartenant à des familles voisines : *Phallusia mammillata* Cuv. et *Ascidia aspersa* Müll., en combinant l'examen histologique et histochimique, avant et après extraction des constituants, et l'étude chimique des diverses fractions extraites, de manière à déterminer d'une part la qualité, d'autre part la localisation de ces constituants. Une analyse de ce genre n'avait pas encore été réalisée sur les Tuniciers, à notre connaissance.

III. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les deux espèces ont été récoltées sur les côtes de France : *Ascidia aspersa* Müll. à Wimereux et *Phallusia mammillata* Cuv. en rade de Brest.

Par une incision ménagée dans la tunique de la base au siphon cloacal, on dégage facilement le corps de l'animal. Cette opération est complétée par un nettoyage soigneux de la surface extérieure du revêtement afin d'éliminer les épibiontes et la vase accumulée dans les replis de la tunique.

Les tuniques nettoyées sont alors fixées soit à l'alcool à 70°, en vue de leur étude chimique, soit au liquide de Bouin ou au formol salé, en vue des études histologiques et histochimiques. En outre, une partie du lot a été congelée après nettoyage et conservée à — 30° C en récipient fermé.

Les inclusions ont été faites dans la paraffine avec déshydration par l'alcool *n*-butylique.

Les coupes, réalisées au microtome de Young, sont d'épaisseur variable soit que l'on désire obtenir une intensité de coloration suffisante (5 à 15 microns) lors des manipulations histochimiques, soit que l'on cherche à localiser ou à décrire des structures particulières (5 à 10 microns). Les colorations ont été réalisées sur

des coupes des deux espèces dans les mêmes conditions en présence d'un matériel témoin connu (par ex. des coupes transversales de *Lombric*).

La mise en évidence des polysaccharides neutres, des muco-polysaccharides acides, des protéines et des polyphénols a été effectuée selon les techniques préconisées par LISON (1963). Le tannage des protéines a été détecté par les réactions argentaffine et chromaffine. Il s'est révélé intéressant d'utiliser les colorations combinées selon VIALLI (Bleu alcian et P.A.S.) et RAVETTO (Bleu et Jaune alcian).

Sur du matériel séché à l'étuve à 105° C et n'ayant subi aucune manipulation chimique, nous avons dosé l'azote total par la méthode de KJELDAHL. Dans une seconde série d'expériences, les tuniques séchées et pesées ont été extraites soit par l'eau distillée bouillante pendant 5 heures, soit par l'eau distillée bouillante pendant 5 heures puis par la soude 0.5 N bouillante pendant également 5 heures. Grâce à ces traitements, plusieurs fractions azotées ont été séparées. La présence éventuelle de substances azotées, résistant à ces traitements successifs, a été recherchée au niveau des résidus tunicaux.

III. RÉSULTATS

1. Morphologie des tuniques d'*Ascidia* et *Phallusia*

Nous distinguons deux parties dans la tunique, la *cuticule*, superficielle et proportionnellement mince, et la *substance fondamentale*, profonde, très épaisse.

A. La structure de la tunique d'*Ascidia aspersa* (schéma I).

Chez un individu adulte, s'observe une zone très colorable sur le pourtour de la tunique : la *cuticule*. De faible épaisseur (environ 3 microns) et de contour extrêmement sinueux, elle sépare la *substance fondamentale* du milieu ambiant. Son épaisseur est assez constante (fig. 1 et 2). Au microscope électronique, la *cuticule* se présente comme la condensation en surface de traînées fibrillaires repérables dans la *substance fondamentale*.

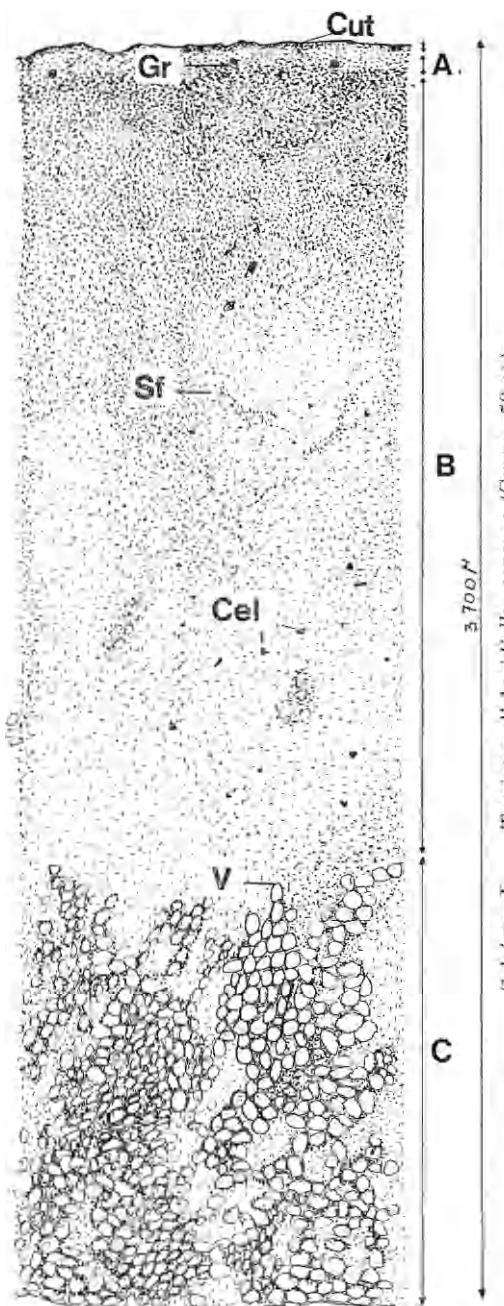


Schéma I. — Tunique d'*Ascidia aspera* (Gross, 50 \times).
 Cut. : cuticule, Gr. : cellules à granules, Sf. : substance fondamentale, Cel. : cellules tunicales, V : vacuoles.

La zone sous-jacente (zone A), épaisse de 15 à 20 microns, tranche sur le reste de la substance fondamentale par ses affinités moindres pour les réactifs de mise en évidence des polyosides neutres. C'est dans cette région que le microscope électronique révèle une concentration de fibres. A ce niveau, presque toujours accolé à la cuticule, se localise un type particulier de cellules : les cellules à granule, d'aspect similaire aux cellules à granule réfringent de la zone sous-cuticulaire de *Ciona intestinalis* L. (BARRINGTON, 1957, BARRINGTON et BARRON, 1960) (*). Elles sont très abondantes dans la région sous-cuticulaire (comme chez *Ciona intestinalis*) pour devenir extrêmement rares dans la zone profonde (zone B) de la substance fondamentale. Le granule arrondi est intravacuolaire et occupe presque tout le volume de la cellule (15 microns). Fait intéressant, la tunique d'un individu jeune ne nous a pas montré ce type de cellule alors que les autres structures sont déjà présentes.

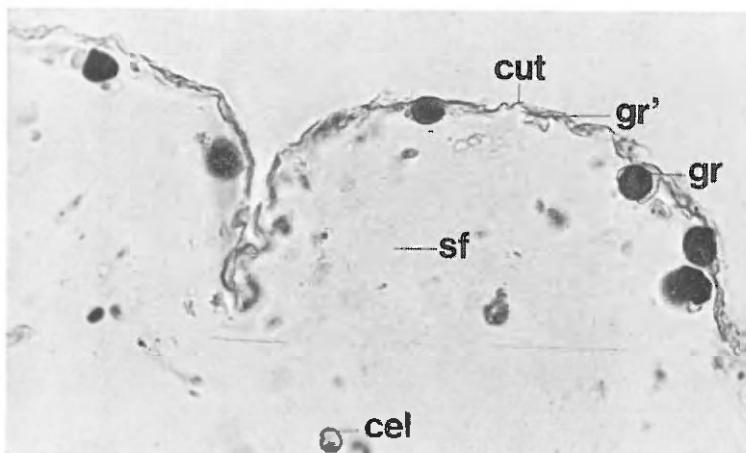


Fig. 1. — *Ascidia aspersa*.

La réaction argentaffine est positive au niveau de la cuticule et surtout des granules sous-jacents.

Cut. : cuticule, Gr. : granule intravacuolaire, Gr' : enveloppe vidée de son granule, Cel. : cellules tunicales, Sf. : substance fondamentale (coupe de 10 microns d'épaisseur).

(*) Ces cellules n'existent pas chez *Phallusia mammillata*.

La substance fondamentale (zone B) épaisse de 2700 microns, ne se colore pas de façon uniforme; elle montre des traînées « fibrillaires » plus ou moins nettes. En outre, la colorabilité s'affaiblit en profondeur, ce qui répond probablement à une plus grande imbibition de la matière. La détermination du poids sec révèle d'ailleurs que la tunique fraîche d'*Ascidia aspersa* renferme 95 % d'eau. Le microscope électronique confirme la présence d'un réseau de fibres constituant localement des faisceaux denses et serrés, séparés par de la substance interstitielle se présentant comme un précipité floconneux peu contrasté. La zone B contient un grand nombre de cellules multi-vacuolaires, de dimensions généralement plus petites que les cellules à granule et de forme très variable, dont les différents aspects peuvent s'interpréter comme les stades intermédiaires de la dégénérescence de cellules mésenchymateuses immigrées dans la tunique au travers de l'ectoderme (PÉRÈS).

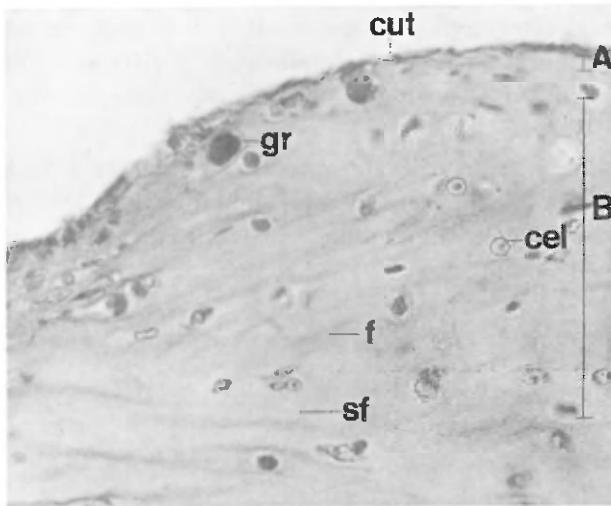


Fig. 2. — *Ascidia aspersa*.

Par la réaction de Vialli, les granules sont colorés en rouge vif et la substance fondamentale en bleu. On observe des traînées fibrillaires et de nombreuses cellules vacuolaires peu colorées.

Cut. : cuticule, Gr. : granule, Cel. : cellules tunicales, Sf. : substance fondamentale, f. : traînées fibrillaires, A : zone A, B : zone B (coupe de 10 microns d'épaisseur).

La couche inférieure de la tunique (zone C), de 600 microns d'épaisseur, se caractérise par ses abondantes vacuoles à contours très nets. La nature réelle de ces vésicules reste inconnue : elles n'ont pas de paroi propre et se présentent comme des espaces vides au sein de la substance fondamentale qui est épaisse sur le pourtour des vésicules comme si elle s'était tassée lors de leur expansion. Ces lacunes contiennent de l'acide sulfurique (WEBB). ST. HILAIRE (1931) leur attribue une origine cellulaire (« Blasenzellen ») et ENDEAN les fait dériver des vanadocytes.

Sur des coupes d'individus jeunes, les vacuoles sont disposées en chapelets parallèles à l'ectoderme, s'égrènent à la base de la tunique qui paraît être la zone de formation. A ce stade, la substance fondamentale est pauvre en cellules et nous n'avons pu observer d'images de dégénérescence cellulaire pouvant s'interpréter comme des stades intermédiaires de formation de ces « Blasenzellen ». Par contre, certaines coupes montrent nettement des vacuoles issues par étranglement de vacuoles de plus grand diamètre. Ces vésicules jouent peut-être le rôle de squelette autour duquel la substance fondamentale se déposerait par strates. La croissance les refoulerait ensuite vers la zone superficielle.

L'ectoderme, très plat et unistratifié, n'adhère à la tunique qu'au niveau des siphons chez les individus âgés. Ses relations avec la substance fondamentale sont, pour cette raison, difficiles à saisir.

B. Structure de la tunique de *Phallusia mammillata* (schéma II).

Chez *Phallusia mammillata*, la tunique, outre la cuticule, comprend aussi trois régions distinctes.

La cuticule, beaucoup plus épaisse (15 microns) que celle d'*Ascidia*, présente des stratifications denses (fig. 3).

Sous la cuticule, la zone A correspond à une couche de substance moins colorée que le reste de la tunique et est soulignée par une bande de coloration plus intense marquant le début de la zone B. Les cellules à granule, si évidentes chez *Ascidia*, ne s'observent jamais.

La zone B est étroite car, chez cette espèce, la zone C occupe

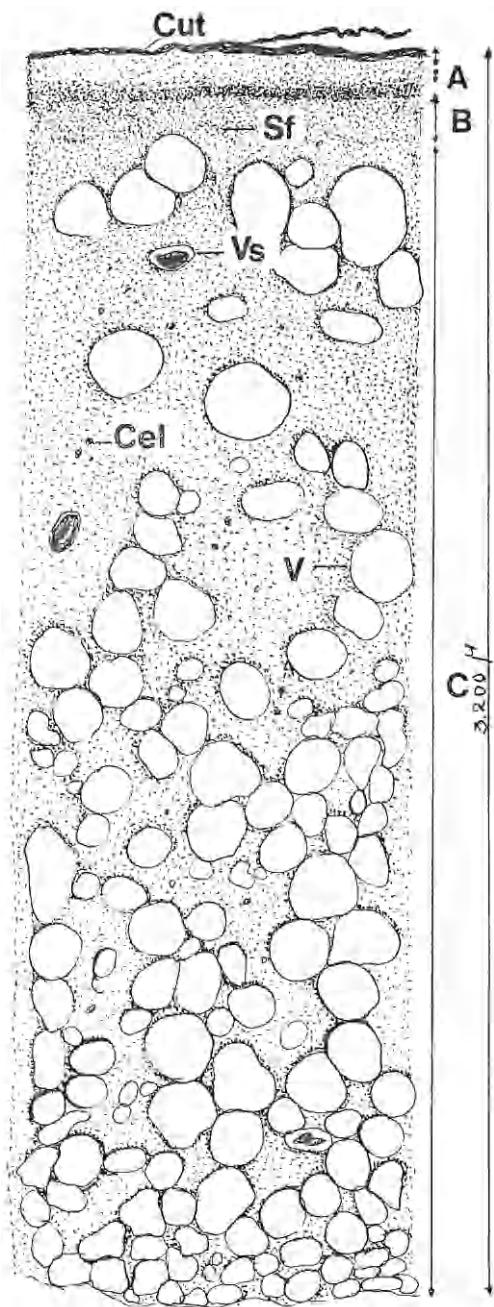


Schéma II. — Tunique de *Phallusia mammillata* (Gross, 50 \times).
Out. : cuticule, Sf. : substance fondamentale, Cel. : cellules tuniciales, V : vacuoles.

presque toute la hauteur de la tunique. Des traînées « fibrillaires » s'observent également dans la substance fondamentale mais elles sont moins nettes que chez *Ascidia*. Peu de cellules sont visibles au sein de la tunique.

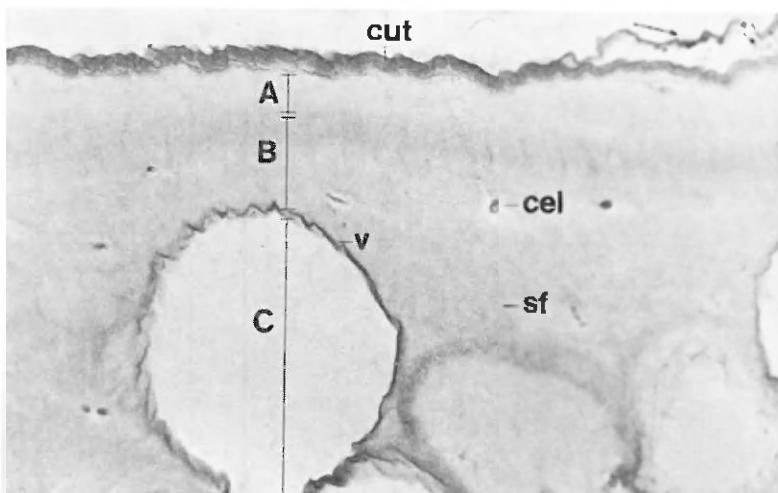


Fig. 3. — *Phallusia mammillata*.

La cuticule est nettement colorée par le Bleu alcian dans la réaction de Vialli. On observe la stratification avec, à droite, une délamination de la couche cuticulaire. La zone B est étroite; immédiatement en-dessous, on aperçoit les vacuoles de la zone C.

Cut. : cuticule, V : vacuole, Cel. : cellules tunicales, Sf. : substance fondamentale, A : zone A, B : zone B, C : zone C (coupe de 10 microns d'épaisseur).

Les grandes vacuoles de la région C, très abondantes et serrées au centre de la substance fondamentale profonde, se dispersent jusque dans la zone B. Elles ne diffèrent pas de celles trouvées chez l'autre espèce. Leur taille varie de 60 à 120 microns. À côté des grandes vésicules, proches de B, s'aperçoivent des cellules de petite taille (2 à 3 microns), colorées en rouge par la méthode de VIALLI.

La substance fondamentale est sillonnée par de nombreuses lacunes sanguines limitées par un épithélium de grosses cellules cubiques (ectoderme). Ces lacunes sont bourrées d'amas compacts

d'éléments de petite taille que colore vivement le réactif de Schiff après oxydation périodique.

2. *Histochimie comparée*

(Tableau I)

A. Chez *Ascidia aspersa*, la cuticule et les granules de la zone sous-cuticulaire renferment des polysaccharides neutres décelés par la réaction du P.A.S. Les granules sont rouge-cerise. La région cuticulaire est une zone particulièrement riche en divers matériaux : à côté des polysaccharides P.A.S. positifs, elle contient une quantité importante de mucopolysaccharides acides et de protéines à fonctions S-S et -SH. Les réactions argentaffine et chromaffine positives indiquent de plus que ces protéines seraient liées par des ponts quinoniques et correspondent aux scléro-protéines signalées par BARRINGTON (1960) chez *Ciona intestinalis*. Les granules sous-cuticulaires sont vraisemblablement constitués par un complexe de polyosides neutres et de protéines (fonctions -SH) non tannées comme l'indique une réaction chromaffine faible. Cependant, la réaction argentaffine positive y révèle la présence de polyphénols ou d'aminophénols en position ortho ou para. Sur les cellules à granule réfringent de *Ciona intestinalis*, les tests au Bleu alcian sont négatifs (BARRINGTON). La détection des mucopolysaccharides acides dans les granules d'*Ascidia* échoue également. Le rôle des granules est obscur : ils pourraient représenter des concentrations de déchets du métabolisme de l'animal. Toutefois, sur des coupes de tunique de spécimen adulte, on peut observer que l'enveloppe entourant les granules s'étire vers la cuticule et que ceux-ci montrent des signes de modification de leur structure comme le fractionnement du contenu ou l'affaiblissement, voire la disparition, de la colorabilité (fig. 1). Les altérations de coloration de certains d'entre eux indiquent que leurs constituants interviendraient dans l'élaboration de la cuticule et expliquent leur présence dans son voisinage. L'origine de ces granules reste énigmatique : ils manquent totalement dans la substance fondamentale profonde et aucun stade intermédiaire n'a été observé. On pourrait concevoir qu'ils sont élaborés sur place par les cellules puisant les

matériaux dans le milieu que constitue la substance fondamentale. Ces matériaux seraient concentrés, voire modifiés, dans ces cellules.

La zone A est relativement riche en protéines (Bleu alcian après oxydation, aldéhyde fuchsine avec oxydation, D.D.D.) et en mucopolysaccharides sulfatés décelés par la métachromasie et le Bleu alcian (coloration selon RAVETTO). Ces colorations disparaissent irréversiblement après méthylation et essais de saponification. Ce qui confirme la présence de groupes sulfatés. Le test au P.A.S. n'est pas très marqué. Les polyphénols sont totalement absents, comme dans toute la substance fondamentale.

La zone B renferme une quantité importante de polyosides neutres tandis que les mucopolysaccharides (Bleu alcian acétifié sans oxydation et métachromasie par le Bleu de toluidine à pH 4) y sont médiocrement représentés. Les réactions de détection des protéines sont faiblement positives (mise en évidence des protéines à fonction -SH).

Dans la zone C, nous retrouvons en moins nets les résultats obtenus sur les matériaux de la zone B.

B. Chez *Phallusia*, la cuticule est constituée de mucopolysaccharides acides (en forte concentration) et de protéines à fonctions S-S, mais les réactions argentaffine et chromaffine y sont négatives (absence de protéines tannées). La cuticule de *Phallusia* semble avoir une origine différente de celle d'*Ascidia*; en effet, elle est beaucoup plus épaisse, présente des strates intensément colorées et pourrait résulter d'une condensation superficielle de la substance fondamentale qui subirait de continuels remaniements en profondeur avec élimination des couches les plus externes (des délaminations de la cuticule ont été fréquemment observées sur les coupes).

La coloration au Bleu alcian et la métachromasie sont très nettes au niveau de la zone A. Les réactions des protéines sont positives mais la recherche de l'argentaffinité et la chromaffinité ne donne aucun résultat. Les zones A et B + C ont cependant des compositions différentes : en effet, la zone A, faiblement réactionnelle au P.A.S., est soulignée par une bande de substance fondamentale (début de B) fortement colorée en rouge. La colo-

TAF

Réactions histochimiques au niveau des différentes zones

	Polysaccharides neutres		Mucopolysaccharides		
	P.A.S. après oxydation	P.A.S. après digestion à la salive	Bleu Alcian sans oxydat.	Ald. fuch. sans oxydat.	Bleu de tolu pH 3
<i>Ascidia aspersa</i>					
Cuticule	+++	+++	++	+++	violet
Granules	+++	+++	0	0	orthochroma
<i>Substance fondamentale</i> Zone A	+	+	++	++	bleu violet
Zone B	++	++	++	++	0
<i>Phallusia mammillata</i>					
Cuticule	++	++	+++	+++	violet
<i>Substance fondamentale</i> Zone A	0	0	+	++	violet
Zone B	±	±	+++	++	bleu violet

AU I

tunique d'Ascidieilla aspersa et de Phallusia mammillata

S		Protéines			Polyphénols	
		Groupes S-S		Groupes -SH	Argentaff.	Chromaff.
Vialli	Ravetto	Bleu Alcian	Ald. fuch.	D.D.D.		
		+ oxydat.	+ oxydat.			
violet	vert jaune	++++	+++	++	+++	+++
Rouge vif	jaune	±	+	+++	++++	±
bleu	bleu	+++	++	+++	0	0
bleu	bleu vert	++	++	+	0	0
bleu	bleu	+++	+++	+	±	0
bleu	bleu	++	++	+	0	0
bleu	bleu	++	++	+	0	0

TABLEAU II

Réactions histochimiques au niveau de la substance tunicale d'Ascidiella aspersa et Phallusia mammillata après traitement à l'eau et à la soude bouillante pendant 5 heures

TUNIQUE DE DEUX ASCIDIACÉS

151

	APRÈS H ₂ O		APRÈS NaOH	
	A. aspersa	P. mammillata	A. aspersa	P. mammillata
<i>Polysaccharides neutres</i>				
P.A.S. après oxydation	+	±	±	+
<i>Mucopolysaccharides acides</i>				
Bleu alcian sans oxydation	+	++	+	++
Aldehyde fuchsine sans oxydation	+	+	+	++
Bleu de toluidine pH 4	0 (bleu)	+ (bleu violet)	++ (violet) vésicules	0 (bleu)
<i>Prétoxines</i>				
Groupes	Aldéhyde fuchsine après oxydation	±	+	0
S.S				±
Groupes	D.D.D.	±	0	0
S.E.				
<i>Polyphénois et protéines tannées</i>				
Argentaffinité	0	0	0	0
Chromaffinité	0	0	0	0

ration décroît progressivement de la couche superficielle de B jusqu'au bord interne de la tunique, en raison sans doute de la dilution croissante des matériaux. La tunique renferme également 95 % d'eau d'imbibition.

La substance tunicale (B + C) de *Phallusia* est moins colorée par la réaction au P.A.S. que celle d'*Ascidia*. Par contre, les mucopolysaccharides acides y sont particulièrement abondants. Les protéines sont présentes en assez faible quantité.

3. Analyse des tuniques d'*Ascidia* et de *Phallusia* après extraction par l'eau et par la soude bouillante

Les résultats de l'analyse histochimique peuvent être contrôlés par l'étude des modifications qu'apportent différents traitements aux réactions de mise en évidence des polyosides neutres, mucopolysaccharides, protéines et polyphénols (Tableau II).

Sur les fragments de tuniques, traités par l'eau bouillante, les mucopolysaccharides acides ne sont plus décelables, alors que les réactions de détection des protéines et des polyosides neutres sont inchangées, tant au niveau de la substance fondamentale des deux espèces que de la cuticule et des granules sous-cuticulaires chez *Ascidia*.

Les fragments de tuniques des deux espèces, débarrassés des mucopolysaccharides acides par le traitement préalable par l'eau bouillante sont soumis à l'action de la soude 0,5 N pendant 5 heures à 100° C. Toutes les réactions histochimiques sont devenues négatives sauf celle caractéristique des polysaccharides neutres. Les granules sous-cuticulaires d'*Ascidia* ont disparu complètement, ce qui confirme le caractère mixte de leur composition : protéines et polysaccharides.

Les dosages d'azote total réalisés sur des morceaux non traités de tunique indiquent (Tableau III) une richesse plus grande de la tunique d'*Ascidia aspersa* en substance azotée; soit 5,5 mg. d'azote pour 100 mg. de poids sec contre 3 mg. chez *Phallusia mammillata*.

Les dosages de l'azote extrait par le traitement à l'eau bouillante révèlent que cette fraction azotée est proportionnellement

téines y sont peu abondantes et on ne retrouve pas trace de tannage dans la zone cuticulaire.

La propriété d'élaborer la cellulose caractérise les deux espèces étudiées dans ce travail. Cependant, cette substance (plus exactement les corps ternaires qui résistent à l'extraction) représente une fraction relativement modeste (40 % au maximum) du poids sec de la tunique. Dans quelle mesure cette substance intervient-elle dans la composition d'une tunique gélatineuse d'Aploousobranche ou dans celle d'une tunique fibreuse de Stolidobranche ?

A titre comparatif, nous avons déterminé la teneur en eau et en azote de la tunique de deux Ascidiées stolidobranches : *Dendrodoa grossularia* et *Halocynthia papillosa*. Il ressort de l'analyse que si les teneurs en eau s'avèrent beaucoup plus faibles, les substances azotées sont en concentration double de celles extraites chez les deux Phlébobranches.

Ce travail préliminaire indique que la tunique des Urochordés ne possède pas l'homogénéité de composition et de structure qu'on lui prête volontiers.

La poursuite de l'étude comparée du revêtement chez les représentants des diverses classes des Tuniciers nous paraît susceptible d'apporter des informations intéressantes sur les tendances évolutives décelées au sein de l'Embranchement.

ENGLISH SUMMARY

By combining histochemical methods and progressively extracting technics, the structure and composition of the tunics of two phlebobranch Ascidians, *Ascidia aspera* and *Phallusia mammillata*, have been investigated. Beside of a very high water percentage, three kinds of materials, namely acidic polysaccharids, neutral polysaccharids and proteins, have been detected, but in different proportions, and their distribution examined throughout both tunics. No chitin was detectable. The neutral polysaccharids representing the so-called tunicin, are at most amounting to 40 % of the crude dry weight.

Qu'il me soit permis d'exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Professeur Ch. Jeuniaux qui, en m'accueillant dans son Laboratoire et en me prodiguant ses précieux conseils, m'a permis de mener à bien cette étude.

C'est avec beaucoup de reconnaissance que j'adresse à Monsieur le Professeur J. Godeaux, mes plus vifs remerciements pour l'aide et les encouragements bienveillants qu'il m'a apportés au cours de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- ABDERHALDEN, E. et ZEMPLIN, G. (1911). — Partielle Hydrolyse der Tunicaten Cellulose. Bildung von Cellulose. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, **72**, pp. 58-62.
- BARRINGTON, E. J. W. (1957). — The Distribution and Significance of organically bound Iodine in the Ascidian *Ciona intestinalis* L. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **36**, pp. 1-16.
- BARRINGTON, E. J. W. et BARRON, N. (1960). — On the organic Binding of Iodine in the Tunic of *Ciona intestinalis*. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **39**, pp. 513-523.
- BARRINGTON, E. J. W. et THORPE, A. (1963). — Comparative Observations on Iodine Binding by *Saccoglossus horsti* Brambell and Goodhart and by the Tunic of *Ciona intestinalis* L. *General and comparative Endocrinology*, **3**, pp. 166-175.
- BARRINGTON, E. J. W. et THORPE, A. (1968). — Biochemical Aspects of Iodine Binding in the Tunic of the Ascidian : *Dendrodoa grossularia* Van Ben. *Proc. Roy. Soc., B*, **171**, pp. 91-109.
- BERTHELOT, M. (1872). — Sur la Cellulose et la Tunicine. *Bull. Soc. chim. France*, **18**, p. 9.
- BRIEN, P. (1930). — Régénération naturelle et expérimentale chez les Clavelinidae. *Ann. Soc. Roy. Zool. de Belgique*, **61**, pp. 19-112.
- BRIEN, P. (1937). — Formation des Coenobies chez les Polyclinidae. *Ann. Soc. Roy. Belgique*, **67**, pp. 63-73.
- ENDEAN, R. (1955). — Studies of the Blood and Test of some Australian Ascidiants.
 I. The Blood of *Pyura stolonifera*;
 II. The Test of *Pyura stolonifera*;
 III. The Formation of the Test of *Pyura stolonifera*.
Austral. J. marine and freshwater Research, **6**, pp. 35-39, pp. 139-156., pp. 157-164.
- ENDEAN, R. (1961). — The Test of the Ascidian *Phallusia mammillata*. *Quart. J. micr. Sc.*, **102**, pp. 107-117.

- GODEAUX, J. (1964). — Le Revêtement cutané des Tuniciers. *Studium generale*, Jahrg. **17**, pp. 176-190.
- GODEAUX, J. (1965). — Observations sur la Tunique des Tuniciers Pélagiques. *Rapp. et P.V. Comm. Internat. Explor. Scient. Mer Médit.*, **18**, pp. 457-460.
- HALL, D. A. et SAXL, H. (1961). — Studies of human and tunicate Cellulose and their relation to Reticulin. *Proc. Roy. Soc. London*, B, **155**, pp. 202-217.
- JEUNIAUX, Ch. (1963). — *Chitine et Chitinolyse, un chapitre de la Biologie moléculaire*. Masson et Cie, Paris, 181 p.
- LISON, L. (1960). — *Histochemistry et Cytochemistry animales*. 2 vol. Paris, Gauthier-Villars, édit. (3^e édit.).
- Mac MANUS et MOWRY (1958). — Effects of fixation on Carbohydrate Histochemistry. *J. Hist. Cytoch.*, **6**, pp. 309-316.
- PÉRÈS, J. M. (1948). — Recherches sur la Génèse et la Régénération de la Tunique chez *Ciona intestinalis*. *Bull. Inst. Océanogr. Monaco*, n° **936**, pp. 923-941.
- PÉRÈS, J. M. (1948). — Recherche sur le Sang et la Tunique commune des Ascidies composées, I : Aplousobranchiata. *Ann. Inst. Océan.*, **22**, pp. 345-473.
- RAVETTO, C. (1964). — Alcian blue-Alcian yellow. A new method for the Identification of different acidic Groups. *J. Hist.*, **12** (1), p. 44.
- SAINT-HILAIRE, K. (1931). — Morphogenetische Untersuchungen des Ascidien Mantels. *Zool. Jahrb. (Abt. Anat. Ontog. d. Thiere)*, **54**, pp. 435-608.
- SCHMIDT, K. (1848). — Zur vergleichenden Physiologie der Wirbellosen. *Ann. d. Chem. U. Pharm.*, **54**, pp. 284-331.
- TSUCHIYA, Y. et SUZUKI, Y. (1963). — Biochemical Studies of Ascidian *Cynthia roretzi* V. Tunicin in test. *Tohoku J. of Agricult. research*, **14**, pp. 39-43.
- VIALLI (1955). — Introduzione alla Ricerca in Istochimica (Industr. Poligrafica Lombarda, Milano, s.d.). *Studia Ghisleriana*, **2**, p. 91.
- WEBB, D. A. (1939). — Observations on the Blood of certain Ascidians with special Reference to the Biochemistry of Vanadium. *J. Exp. Biol.*, **16**, pp. 499-523.
- WEBB, D. A. (1956). — The Blood of Tunicates and the Biochemistry of Vanadium. *Pubbl. Staz. Zool., Napoli*, **28**, pp. 273-288.

