

(Manuscrit reçu le 30 juillet 1986)

**COMPOSITION CHIMIQUE ET ORGANISATION
DE LA TUNIQUE DE DEUX ASCIDIES :
*PHALLUSIA MAMMILLATA ET HALOCYNTHIA PAPILLOSA***

par

Y. VAN DAELE (1) et G. GOFFINET (2)

(1) Laboratoire de Biologie générale

(2) Laboratoire de Morphologie, Systématique et Écologie animales
Université de Liège

22, Quai Van Beneden, B-4020 Liège (Belgique)

RÉSUMÉ

La tunique de *Halocynthia papillosa* (Stolidobranche) et la tunique de *Phallusia mammillata* (Phlébobranche) se présentent comme des structures plus ou moins fibreuses. On y distingue deux zones caractéristiques : a) la couche cuticulaire, mince, acellulaire et dense aux électrons, forme la limite externe de la tunique, et b) la couche fondamentale dont l'organisation, grâce à la richesse en fibrilles de nature cellulo-protéique et en éléments cellulaires d'origine hémocoeliennes enrobés dans une substance fondamentale, est comparable à celle d'un tissu conjonctif de soutien. L'étude de l'ultrastructure de ces tuniques, jointe aux analyses histochimiques et aux méthodes d'extraction fractionnées et de dosages chimiques, révèlent que leur organisation, l'importance de leurs constituants et leur composition chimique peuvent varier considérablement selon l'espèce et/ou suivant la couche tunicale examinée. Au niveau de la couche fondamentale de *H. papillosa*, le système fibrillaire très développé, en association étroite avec l'épiderme, s'organise en lamelles successives selon une architecture spatiale torsadée (structure en contreplaqué ou pseudomorphose cholestérique), assurant la souplesse et la résistance aux contraintes mécaniques de la tunique). Chez *Ph. mammillata*, la présence de lacunes sanguines dans la couche fondamentale et la dispersion du système fibrillaire, non organisé en une structure torsadée et non associé à l'ectoderme, peuvent être mises en relation avec la qualification de « gélatineuse » attribuée aux couches profondes de la tunique. D'autre part, si les matériaux de base qui entrent dans la composition de ces deux tuniques sont qualitativement fort semblables, leurs proportions relatives, notamment en eau d'imbibition, en mucopolysaccharides acides sulfatés, en tunicine et en protéines (en particulier celles présentant de nombreux résidus tyrosine, radicaux -SH et -S-S-) expliquent dans une certaine mesure les propriétés différentes de dureté, de souplesse, de rigidité et d'élasticité de ces tuniques en général, des différentes couches tunicales en particulier.

Mots clés : Tunique, Ascidiés, *Halocynthia*, *Phallusia*.

Chemical composition and organization of the tunic of two ascidians :
Phallusia mammillata and *Halocynthia papillosa*

SUMMARY

Tunics of *Halocynthia papillosa* (Stolidobranchiata) and *Phallusia mammillata* (Phlébobranchiata) appear as fibrous structures exhibiting two typical regions : a) the thin, acellular and electron dense cuticular layer, which constitutes the external limit

of the tunic and b) the fundamental layer, the organization of which is comparable with a true supporting connective tissue (association of cellulo-proteic fibrils with fundamental substance and cells originating from hemocoel). Ultrastructural observations combined with histochemical investigations, progressive extraction methods and chemical analysis, reveal that the organization, the chemical composition and the importance of the main components of the tunics, may vary considerably according to the species and/or to the tunical layer investigated. In the fundamental layer of *H. papillosa*, the fibers, in close association with the ectoderm layer, are packed in successive laminae according to a twisted spatial architecture (plywood-like structure or cholesteric pseudomorphose), which allows tunic flexibility and its resistance to mechanical stresses. In the tunic of *Ph. mammillata*, the presence of blood vascular lacunae in the fundamental layer, as well as the scarcity of the fibrous elements, that never exhibit any twisted arrangement nor close association with ectoderm, explain to a certain extent the « gelatinous » consistence formerly attributed to the deep layers of the tunic. On the other hand, even if the basic materials that compose these two tunics are qualitatively very similar, their relative proportions, namely concerning water content, sulfated acid mucopolysaccharides, tunicin and proteins (especially tyrosine-, sulfhydryl- and disulphide-rich proteins) can be connected with some tunical properties, such as hardness, flexibility, stiffness or elasticity.

Key-words : Tunic, Ascidiants, *Halocynthia*, *Phallusia*,

INTRODUCTION

La tunique des Urochordés est un tissu complexe d'origine mixte. Elle peut être interprétée comme une forme de mésenchyme dans lequel migrent des cellules hémocoeliennes (GODEAUX, 1964). Certaines de ces cellules contribuent à l'élaboration de la tunique (ROBINSON *et al.*, 1983).

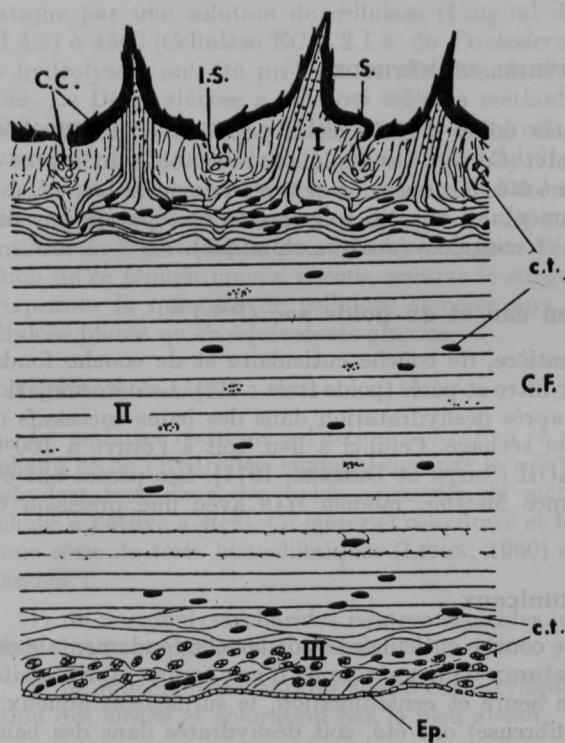
On y reconnaît deux régions principales : la couche cuticulaire, formant la limite externe, et la substance fondamentale. Nous nous proposons de dénommer cette dernière « couche fondamentale » afin d'éviter toute confusion avec la nomenclature classique désignant la substance fondamentale des tissus conjonctifs. Cette couche, comparativement très développée, est parfois hautement organisée (Fig. 1, 1).

D'une manière générale, la tunique possède une teneur élevée en eau; de 65 à 90 % selon les espèces (SAINT HILAIRE, 1931; ENDEAN, 1961). La part résiduelle est constituée de protéines et de polysaccharides (STIEVENART, 1971). Ceux-ci sont surtout représentés par un polysaccharide neutre proche de la cellulose I végétale et bactérienne, la « tunicine » (HUNT, 1970), et par une faible fraction (inférieure à 5 % du poids sec) de mucopolysaccharides acides (SMITH, 1970b), probablement soufrés (STIEVENART, 1971). Plus récemment deux mucopolysaccharides soufrés hydrosolubles ont pu être extraits de la tunique d'*Halocynthia* : le galactane-sulfate (TODA *et al.*, 1978) et la chitine-sulfate (ANNO *et al.*, 1974).

La nature des protéines tunicales ainsi que les proportions relatives en carbohydrates et en protéines, demeurent des sujets très controversés. Ceci pourrait être attribué tant aux variations interspécifiques qu'aux méthodes d'extraction et de dosage utilisées. En tenant compte des valeurs extrêmes, la tunique contiendrait, suivant l'espèce étudiée, de 30 à 70 % de protéines, la fraction restante étant constituée principalement de polysaccharides (SMITH et DEHNEL, 1970, 1971; STIEVENART, 1970, 1971). De plus, ces constituants se répartiraient de manière différente suivant que l'on considère la substance interfibrillaire, les constituants fibrillaires et la couche cuticulaire. La substance interfibrillaire hyaline contiendrait la plus grande partie de l'eau et des mucopolysaccharides acides (ENDEAN, 1961; SMITH, 1970a, b; STIEVENART, 1971; ROBINSON *et al.*, 1983). Les fibres seraient constituées soit de cellulose (ENDEAN, 1961; DECK *et al.*, 1966), soit d'un complexe cellulo-protéique

(HALL et SAXL, 1961; HUNT, 1970; BARRINGTON, 1975). La cuticule se caractériserait par une forte proportion de protéines, notamment de scléroprotéines (STIEVENART, 1971), et les réactions histochimiques des mucopolysaccharides acides y seraient soit négatives, soit positives, suivant l'espèce considérée (STIEVENART, 1970, 1971).

Schème 1



Schème 2

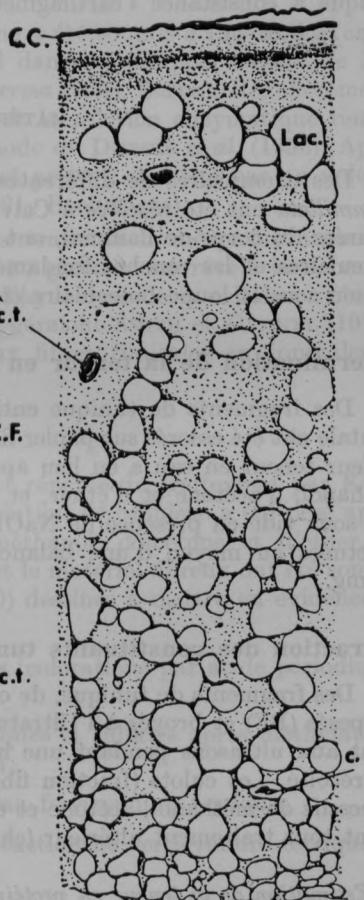


Fig. 1.

Schéma 1 : Coupe transversale de la tunique de *Halocynthia papillosa*.

C.C. : couche cuticulaire; C.F. : couche fondamentale composée de la région sous-cuticulaire (I), région moyenne formée de couches parallèles de fibres torsadées (II) et région supraépidermique (III); Ep. : Epiderme; c.t. : cellule tunicale; s. : plaque et épine cuticulaires; i.s. : région amincie entre deux plaques (d'après STIEVENART, 1971, modifié).

Schéma 2 : Coupe transversale de la tunique de *Phallusia mammillata*.

C.C. : couche cuticulaire; C.F. : couche fondamentale; c.h. : cellule hémocoeliennes; C.t. : cellule tunicale; Lac : lacune intratunicales. — L'épiderme, non solidaire de la tunique, n'est pas représenté (d'après STIEVENART, 1970, modifié).

La consistance de la tunique en général, celle de la couche fondamentale et de la couche cuticulaire en particulier peuvent varier considérablement selon les espèces (STIEVENART, 1970, 1971; SMITH et DEHNEL, 1970, 1971).

Le présent travail apporte un certain nombre d'informations originales sur l'importance relative, la composition chimique et l'ultrastructure des différentes couches tunicales associées à deux types de tuniques caractéristiques, à savoir la tunique à consistance « coriacée » de *Halocynthia papillosa* (Stolidobranche) et la tunique à consistance « cartilagineuse » de *Phallusia mammillata* (Phlébobranche) (Fig. 1, 1 et 2).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des exemplaires de différentes tailles d'*Halocynthia papillosa* et de *Phallusia mammillata* ont été récoltés à Calvi (Corse). Les tuniques, préalablement lavées et séparées du corps de l'animal, ont été découpées en petits fragments. Les couches cuticulaires et les couches fondamentales ont été soigneusement séparées par dissection sous la loupe binoculaire et congelées (analyse chimique).

Détermination de la teneur en eau et du poids sec (PS_1)

Des fragments de tunique entière, de couche cuticulaire et de couche fondamentale ont été essorés sur papier filtre et pesés (poids frais : PF). La détermination de leur teneur en eau a eu lieu après déshydratation dans des bains successifs de méthanol, d'acétone et d'éther, et séchage. Celui-ci a lieu, soit à l'étuve à 100°C, soit sous vide en présence de NaOH (SMITH et DEHNEL, 1971). Les pesées ont été effectuées au moyen d'une balance Mettler, modèle H18 avec une précision de 0.1 mg.

Extraction des constituants tunicaux

Des fragments de tunique, de couche cuticulaire et de couche fondamentale ont été pesés (PF) et broyés à l'Ultraturax dans un volume d'eau connu. Après traitement aux ultrasons pendant une heure et centrifugation, le surnageant aqueux a été récolté. Les culots (fraction fibreuse) ont été, soit déshydratés dans des bains successifs de méthanol, acétone et éther, séchés et pesés (PS_2), soit conservés à 4°C avant tout traitement ultérieur (chimique ou histochimique).

a) Estimation de la teneur en protéines et en D(+) glucose libre dans l'extrait aqueux

Le contenu protéique d'une fraction aliquote de chaque extrait aqueux a été dosé selon la méthode de LOWRY *et al.* (1951) modifiée par SCHACTERLÉ et POLLACK (1973) en insérant lors de chaque dosage un étalon au hasard dans chaque série d'échantillons. Les lectures de densité optique ont été effectuées à 650 nm au moyen d'un spectrophotomètre Coleman junior.

La teneur en glucose libre et en petits polymères de glucose dans l'extrait a été estimée par la méthode de DUBOIS *et al.* (1956) après hydrolyse de 1 ml d'extrait par 5 ml d'acide trichloracétique 10 % à 110°C pendant deux heures. La lecture de la densité optique a été effectuée au moyen d'un spectrophotomètre Coleman junior à 490 nm.

b) *Dosage des protéines et de la cellulose associée à la fraction fibreuse*

1. Après essorage et pesée (PF), le matériel fibreux a été soumis à l'hydrolyse alcaline (KOH 2N, 110°C), pendant quinze heures. La teneur en protéines dans 1 ml d'hydrolysat a été estimée, après neutralisation par HCl 1 N et plusieurs rinçages par H₂O distillée, selon la méthode de LOWRY *et al.* (1951) modifiée par SCHACTERLE et POLLACK (1973). L'hydrolyse a été répétée jusqu'à obtention d'une valeur nulle. Le matériel résiduel résistant à l'hydrolyse a été ensuite pesé.

2. Ce matériel résistant à l'hydrolyse alcaline a été soumis à l'hydrolyse enzymatique par une solution de cellulase (1 mg/ml dans un tampon acétate de Na-pH 4.8) à 45°C (Cellulase EC. 3.2.1.4. de *Trichoderma reesei*, Serva). Régulièrement, les hydrolysats ont été prélevés et additionnés et la solution enzymatique renouvelée. Le D(+) glucose a été dosé selon la méthode de DUBOIS *et al.* (1956). Après dix jours d'hydrolyse, 1 ml d'hydrolysat total est prélevé et traité par un volume équivalent de β -glucosidase (1 mg/ml) (EC 3.2.1.21, Boehringer).

Un témoin de cellulose (coton naturel) a été traité de la même façon que les fibres tunicales. Les valeurs des dosages en D(+) glucose ont révélé la nécessité d'utiliser la β -glucosidase pour rendre complète l'hydrolyse de la cellulose. L'utilisation de ce témoin nous a permis, comme le suggéraient SMITH et DEHNEL (1971), d'exprimer la quantité de cellulose associée aux fibres tunicales en équivalents-cellulose plutôt qu'en équivalents-glucose.

c) *Tests histochimiques*

Le matériel résistant à l'action successive et répétée du traitement par KOH à chaud et de l'hydrolyse enzymatique par la solution de cellulase a été pesé après déshydratation dans des bains successifs de méthanol, d'acétone et d'éther, et séchage à l'étuve à 40°C. Ce matériel réhydraté et le matériel fibreux ont été soumis à une série de tests histochimiques (LISON, 1960) destinés à mettre en évidence la présence :

- 1) de mucopolysaccharides neutres et acides (colorations par acide périodique-Schiff [PAS] et par le bleu alcian);
- 2) de mucopolysaccharides acides carboxyliques et sulfatés après méthylation, action des alcalis et coloration par le bleu alcian;
- 3) de fonctions réductrices par la réaction au ferricyanure ferrique;
- 4) de radicaux sulfhydryles (—SH) après réaction au ferricyanure ferrique et contrôle par l'acide monoiodoacétique;
- 5) de ponts disulfures (—S—S—), après oxydation par l'acide performique et coloration par le bleu alcian à pH 0,2 (acide sulfurique). A ce pH, seuls les groupes très acides comme le groupement sulfurique de l'acide cystéique réagissent positivement;
- 6) du noyau phénolique de la tyrosine (réaction de Millon et contrôle par la réaction de blocage au Lugol-ammoniaque).

Microscopie électronique

Des petits fragments de tunique d'*Halocynthia* et de *Phallusia* ont été fixés par immersion directe, pendant deux heures à la température du laboratoire. Les

fixateurs primaires suivants ont été utilisés : a) solution de glutaraldéhyde (3 %), dans un tampon 0,1 M de cacodylate de Na renfermant 2 % de NaCl à pH 7,4 (MILLONIG et MARINOWSKI, 1968); b) solution de glutaraldéhyde (3 %) tamponnée avec de l'eau de mer diluée (MILLONIG, 1976). Après rinçage, les échantillons ont été fixés pendant une heure à 4°C dans OsO₄ (1 %) tamponné par du cacodylate de Na ou par une solution d'eau de mer, déshydratés dans des solutions d'éthanol de concentrations croissantes et inclus dans l'Epon 812. Des sections ultrafines ont été réalisées au moyen d'un ultramicrotome LKB, contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb, et examinées au moyen d'un microscope électronique Siemens 101, sous une tension d'accélération de 80 kV.

RÉSULTATS

I. Ultrastructure

La tunique d'*Halocynthia papillosa* est limitée extérieurement par une mince couche cuticulaire (0,5 µm) (Pl. I, 4) présentant des épaissements (5 µm) en forme de plaques régulièrement espacées et portant de longues épines (Pl. I, 1). La région axiale de ces épines est formée de faisceaux de fibres verticales originaires de la couche fondamentale (Pl. I, 1 et 2). A haute résolution, la couche cuticulaire se présente comme une matrice dense aux électrons enrobant des faisceaux de fibres orientés obliquement ou perpendiculairement à la surface cuticulaire à la base des plaques (Pl. I, 3), parallèlement à celle-ci au niveau du bord supérieur des épines (Pl. I, 2).

La couche fondamentale se compose de trois régions distinctes : une région distale, sous-cuticulaire, une région moyenne stratifiée et une région proximale bordant l'assise épidermique. La couche sous-cuticulaire est relativement mince. Elle renferme de nombreuses cellules à granules denses et/ou à vacuoles (Pl. I, 4). Le système fibrillaire y est peu organisé, lâche. La région moyenne est comparativement très épaisse (1200 µm) et présente une architecture caractéristique : les éléments fibrillaires sont associés en faisceaux qui s'organisent en lamelles successives, parallèles à l'ectoderme et réunies par des ponts fibreux (Pl. II, 5). Des éléments cellulaires et des matériaux granulo-filamenteux sont disséminés entre les fibres (Pl. II, 5). La région profonde de la couche fondamentale se caractérise par la présence de cellules fusiformes à granules denses et de grandes cellules à vacuoles ou inclusions claires aux électrons (Pl. II, 6). Les éléments fibrillaires entrent en contact direct avec la membrane apicale des cellules de l'épiderme monostratifié (Pl. II, 6 et 7), assurant de la sorte une parfaite cohésion entre épiderme et couche fondamentale.

Comparée à celle de *Halocynthia*, la tunique de *Phallusia mammillata* est plus épaisse (3200 µm) et n'adhère pas à l'ectoderme (Fig. 1, 2). La couche cuticulaire, épaisse de 1 à 20 µm, est simple, continue, sans épaissement (Pl. III, 8). Elle présente une structure fibrillaire assez comparable à celle des couches fondamentales sous-jacentes, mais s'en distingue par son opacité aux électrons (Pl. III, 8). Les fibres de la couche fondamentale sont lâches, peu nombreuses (Pl. III, 10). Localement, elles s'associent en faisceaux plus ou moins parallèles entre eux, plus rarement en lamelles parallèles (Pl. III, 11). La couche fondamentale est traversée par des lacunes sanguines où sont visibles différents types cellulaires (Pl. III, 9). Les éléments cellulaires de l'espace interfibrillaire sont peu nombreux (Pl. III, 8 et 10).

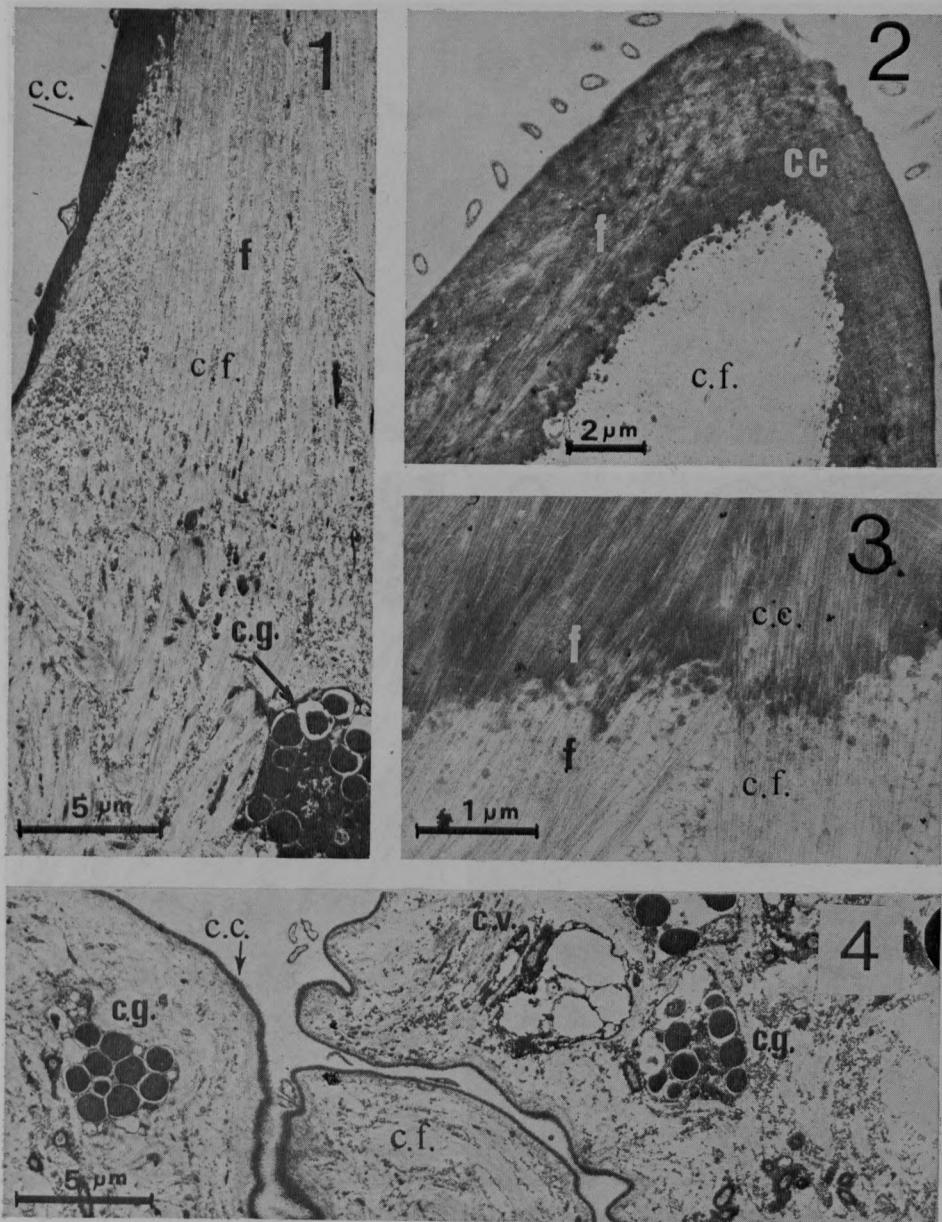


PLANCHE I

Couche cuticulaire (c.c.) et région distale de la couche fondamentale (c.f.) de la tunique de *Halocynthia papillosa*.

1 : Coupe dans la base d'une épine montrant l'épaississement de la c.c. (flèche) et la direction axiale des faisceaux de fibres (f.) de la c.f.; c.g. : cellule granuleuse.

2 : Extrémité apicale d'une épine; f : fibres cuticulaires à orientation parallèle au bord de l'épine,

3 : Zone de jonction c.e. - c.f. : les fibrilles (f) se poursuivent dans les deux couches.

4 : Vue générale de la couche tunicale périphérique entre les épines cuticulaires. La couche cuticulaire c.c. est mince et sinuée; c.g. : cellule granuleuse; c.v. : cellule vacuolaire

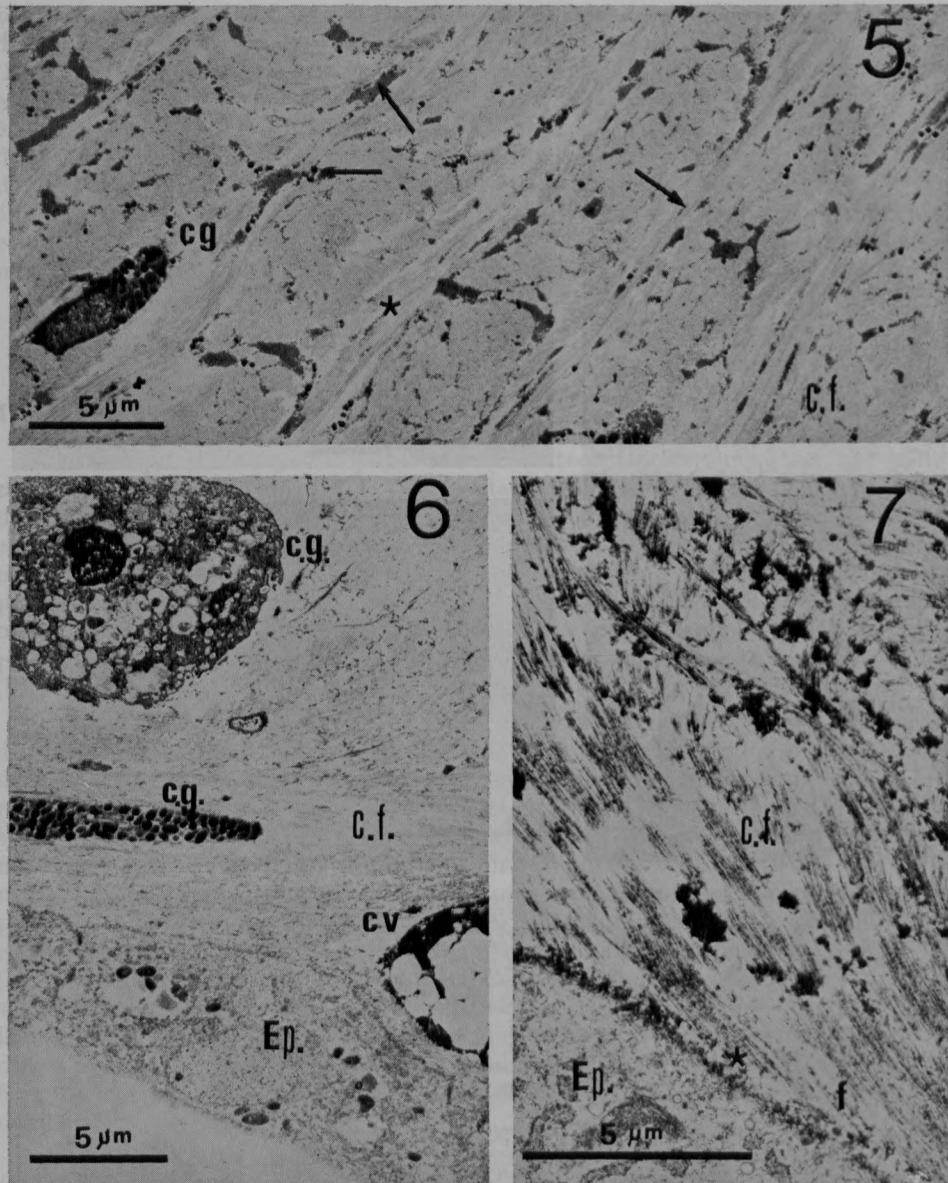


PLANCHE II

Aspects de la couche fondamentale (c.f.) et de l'épiderme (Ep.) de la tunique de *Halocynthia papillosa*.

5 : Région moyenne de la c.f. montrant l'organisation des fibres en lamelles successives (*) et la présence de cellules granuleuses (c.g.) et de matériaux granulo-filamenteux (flèches) entre les faisceaux de fibres.

6 : Région supraépidermique de la couche fondamentale; c.g. : cellules granuleuses; c.v. : cellule vacuolaire.

7 : Jonction épiderme (Ep.) — couche fondamentale de la tunique : les fibrilles (f.) sont étroitement associées à la membrane apicale des cellules épidermiques (astérisque).

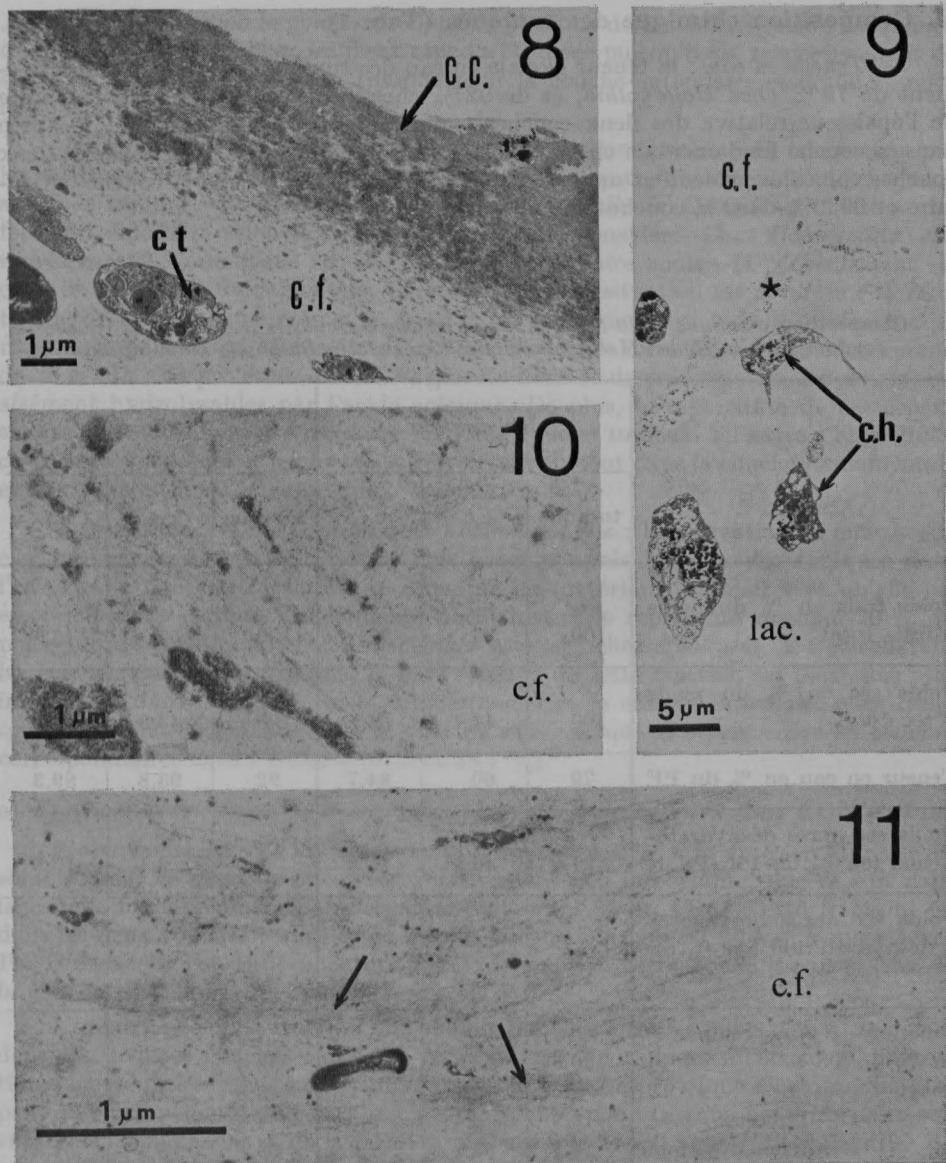


PLANCHE III

Couche cuticulaire (c.c.) et couche fondamentale (c.f.) de la tunique de *Phallusia mammillata*.

8 : La c.c., dense aux électrons, est irrégulière, sans épaississement caractéristique ;
c.t. : cellule tunicale.

9 : Partie d'une lacune hémocoeliennes (lac.) limitée par un lacis plus ou moins dense de fibrilles (astérisque) et contenant des cellules hémocoeliennes (c.h.).

10 : Aspect typique de la c.f. : les fibrilles sont lâches, peu abondantes, sans organisation apparente.

11 : Localement, les fibrilles peuvent s'associer en faisceaux lamellaires (flèches) plus ou moins parallèles entre eux.

II. Composition chimique des tuniques (Tab. 1)

— *Teneur en eau* : la teneur globale en eau des tuniques est élevée, respectivement de 79 % chez *Halocynthia*, et de 92 % chez *Phallusia*. Si l'on tient compte de l'épaisseur relative des deux couches tunicales, cette eau est surtout localisée dans la couche fondamentale chez *Halocynthia*, tandis que chez *Phallusia*, les deux couches tunicales présentent une teneur comparable (93,8 % dans la couche cuticulaire et 89,3 % dans la couche fondamentale).

TABLEAU 1

Composition chimique de la tunique, de la couche cuticulaire (c.c.) et de la couche fondamentale (c.f.) de « Halocynthia papillosa » et de « Phallusia mammillata »

	<i>Halocynthia</i>			<i>Phallusia</i>		
	tunique	c.c.	c.f.	tunique	c.c.	c.f.
Poids frais en % du poids frais total	100	23	77	100	57	43
Poids sec en % du poids sec total	100	44,4	55,6	100	43,9	56,1
Teneur en eau en % du PF	79	60	84,7	92	93,8	89,3
Poids sec après déshydratation (en % du PF (PS 1))	21,0	40,2	15,3	8,0	6,1	10,5
Poids sec après broyage et déshydratation (en % du PF) (PS 2)	14,5	17,6	13,6	4,9	5,6	4,0
Fraction « HYDROSOLUBLE » en % du PS 1	30,9	56,3	11,0	38,5	8,9	61,6
dont — protéines	4,6	2,7	6,1	3,8	4,1	3,5
— D(+) glucose	3,9	0,4	3,6	4,1	1,3	6,2
— résidu non déterminé	24,1	53,1	1,4	33,1	3,4	51,8
Fraction FIBREUSE en % du PS 1	69,1	43,7	89	61,4	91,8	38,1
dont — matériaux alcalosolubles (protéines)	7,1	15,2	1,0	1,4	1,3	1,3
— matériaux non solubles dans KOH (= « tunicine »)	62,0	28,6	88	60	90,2	36,8
dont — cellulose	32,2	6,2	52,4	37,0	65,6	14,9
— résidu insoluble	29,9	22,4	35,6	23,1	24,6	21,9

On remarque que le poids sec relatif de chacune de ces deux couches est remarquablement constant chez les deux espèces étudiées puisqu'il est respectivement de 44 % du poids sec total de la tunique pour la couche cuticulaire et de 56 % pour la couche fondamentale.

— *Importance et composition de la fraction hydrosoluble* : après traitement par les ultrasons, les substances hydrosolubles représentent globalement 30 % du poids sec de la tunique chez *Halocynthia* et 38 % chez *Phallusia*. Cette fraction est toutefois très différente selon le niveau de la tunique considéré. Chez *Halocynthia*, elle représente 59 % du poids sec de la couche cuticulaire contre 11 % seulement de celui de la couche fondamentale. Chez *Phallusia*, la situation est inversée : la fraction hydrosoluble entre pour plus de 61 % dans la composition de la couche fondamentale et pour 8,9 % seulement dans la couche cuticulaire. Cette fraction comprend de 20 à 30 % de protéines, du D(+) glucose libre et de petits polymères de glucose aisément hydrolysables par l'acide acétique. De plus, la répartition de ces constituants varie d'une espèce à l'autre et d'une couche tunicale à l'autre : chez *Halocynthia*, les protéines et le glucose se retrouvent surtout dans la couche fondamentale et dans la couche cuticulaire chez *Phallusia*.

— *Importance et composition de la fraction fibreuse* : l'observation au microscope électronique à transmission des résidus obtenus après broyage des tuniques dans l'eau révèle que cette fraction est exempte de matériaux cellulaires et qu'elle est essentiellement composée d'éléments fibrillaires. Elle représente quelque 70 % du poids sec de la tunique chez *Halocynthia* et 62 % chez *Phallusia*. En considérant les couches de chaque tunique, la part relative de cette fraction est deux fois plus importante dans la couche fondamentale que dans la couche cuticulaire chez *Halocynthia* (43,7 et 89 %), alors que ce rapport s'inverse quand on considère les couches correspondantes chez *Phallusia* (91,8 et 38,1 %).

a) Fraction soluble (protéines) et fraction insoluble (« tunicine ») dans KOH à chaud

Proportionnellement, la fraction protéique associée à la fraction fibreuse et soluble dans les alcalis à chaud est relativement peu importante, que ce soit dans la couche fondamentale de *Halocynthia* (environ 1 % du PS de cette fraction) ou dans les deux couches tunicales de *Phallusia* (plus ou moins 1 % à quelque 1,3 %). Par contre, elle constitue plus du tiers de la fraction correspondante au niveau de la couche cuticulaire de *Halocynthia*.

L'importance de la fraction non soluble dans les alcalis à chaud, ou « tunicine », dans les diverses couches tunicales varie suivant un rapport inversément proportionnel à celui des valeurs déterminées pour la fraction protéique alcalo-soluble. On peut noter cependant que la tunicine représente pour la tunique prise dans son ensemble au moins 90 % de la fraction fibreuse que ce soit chez *Halocynthia* (90 %) ou *Phallusia* (98 %).

D'autre part, la part prise par la cellulose dans la composition de la tunicine varie d'une manière significative suivant l'espèce et les régions tunicales que l'on considère. Elle constitue en effet respectivement 20 et 60 % de la tunicine associée à la couche cuticulaire et à la couche fondamentale de *Halocynthia*, 70 et 40 % de la tunicine des deux couches correspondantes chez *Phallusia*.

Plus important dans la tunicine associée à la couche cuticulaire de *Halocynthia* (\pm 80 %), le résidu résistant à l'action répétée des solutions alcalines à chaud et des solutions enzymatiques (pronase, cellulase) représente environ 40 % de cette fraction dans la couche fondamentale de cette espèce tandis qu'il représente respec-

tivement 27 et 60 % de la couche cuticulaire et la couche fondamentale de *Phallusia*. Au microscope optique, ce résidu se présente comme des lamelles constituées d'un matériel amorphe, non fibreux.

b) Caractérisation histochimique

Les résultats des réactions histochimiques testées sur le matériel fibreux et sur la fraction résiduelle insoluble dans les alcalis à chaud et dans les solutions enzymatiques, respectivement chez *Halocynthia* et chez *Phallusia* sont reportées dans le Tab. 2. De l'examen de ce tableau, il ressort que le profil histochimique des couches tunicales correspondantes est fort comparable dans les deux espèces étudiées. En effet, le matériel fibreux manifeste une réaction positive pour les mucopolysaccharides acides sulfatés, pour les protéines riches en résidus tyrosine et pour les radicaux disulfures, ces deux dernières réactions étant particulièrement positives au niveau des couches cuticulaires. Comparativement, la fraction insoluble se caractérise par l'absence de protéines riches en résidus tyrosine et de mucopolysaccharides neutres ou acides. Par contre, la mise en évidence de liaisons —S—S— y est nettement positive, notamment au niveau de la couche cuticulaire, dans les deux espèces étudiées.

DISCUSSION

La tunique ou test des Tuniciers est une structure vivante qualifiée de mésenchyme périphérique (BRIEN, 1937) ou encore de conjonctif physiologique (PERES, 1948). Outre le rôle de protection et de soutien qu'on lui attribue généralement, elle peut servir selon les circonstances de rein d'accumulation à l'adulte et de milieu nutritif au bourgeon (GODEAUX, 1964). D'un point de vue biomécanique, elle sert de point d'appui à l'animal dans les mouvements de contraction dont elle limite l'amplitude en fonction de sa souplesse propre. A cet égard, les tuniques des Ascidielles *Halocynthia papillosa* (Stolidobranche) et *Phallusia mammillata* (Phlébobranche) se présentent comme des systèmes très différents. La première est coriace et dure, parfaitement déformable, élastique et étroitement associé à l'assise épidermique sous-jacente; la seconde est turgescente, peu déformable et peu élastique, sans relation apparente avec l'épiderme. L'ensemble de nos observations montrent que les matériaux de base (eau, protéines, polysaccharides, protéoglycans), qui entrent dans la composition de ces tuniques, sont qualitativement fort semblables. Parmi ces matériaux, on peut rappeler la cellulose dont la présence chez les Tuniciers leur confère un caractère exceptionnel dans le règne animal. L'étude comparée de la structure des tuniques et l'analyse quantitative de leurs principaux constituants révèlent néanmoins que l'organisation ultrastructurale et la distribution des matériaux varient non seulement suivant l'espèce considérée, mais également selon la région tunicale examinée. Ces particularités peuvent être mises en relation avec les propriétés de dureté, de souplesse ou de rigidité, d'élasticité ou de résistance aux déformations mécaniques d'origines diverses.

1. La couche fondamentale

La couche fondamentale présente les caractéristiques générales des tissus conjonctifs au sens large. Elle est en effet constituée des trois composantes classiques, à savoir des éléments cellulaires — une substance fondamentale et des éléments fibrillaires, dont l'importance et l'organisation varient d'une espèce à l'autre et d'une couche tunicale à l'autre.

TABLEAU 2

Caractérisation histochimique de la fraction fibreuse des tuniques de « *Halocynthia* » et « *Phallusia* » respectivement avant (= « fibres ») et après traitement par les solutions alcalines à chaud et par les solutions enzymatiques (pronase, cellulase) (= « résidu »)

		<i>Halocynthia papillosa</i>				<i>Phallusia mammillata</i>			
		couche cuticulaire		couche fondamentale		couche cuticulaire		couche fondamentale	
		Fibres	Résidu	Fibres	Résidu	Fibres	Résidu	Fibres	Résidu
Substances ou radicaux mis en évidence	Réaction								
Mucopolysaccharides neutres	P.A.S.	—	—	—	—	—	—	—	—
Mucopolysaccharides acides	Bleu alcian	+	—	+	—	+	—	+	—
Mucopolysaccharides acides sulfatés	Bleu alcian	+	—	+	—	+	—	+	—
Mucopolysaccharides acides carboxyliques	Bleu alcian	—	—	—	—	—	—	—	—
Groupes réducteurs	Ferricyanure ferrique	+	+	+	+	+	+	+	+
Phénols (tyrosine)	Millon	+	—	+	—	+	—	+	—
Radicaux-SH	Ferricyanure ferrique	—	—	—	—	—	—	—	—
Radicaux-S-S	Acide performique-Bleu alcian	++	++	+	+	+	++	+	+

a) La substance interfibrillaire (ou fondamentale) et les éléments cellulaires

Ces deux composantes sont aisément séparées de la fraction fibreuse par broyage dans l'eau et centrifugation. Les matières sèches qui les composent constituent ce que nous avons appelé la fraction hydrosoluble et représentent 11 % seulement du poids sec de la couche fondamentale chez *Halocynthia* contre 62 % chez *Phallusia*. Ces valeurs s'expliquent par la structure des deux types de tuniques où on assiste d'une part au développement considérable du système fibreux chez *Halocynthia* et d'autre part à l'existence de nombreuses lacunes et à une dispersion des éléments fibrillaires chez *Phallusia*.

Le nombre, l'origine et la fonction des cellules tunicales demeurent des sujets très controversés (GOODBODY, 1974; BARRINGTON, 1974; DE LEO *et al.*, 1981; WELSCH, 1984). Sans qu'il soit dans notre intention de résoudre cet aspect du problème, on peut raisonnablement considérer qu'outre la présence de certaines cellules à caractère transitoire et/ou spécifique (ferrocytes, vanadocytes, phagocytes, ...), il existe une catégorie de cellules qui jouent un rôle de première importance dans l'élaboration et le dépôt des matériaux tunicaux. L'activité de ces cellules (« mature morula cells » et « dispersed vesicular cells » de SMITH, 1970a — correspondant respectivement aux « cellules granuleuses » et aux « cellules vacuolaires » de STIEVENART, 1971), d'origine hémocoelienne, jointe à celle de l'épiderme, assureraient la croissance continue et les réparations du tissu tunical au cours de la vie de l'organisme (voir ci-après).

La substance fondamentale est d'apparence homogène, peu dense aux électrons. Il semble bien établi qu'elle est composée en grande partie d'eau d'imbibition (STIEVENART, 1971; présents résultats : respectivement 84,7 % et 89,3 % du poids frais chez *Halocynthia* et *Phallusia*) et qu'elle contient de nombreux composés mucopolysaccharidiques acides (ROBINSON *et al.*, 1983). Chez *Halocynthia*, ces derniers seraient principalement de nature sulfatée (STIEVENART, 1971), ce qui paraît confirmé par l'extraction de plusieurs glycanes sulfatés hydrosolubles (ALBANO et MOURÃO, 1983; 1986), dont le galactane sulfate (TODA *et al.*, 1978) et la chitine sulfate (ANNO *et al.*, 1974). Des sites récepteurs de la WGA (« wheat germ agglutinin »), lectine spécifique des résidus N-acetylglucosamines, ont été également localisés au moyen de particules d'or colloidal au niveau de l'espace interfibrillaire de la substance fondamentale de *Halocynthia* (VAN DAELE et GOFFINET, 1984). Les mucopolysaccharides acides sulfatés constituerait également une part importante de la substance fondamentale de *Phallusia* (STIEVENART, 1970). Ces mucopolysaccharides ne seraient pas des dérivés de l'acide hyaluronique (ENDEAN, 1961). La fraction hydrosoluble de la couche fondamentale renfermerait également des acides aminés libres (MORRIS *et al.*, 1982) ainsi que du glucose libre, de petits polymères de glucose et des protéines (présent travail). Ces protéines correspondent aux protéines riches en groupes sulphydrylés signalées par STIEVENART (1970, 1971) et dont nous ne retrouvons pas trace au niveau des fibres isolées. L'existence de protéines, glycoprotéines (TSUCHIYA et SUSUKI, 1962) ou mucoprotéines (BARRINGTON et THORPE, 1968), au sein de la substance interfibrillaire de certaines espèces d'Ascidies paraît ainsi confirmée. Cependant, si ces observations constituent une hypothèse de travail intéressante, leur interprétation exige la prudence dans la mesure où la présence de ces constituants dans la substance fondamentale des tuniques peut être le résultat d'une contamination (en provenance des éléments cellulaires par exemple) due au mode de préparation de l'extrait aqueux. Toutefois, cette contamination devrait être limitée en raison de la pauvreté en cellules tunicales des deux espèces étudiées.

b) Le système fibreux

Très importante dans la couche fondamentale de *Halocynthia* (près de 90 % du poids sec), la fraction fibreuse représente quelque 38 % seulement du poids sec chez *Phallusia*. L'analyse chimique et les tests histochimiques révèlent que, qualitativement, cette fraction est comparable chez les deux espèces. On y distingue en effet trois composantes essentielles : une composante protéique alcalo-soluble, une composante fibrillaire cellulosique comparable aux fibrilles de cellulose I végétale et bactérienne et une composante résiduelle insoluble dans les bases à chaud et les solutions enzymatiques (pronase, cellulase), ces deux dernières composantes formant la fraction alcalo-insoluble des fibres, la tunicine dans le sens défini par SMITH et DEHNEL (1970, 1971). L'étude ultrastructurale des deux types de tuniques montre d'autre part qu'il existe un plan d'organisation du système fibrillaire très différent dans la couche fondamentale des deux espèces.

Composition chimique : Si ce n'est sa nature protéique, la composition de la fraction fibreuse alcalo-soluble de la tunique de *Phallusia*, comme celle de *Halocynthia*, est totalement hypothétique. La présence de fibrilles de pseudo-collagène et de pseudo-élastine, en plus du matériel fibreux de nature cellulosique (= tunicine) est signalée chez le Phlébobranche *Ciona* (PATRICOLE et DE LEO, 1979). Mais chez *Halocynthia*, comme chez d'autres espèces d'Ascidies, l'absence d'hydroxyproline dans les hydrolysats de cette fraction (SMITH et DEHNEL, 1970, 1971), ne plaide guère en faveur de cette interprétation. A l'heure actuelle, il n'est guère possible d'affirmer avec certitude, du moins chez *Halocynthia* et *Phallusia*, si cette fraction protéique correspond à un système fibrillaire distinct de la tunicine ou si elle est associée à cette dernière comme le supposent certains auteurs (HALL et SAXL, 1961; SMITH et DEHNEL, 1970) ou le suggèrent encore des observations récentes en microscopie électronique à haute résolution (VAN DAELE et GOFFINET, observations inédites). Néanmoins, nos résultats histochimiques montrent qu'il s'agit d'une fraction protéique riche en résidus tyrosine ce qui n'exclut donc pas la possibilité comme le suggèrent KRISHNAN et RAMAMURTHI (1976) qu'elle renferme des matériaux précurseurs d'un tannage quinonique. D'ailleurs, chez *H. papillosa*, la réaction positive à la liqueur de Fontana est maintenue après action de l'eau bouillante mais disparaît après action de NaOH à chaud (STIEVENART, 1971).

D'autre part, la résistance d'une fraction non négligeable de la tunicine (résidu insoluble, Tab. I) aux bases à chaud et aux solutions enzymatiques, soulève évidemment le problème de sa nature. Une telle résistance aux agents de dégradation chimiques et/ou enzymatiques, a été signalée à de nombreuses reprises (ROCHE et al., 1964; SMITH et DEHNEL, 1970, 1971; KRISHNAN et RAMAMURTHI, 1976) chez plusieurs Ascidies (*Halocynthia*, *Pyura*, *Cnemidocarpa*, *Polyclinum*) alors que d'autres espèces, telles *Corella willmeriana* et *Ascidia paratropa*, possèdent une tunicine constituée exclusivement de cellulose (SMITH et DEHNEL, 1971). Les raisons évoquées pour expliquer cette résistance sont diverses : présence de scléroprotéines (ROCHE et al., 1964), haut degré de cristallinité de la cellulose tunicale (HUNT, 1970), formation d'un complexe tripartite par association de protéines à radicaux —SH, de cellulose et de mucopolysaccharides acides (KRISHNAN et RAMAMURTHI, 1976). Chez *Halocynthia* et *Phallusia*, nos résultats histochimiques, combinés aux observations originales de STIEVENART (1970, 1971) vont également dans le sens de l'existence d'un complexe tripartite entre cellulose, protéines et mucopolysaccharides acides. Toutefois, chez ces deux espèces, cellulose et mucopolysaccharides seraient associées à des protéines riches en ponts disulfures, ces dernières se retrouvant notamment au niveau du résidu insoluble dans les bases à chaud et les solutions enzymatiques.

Organisation : Chez *Halocynthia*, l'association des fibres de tunicine (ou d'un complexe protéine-tunicine) en faisceaux et lamelles parallèles suivant une architecture spatiale hélicoïdale présente une organisation et des propriétés comparables à celles que l'on trouve au niveau des « contreplaqués torsadés ». Ce type d'organisation largement décrit par BOULIGAND (1972) rappelle celui des cristaux liquides en phase cholestérique (= pseudomorphose cholestérique). Il se retrouve dans de nombreux matériaux biologiques (système chitino-protéique de la cuticule des Arthropodes, système collagène de l'os haversien compact, des écailles de nombreux poissons, du derme de certains échinodermes, etc ...) et leur confère une résistance optimale aux contraintes mécaniques d'origines diverses. Lorsqu'ils ne subissent aucun durcissement secondaire par dépôt de sels minéraux (sclérites des Crustacés par exemple) ou par tannage protéique important (sclérites des Insectes), ces systèmes se caractérisent également par leur souplesse, propriété que l'on peut observer au niveau de la tunique de *Halocynthia* lors des « contractions » de grande amplitude de l'organisme. L'efficacité de ces systèmes requiert, comme c'est le cas chez *Halocynthia* (et les Arthropodes en général), une parfaite solidarité entre l'exosquelette, l'ectoderme et le système musculaire sous-jacent.

La mise en place des matériaux fibrillaires cellulo-protéiques se réaliserait par l'intervention de deux types cellulaires bien distincts : l'épiderme, en particulier la membrane plasmique apicale, serait directement impliqué dans le dépôt de la fraction mucopolysaccharidique neutre (cellulose) et acide alors que la fraction protéique qui lui est associée résulterait de l'activité de certaines cellules granuleuses intratunicales d'origine hémocoeliennes, les « morula cells » (ROBINSON *et al.*, 1983). Des centres organisateurs membranaires comparables aux « plaques denses » dont on connaît le rôle dans le dépôt et l'organisation des microfibrilles chitino-protéiques chez les Insectes (LOCKE, 1970) et les Crustacés (GOFFINET et COMPÈRE, 1986) n'ont pas été observés chez *Halocynthia*.

Comparé à celui de *Halocynthia*, le système fibrillaire de la couche fondamentale de la tunique de *Phallusia* présente une organisation rudimentaire. Les fibres cellulo-protéiques y sont lâches, dispersées, rarement associées en faisceaux et ne constituent jamais des lits et lamelles parallèles suivant une architecture spatiale torsadée. L'importance relative de la substance fondamentale ainsi que la présence de nombreuses lacunes confèrent ainsi une consistance molle à la couche fondamentale de cette tunique.

2. La couche cuticulaire

Chez les deux espèces étudiées, la couche cuticulaire se distingue de la couche fondamentale par l'absence de cellules et par une opacité accrue au rayonnement électronique. De plus, malgré son épaisseur relativement faible, elle constitue chez les deux espèces plus de 40 % du poids sec de la tunique entière. En réalité, c'est aux propriétés de la couche cuticulaire que la tunique doit son aspect sclérfié chez *Phallusia*, sa consistance coriacée chez *Halocynthia*. La composition chimique de cette couche, de même que son organisation structurale, sont en effet très différentes chez l'une et l'autre espèces.

a) Substance interfibrillaire

La substance interfibrillaire de la couche cuticulaire se présente comme une matrice dense aux électrons enrobant les fibres. Elle se caractérise, chez *Halocynthia*, par une teneur en eau relativement peu élevée (60 % contre 94 % chez *Phallusia*)

alors que les matériaux hydrosolubles y sont comparativement plus abondants (56 % contre 9 % seulement chez *Phallusia*). Ses constituants sont toutefois mal connus. Les réactions histochimiques y révèlent la présence de scléroprotéines (ROCHE *et al.*, 1964; KENNEDY, 1966) ou encore de matériaux précurseurs du tannage protéique (STIEVENART, 1970, 1971), ce qui peut être mis en rapport avec la dureté que présentent la couche périphérique de la tunique de *Phallusia* et celle de *Halocynthia*, du moins au niveau des épines tunicales. Chez cette dernière espèce, la présence de substances à résidus N-acétyl-glucosamines (VAN DAELE et GOFFINET, 1984) n'y est pas exclue.

b) *Le système fibreux*

Comme celles de la couche fondamentale, les fibres de la couche cuticulaire de *Phallusia* sont constituées en grande partie de tunicine (98 %), les trois quarts de cette dernière revenant à la cellulose. Chez *Halocynthia* par contre, la cellulose n'entre que pour 22 % environ dans la composition de la tunicine cuticulaire (contre 60 % dans celle de la couche fondamentale), la fraction protéique alcalo-soluble représentant 35 % du système fibreux. La couche cuticulaire de *Phallusia* peut donc être considérée, ainsi que l'avait déjà proposé STIEVENART (1971), comme une simple couche de condensation périphérique des matériaux tunicaux non cellulaires, assurant un certain durcissement et la rigidité de l'ensemble tunical.

Le problème paraît plus complexe chez *Halocynthia*. Même si nos informations sur la nature des constituants protéiques demeurent encore très fragmentaires, il est probable que l'organisation et la composition chimique originales du système fibreux de la couche cuticulaire, jointes à celles de la matrice interfibrillaire, puissent être mises en relation avec les propriétés mécaniques particulières de cette couche. En effet, au niveau des plaques épineuses, la couche cuticulaire est épaisse, dure, résistante aux déformations. Les éléments fibrillaires y sont orientés parallèlement à la surface selon le grand axe de l'épine. Entre les plaques, elle se réduit à un mince liseré (0,5 µm) doué d'une souplesse remarquable au point qu'une contraction importante de l'organisme entraîne le chevauchement des plaques basales supportant les épines tunicales. A cet égard, elle présente une organisation quelque peu comparable à celle de l'épicuticule des cuticules souples soumises à des contraintes mécaniques répétées, telles qu'on en trouve chez les Arthropodes (cfr. membranes articulaires). C'est ainsi que la couche cuticulaire se présente comme une enveloppe continue, la matrice dense aux électrons y assurant la cohésion des éléments fibrillaires entre eux; ces derniers, dont l'orientation est perpendiculaire ou oblique à la surface tunicale, assurant à leur tour un ancrage de la couche superficielle avec les strates sous-jacentes de la couche fondamentale.

REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leur reconnaissance à Monsieur le Professeur J. Godeaux pour les critiques et le soutien qu'il n'a cessé de prodiguer lors de la réalisation de ce travail. Ils remercient également Madame N. Decloux pour son aide technique, Madame Ch. De Ridder-Breeur pour l'iconographie et Madame O. Gilson pour la dactylographie.

RÉFÉRENCES

- ALBANO, R. M. and P. A. S. MOURÃO (1983) — Presence of sulfated glycans in Ascidian tunic and in the body wall of a sea cucumber. *Biochim. biophys. Acta*, **760**, 192-196.
- ALBANO, R. M. and P. A. S. MOURÃO (1986) — Isolation, fractionation and preliminary characterization of a novel class of sulfated glycans from the tunic of *Styela plicata* (Chordata tunicata). *J. Biol. Chem.*, **261**, 758-765.
- ANNO, K., K. OTSUKA and N. SENO (1974) — A chitin sulfate like polysaccharide from the test of tunicate *Halocynthia roretzii*. *Biochim. biophys. Acta*, **362**, 215-219.
- BARRINGTON, E. J. W. (1974) — *Biochemistry of primitive Deuterostomians*. In : FLORKIN, M. and B. T. SCHEAR (eds), *Chemical Zoology*, Academic Press, New York and London, 640 p.
- BARRINGTON, E. J. W. (1975) — Problems of iodine binding in ascidians. In : BARRINGTON, E. J. W. and R. P. S. JEFFERIES (eds), *Protochordates. Symp. Zool. Soc. (London)*, **36**, 129-158.
- BARRINGTON, E. J. W. and A. THORPE (1968) — Histochemical and biochemical aspects of iodine binding in the tunic of the ascidian *Dendrodoa grossularia* (van Beneden). *Proc. R. Soc.*, **171B**, 91-109.
- BOULIGAND, Y. (1972) — Twisted fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases. *Tissue Cell*, **4**, 189-217.
- BRIEN, P. (1937) — Formation des coenobies chez les Polyclinidae. *Ann. Soc. R. Zool. Belg.*, **67**, 63-73.
- DECK, J. D., E. D. HAY and J. P. REVEL (1966) — Fine structure and origin of the tunic of *Perophora viridis*. *J. Morphol.*, **120**, 267-280.
- DE LEO, G., E. PATRICOLA and G. FRITTTITA (1981) — Fine structure of the tunic of *Ciona intestinalis* L. II. Tunic morphology, cell distribution and their functional importance. *Acta zool. (Stockh.)*, **62**, 259-271.
- DUBOIS, M., K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. REBERS and F. SMITH (1956) — Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.*, **28**, 350-356.
- ENDEAN, R. (1961) — The test of the ascidian *Phallusia mammillata*. *Q. J. Microsc. Sci.*, **102**, 107-117.
- GODEAUX, J. (1964) — Le revêtement cutané des Tuniciers. *Studium generale*, Jahrg. **17**, 176-190.
- GOFFINET, G. and P. COMPÈRE (1986) — Pore canals and ultrastructural organization of chitinoproteins in calcified and non-calcified layers of the cuticle of the crab *Carcinus maenas*. In *Chitin in Nature and Technology*, ed. MUZZARELLI, R. A. A., Ch. JEUNIAUX and G. W. GOOD, ed. Plenum Publ. Corp., pp. 37-43.
- GOODBODY, I. (1974) — The physiology of ascidians. In : RUSSEL, F. S. and M. YONGE (eds), *Adv. Mar. Biol.*, **12**, 1-149.
- HALL, D. A. and H. SAXL (1961) — Studies of human and tunicate cellulose and their relation to reticulin. *Proc. R. Soc.*, **155**, 202-217.
- HUNT, S. (1970) — *Polysaccharide-protein complexes in invertebrates*. Academic Press, New York, 329 p.
- KENNEDY, G. R. (1966) — The distribution and nature of iodine compounds in ascidians. *Gen. Comp. Endocrin.*, **7**, 500-511.
- KRISHNAN, G. and R. RAMAMURTHI (1976) — On the polysaccharide-protein complex of the tunic of *Polyclinum madrasensis* Sebastian. *Indian J. exp. Biol.*, **14**, 113-116.
- LISON, L. (1960) — *Histo chimie et cyto chimie animale, I et II*. Gauthier-Villars (eds), Paris, 842 p.
- LOCKE, M. (1970) — The molt-intermolt cycle of the epidermis and other tissues of an insect *Calpodes ethlius* (Lepidoptera Hesperiidae). *Tissue Cell*, **2**, 197-223.

- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL (1951) — Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MILLONIG, G. (1976) — *Laboratory manual of biological electron microscopy*. Saviolo M. (ed.), Vercelli, 67 p.
- MILLONIG, G. and V. MARINOTZI (1968) — Fixation and embedding in electron microscopy. In : *Adv. Optical and Electron Microscopy*. Academic Press, New York and London, **2**, 251-341.
- MORRIS, R. J., M. J. McCARTNEY and Q. BONE (1982) — The distribution of sterols and stanols in the tunicate *Ciona intestinalis*. *J. mar. Biol. Assoc. U.K.*, **62**, 117-123.
- PATRICOLO, E. and G. DE LEO (1979) — Studies on the fibrous component of the test of *Ciona intestinalis* Linnaeus. II. Collagen-elastin like protein. *Acta zool. (Stockh.)*, **60**, 259-269.
- PERES, J. M. (1948) — Recherches sur le sang et la tunique commune des Ascidiés composées. I. Aplousobranchiata (Polyclinidae et Didemnidae). *Ann. Int. Oceanogr. (Paris)*, **23**, 345-473.
- ROBINSON, W. E., K. KUSTIN and G. C. MC LEOD (1983) — Incorporation of [¹⁴C] glucose into the tunic of the Ascidian, *Ciona intestinalis* (Linnaeus). *J. exp. Zool.*, **225**, 187-195.
- ROCHE, J., G. RAMETTA and S. VARRONE (1964) — Métabolisme de l'iode et formation d'iodothyronines (T_3 and T_4) au cours de la régénération de la tunique chez une Ascidie, *Ciona intestinalis* L. *Gen. Comp. Endocr.*, **4**, 277-284.
- SAINTE HILAIRE, K. (1931) — Morphogenetische Untersuchungen des Ascidiens-Mantels. *Zool. Jahrb. (Abt. Anat. Ontog. d. Tiere)*, **54**, 435-608.
- SCHACTERLE, G. R. and R. L. POLLACK (1973) — A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. *Anal. Biochem.*, **51**, 654-655.
- SMITH, M. (1970a) — The blood cells and tunic of the Ascidian *Halocynthia aurantium* (Pallas). I. Hematology, tunic morphology and partition of cells between blood and tunic. *Biol. Bull.*, **138**, 354-378.
- SMITH, M. (1970b) — The blood cells and tunic of the Ascidian *Halocynthia aurantium* (Pallas). II. Histochemistry of the blood cells and tunics. *Biol. Bull.*, **138**, 379-388.
- SMITH, M. and P. A. DEHNEL (1970) — The chemical and enzymatic analyses of the tunic of the Ascidian *Halocynthia aurantium* (Pallas). *Comp. Biochem. Physiol.*, **35**, 17-30.
- SMITH, M. and P. A. DEHNEL (1971) — The composition of tunic from four species of Ascidiens. *Comp. Biochem. Physiol.*, **40B**, 615-622.
- STIEVENART, J. (1970) — Recherches histologiques sur la tunique de deux ascidies phlebobranches : *Ascidia aspersa* Müll. et *Phallusia mammillata* Cuv. *Ann. Soc. R. Zool. Belg.*, **100**, 139-157.
- STIEVENART, J. (1971) — Recherches sur la morphologie et étude histochimique de la tunique d'*Halocynthia papillosa* Gun. (Ascidie stolidobranche). *Ann. Soc. R. Zool. Belg.*, **601**, 25-56.
- TODA, N., T. HORIKAWA, K. ANNO and N. SENO (1978) — Galactan sulfate from the test of tunicates. *Carbohydr. Res.*, **62**, 389-392.
- TSUCHIYA, Y. and Y. SUSUKI (1962) — In : HUNT, S. (1970), *Polysaccharide protein complexes in Invertebrates*. Academic Press, New York, 329 p.
- VAN DAELE, Y. and G. GOFFINET (1984) — Mise en évidence par marquage à l'or colloïdal de la chitine associée à la cuticule du crabe *C. maenas* et à la tunique d'une Ascidie *Halocynthia papillosa*, résultats préliminaires. *Biol. Cell.*, **51**, 27 (a).
- WELSCH, U. (1984) — In : BEREITTER-HAHN, J., A. G. MATOLTSY and K. S. RICHARDS (eds), *Biology of the integument. 1. Invertebrates*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 841 p.