

EUR 2475.f

COMMUNAUTE EUROPEENNE DE L'ENERGIE ATOMIQUE - EURATOM

LIBRARY COPY

ETUDE DE L'ABSORPTION SELECTIVE DU STRONTIUM PAR LES ACANTHAIRES

par

G. DELRIO et G. MERINFELD
(sous la direction du Professeur J. BOUILLON)

Rapport annuel février 1963 - mars 1964

1965



Rapport établi par l'U.L.B.
Université Libre de Bruxelles, Belgique
Laboratoire de Zoologie et Biologie

Contrat Euratom N° 015-62-2 BIOB

AVERTISSEMENT

Le présent document a été élaboré sous les auspices de la Commission de la Communauté Européenne de l'Energie Atomique (EURATOM).

Il est précisé que la Commission d'EURATOM, ses cocontractants, ou toute personne agissant en leur nom :

- 1° — Ne garantissent pas l'exactitude ou le caractère complet des informations contenues dans ce document, ni que l'utilisation d'une information, d'un équipement, d'une méthode ou d'un procédé quelconque décrits dans le présent document ne porte pas atteinte à des droits privatifs;
- 2° — N'assument aucune responsabilité pour les dommages qui pourraient résulter de l'utilisation d'informations, d'équipements, de méthodes ou procédés divulgués dans le présent document.

Ce rapport est vendu au prix de 100,— francs belges, sur demande adressée à : PRESSES ACADÉMIQUES EUROPÉENNES - 98, Chaussée de Charleroi, Bruxelles 6.

Le paiement se fait par versement à la :

- BANQUE DE LA SOCIÉTÉ GÉNÉRALE (Agence Ma Campagne) - Bruxelles - compte N° 964.558,
- BELGIAN AMERICAN BANK AND TRUST COMPANY - New York - compte N° 22.186,
- LLOYDS BANK (Europe) Ltd. - 10, Moorgate - London E.C.2,

en mentionnant la référence : «EUR 2475.f - ETUDE DE L'ABSORPTION SELECTIVE DU STRONTIUM PAR LES ACANTHAIRES».

Achévé d'imprimer par Guyot, s.a.,
Bruxelles, novembre 1965.

EUR 2475.f

COMMUNAUTE EUROPEENNE DE L'ENERGIE ATOMIQUE - EURATOM

**ETUDE DE L'ABSORPTION SELECTIVE
DU STRONTIUM PAR LES ACANTHAIRES**

par

G. DELRIO et G. MERINFELD
(sous la direction du Professeur J. BOUILLON)

Rapport annuel février 1963 - mars 1964

1965



Rapport établi par l'U.L.B.
Université Libre de Bruxelles, Belgique
Laboratoire de Zoologie et Biologie

Contrat Euratom N° 015-62-2 BIOB

TABLE DES MATIERES

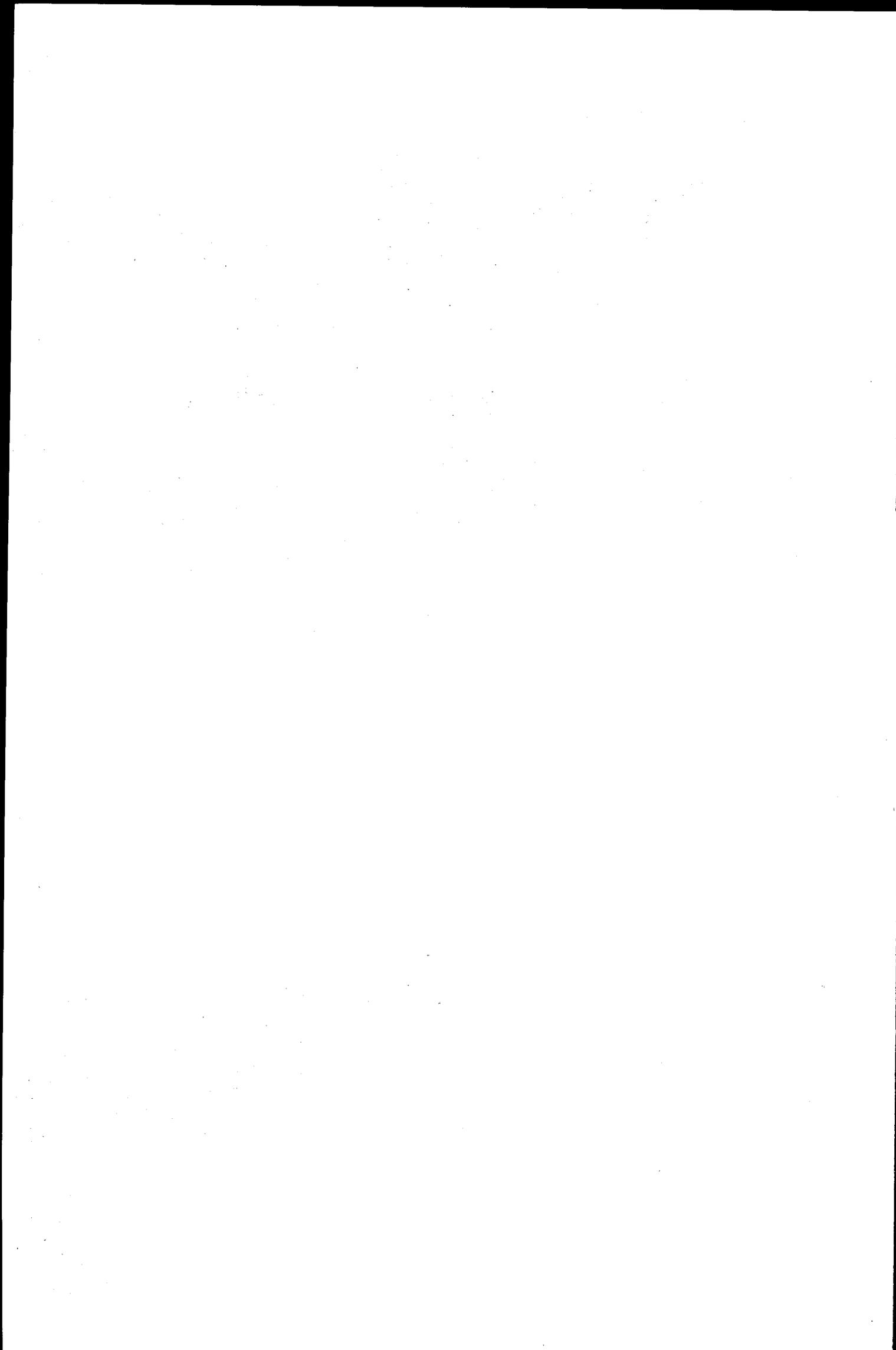
PARTIE ECOLOGIQUE et BIOLOGIQUE

1.- Methodes de pêche des Acanthaires pour buts autres que les recherches écologiques	5
1.1- Méthodes employées à l'origine	5
1.2- Amélioration ultérieures	6
2.- Examen et tri des Acanthaires vivants	7
2.1- Examen préliminaire	7
2.2- Nettoyage des Acanthaires	7
2.3- Prélèvement	8
2.4- Examen détaillé des individus	8
3.- Essais de cultures d'Acanthaires	8
3.1- Introduction	8
3.2- Seconde série d'essais	11
3.3- Troisième série d'essais	15
3.4- Quatrième série d'essais	17
3.5- Synthèse des résultats et perspectives	19
4.- Cytologie, Cytochimie	22
4.1- Introduction	22
4.2- Techniques	23
4.3- Résultats	30
5.- Systématique	31
5.1- Constitution d'une collection	31
5.2- Classification et phylogénie des Acanthaires	31
5.3- Délimitation d'espèces voisines	33
5.4- Nouvelles espèces	33
6.- Ecologie	33
6.1- Techniques	33
6.2- Valeur des résultats	34
6.3- Quelques données partielles sur l'abondance des Acanthaires au cours de l'année	34
6.4- Recherches spéciales	34
7.- Biologie	35
7.1- Mouvements	35
7.2- Enkystement	35
8.- Remarque	35
Bibliographie	36

PARTIE CHIMIQUE

Chapitre 1 : Analyse de l'azote organique contenu dans les Acanthaires	41
Chapitre 2 : Métabolisme de l'ion SO_4	43

Chapitre 3 : Détermination de l'oxygène et de la salinité dans l'eau de mer	45
3.1- Détermination de l'oxygène par la méthode de Winkler	45
3.2- Détermination de la salinité	46
3.3- Analyse des nitrites	46
3.4- Analyse des nitrates	47
3.5- Analyse des phosphates	49
3.6- Mesure du pH	50
Essais d'Electrophorèse	50
Note sur la Chromatographie	51
Méthode visant à détecter la présence d'amino-acides sulfurés	51
Note sur l'autoradiographie au Sr 90	51
Bibliographie	53



PARTIE ECOLOGIQUE ET BIOLOGIQUE

1. - METHODES DE PECHE DES ACANTHAIRES POUR BUTS AUTRES QUE LES RECHERCHES ECOLOGIQUES

1.1. - Méthodes employées à l'origine

D'août 1962 à septembre 1963, on a employé, faute d'expérience en ce domaine, la méthode couramment utilisée à la Station zoologique de Naples depuis des années pour la récolte du zooplancton.

- 1.1.1. - Lieux de récolte: En général, au-dessus du fond d'Ammontatura, au large de Nisida (fig. 37). Ce fond se trouve par 100-150 m de profondeur, à la tête de la principale vallée sous-marine du golfe de Naples.
- 1.1.2. - Heures de pêche: Elles ont d'abord été fixées vers 3 h du matin en général, afin d'obtenir le plancton de nuit, que l'on supposait plus riche. La difficulté d'opérer ces pêches de nuit en hiver, par une température souvent inférieure à 0 °C., a ensuite fait préférer les heures plus tardives (en général 10 h du matin). Les récoltes, servant également aux recherches écologiques, ont été faites par conséquent à des heures aussi proches que possible d'un jour à l'autre (cf. partie "Ecologie", 6. 2. 1. 2.).
- 1.1.3. - Instruments: On a employé les filets ordinairement en usage à la Station pour le zooplancton de faible calibre. Ils ont 70 cm d'ouverture, 150 à 200 cm de long, et sont de forme conique. Leur tissu est en nylon à mailles carrées de 0,3 mm de largeur environ. On leur attache un bocal de verre, simple, de 2,5 litres environ et sans oreillettes latérales.
- Lors de la sédimentation du plancton au fond des bocal, les spicules des Acanthaires s'empêtrent souvent dans le corps ou les appendices de divers animaux et dans les amas de détritus ("seston") dont il est difficile de les séparer ensuite. Pour empêcher l'entrée dans le filet d'animaux plus grands que les Acanthaires, on a appliqué quelquefois sur l'ouverture du filet un filtre de nylon à mailles de 1 mm de largeur. Mais ce filtre laisse passer de nombreux Copépodes, Cladocères et autres organismes à nombreux appendices, et est de plus rapidement obstrué par du seston et des animaux gélatineux. Il a été abandonné.
- Les filets ont dû être fréquemment remplacés parce qu'ils se déchiraient après 2-3 mois d'emploi; c'est pourquoi il n'a pas toujours été possible d'assurer l'uniformité parfaite de leurs caractéristiques.
- 1.1.4. - Opérations en mer : Pêches horizontales de 20 minutes à partir d'un bateau marchant à basse vitesse. On a chaque fois effectué 3 pêches, en mouillant successivement 5, 50 et 100 m de câble, ce qui, compte tenu de l'inclinaison du câble par rapport à la verticale, correspond à des profondeurs respectivement de 3,60 m, 36 m et 72 m pour le filet.

- 1.1.5. - Mesure de la température: aux profondeurs de 5, 50 et 100 m par un thermomètre à renversement gradué à 0,1 °C., sans thermomètre correcteur, les mesures au centième de degré étant inutiles.
- 1.1.6. - Prélèvements d'eau de mer: à la bouteille Nansen accompagnant le thermomètre. A bord, l'eau est immédiatement versée dans des bouteilles de polyéthylène; une partie de ces prélèvements servira aux analyses chimiques (cf. 6.2.1.5.), un autre pour les élevages et expériences sur individus vivants; dans ce dernier but l'on choisit de l'eau provenant de 100 m de profondeur pour éviter au maximum la pollution propre aux eaux de surface.

1.2. - Améliorations ultérieures

La forte proportion d'Acanthaires abîmés ou morts dans le plancton ainsi pêché, et la difficulté de tenir en survie ceux qui résistaient à pareil traitement, ont conduit à chercher les améliorations suivantes, qui ne constituent qu'un premier pas.

- 1.2.1. - Collecteurs: En juin, octobre et décembre 1963, des séjours à la Station Zoologique de Villefranche-sur-Mer (Alpes Maritimes) ont permis des contacts fructueux avec plusieurs planctonologistes spécialisés (G. TREGOUBOFF J. et M. CACHON-ENJUMET, P. NIVAL).

Des discussions intéressantes ont également eu lieu à Naples avec T. GAMULIN (Rovinj). Il est apparu nécessaire d'employer des collecteurs à oreillettes latérales pour amortir la sédimentation du plancton au fond des filets. Les collecteurs ordinaires appartenant à ce type ne sont eux-mêmes pas entièrement satisfaisants: nos observations au microscope électronique ont été faites sur du matériel récolté avec ces appareils, et y ont démontré des dégâts parfois importants dans les organites, surtout externes, des cellules.

A partir de septembre 1963, les filets ont été pourvus d'un collecteur de CACHON (cf. CACHON, 1957), à fenêtres latérales recouvertes de nylon de marque suisse "NYTRAL" type 17-80 (soit à mailles carrées dont l'ouverture a 150 μ de côté, ceci pour essayer de capturer les jeunes stades et les kystes d'Acanthaires), et à fond amovible permettant, à bord, l'affaissement lent et sans heurts de la colonne de plancton capturée dans un seau de plexiglas; ce collecteur, provisoire, a été construit en plexiglas et fer chromé. Deux collecteurs définitifs et leurs accessoires ont été réalisés; le fer chromé y a été remplacé par du laiton, pour éviter la rouille qui grippe le mécanisme et pourrait être nocive pour le plancton. Ces collecteurs ont été provisoirement montés sur le type de filets décrit sous 1.1.3.

Ils seront éventuellement siliconés si les expériences de culture d'Acanthaires en montrent la nécessité (cf. 3.5.).

- 1.2.2. - Filets: L'on a essayé, suivant les indications recueillies à Villefranche, d'obtenir un traitement plus rationnel des filets, afin de leur assurer une durée plus longue (conservation à l'ombre sur les bateaux; conservés à terre pendus au plafond, mais non pliés). Ces exigences n'ont pas encore pu être toutes satisfaites, notamment faute de place pour la conservation des filets pendus. Un filet du type de celui préconisé par le Comité de Plancton de la C. I. E. S. M. (type JUDAY-BOGOROV modifié; cf. TREGOUBOFF, 1961) et pourvu de cercles de renforcement en laiton comme le conseille CACHON, est projeté; il sera également en "NYTRAL" 17-80 et sera employé uniquement pour les recherches qualitatives (non-écologiques); ses principaux avantages sont une plus grande longueur et une forme générale ralentissant fortement la course du plancton peu après l'entrée de celui-ci dans le filet.

1. 2. 3. Prélèvement de l'eau de mer: Les bouteilles Nansen disponibles à Naples sont en laiton (et non en plexiglas comme dans les modèles les plus récents) et ont des tubulures et des joints de caoutchouc; ces deux matériaux pourraient peut-être libérer dans l'eau des ions (Pb^{++} dans le cas du caoutchouc) nuisibles pour les Acanthaires, au moins à certaines concentrations. A l'avenir, l'on emploiera également pour les cultures et les expériences de l'eau pompée au large mais à 1 ou 2 m de profondeur seulement, à travers des tubulures et une pompe en polyéthylène; les défauts et qualités respectifs de ces 2 sortes d'eau seront méthodiquement comparés.

1. 2. 4. Transport des récoltes à la Station: Il doit être évidemment aussi rapide que possible (quoique l'influence du délai entre la pêche et la mise en culture au laboratoire n'ait pu être mise clairement en évidence dans les expériences de survie des Acanthaires; cf. 3. 5). On a établi dans ce but un service spécial par camion entre le port de Mergellina et la Station, ce qui permet d'abaisser ce délai à 45 minutes environ, chiffre qui ne semble pas pouvoir être réduit davantage.

Si la température de l'air dépasse $10^{\circ}C.$, les récipients contenant le plancton sont rafraîchis, pendant le trajet de retour du bateau, par des blocs de glace.

2 - EXAMEN ET TRI DES ACANTHAIRES VIVANTS

Ces opérations doivent être menées aussi rapidement que possible.

2. 1. - Examen préliminaire

En attendant d'être examiné, le plancton est mis dans une chambre thermostatisée à $13^{\circ}C.$ Les bocaux dont le contenu est en cours d'examen sont tenus dans la stalle de travail et simplement rafraîchis par un jet d'eau (le travail en chambre thermostatisée étant défendu par le règlement de la Station).

Dans les récoltes ramenées en bocaux de verre, l'on faisait des prises de 10 ml de plancton homogénéisé, au moyen d'une pipette à orifice élargi, et l'on versait ensuite ces prises dans des verres de Syracuse servant pour l'examen à la loupe. L'emploi des seaux de plexiglas de CACHON, à large ouverture, permet de prendre doucement le plancton homogénéisé avec des cristallisoirs faisant office de louche, ce qui évite la brutalité du procédé à la pipette.

Le plancton est examiné à la loupe binoculaire aux grossissements 50 X ou 100 X, en employant des récipients à fond plat et en utilisant de préférence la lumière transmise (l'éclairage sur fond noir permet de repérer beaucoup d'Acanthaires avec des grossissements plus faibles et par conséquent un champ de vision plus large, mais laisse inaperçues de nombreuses formes à spicules fins et endoplasme réduit ou peu compact).

2. 2. - Nettoyage des Acanthaires

Pour l'étude systématique, mais encore beaucoup plus pour les élevages et expériences sur les individus vivants, l'étude cytologique et l'analyse chimique, les animaux doivent être d'abord séparés des amas de seston ou des autres planctontes dans lesquels leurs spicules se sont empêtrés. Cette opération se fait au moyen de minces aiguilles de verre. M. P. SESSA nous à quelquefois aimablement aidés en opérant une concentration des Acanthaires

avant leur nettoyage, par élimination de nombreux autres organismes du plancton brut.

On ne nettoie et prélève que les animaux en bon état, c'est-à-dire à spicules intacts et à ectoplasme (ou au moins la couche externe de celui-ci chez les Pseudolithidae) invisible sur fond noir (à l'exception des myonèmes, particulièrement bien visibles chez les membres du sous-ordre des Phylacanthes).

2.3. - Prélèvement

Les Acanthaires, vivants ou fixés, sont toujours prélevés et transférés à la pipette, individuellement autant que possible (sauf pour les analyses chimiques) afin d'éviter qu'ils ne s'empêtrent les uns dans les autres par leurs spicules, ce qui peut les blesser sérieusement.

2.4. - Examen détaillé des individus

Pour vérifier le bon état morphologique et physiologique des Acanthaires (surtout ceux destinés à la microscopie électronique), observer leur comportement, leur reproduction ou leur enkystement, ou les déterminer "in vivo", on les place dans des chambres de Kolkwitz pleines d'eau de mer, et on les examine au microscope inversé, au grossissement 400 X ou même à l'immersion (L250 X). Le microscope ordinaire ne permettrait pas, comme le microscope inversé, d'éviter toujours l'écrasement des individus entre lame et lamelle couvre-objet lors des examens à fort grossissement.

La détermination des Acanthaires vivants est, en théorie, très difficile, parce que l'endoplasme, souvent opaque et épais, cache en ce cas la partie centrale du squelette, essentielle en systématique; seuls les liquides éclaircissants (toluène, xylène, terpinéol, liquide de Faurer appliqués après fixation, permettent d'apercevoir le centre du squelette. Cependant, la détermination des Acanthaires "in vivo" s'impose pour les cultures, l'examen de phénomènes particuliers (enkystement, reproduction), et la microscopie électronique, où les procédés de fixation ne permettent pas le passage par les liquides éclaircissants mentionnés. Une longue pratique nous permet actuellement de déterminer généralement à coup sûr le genre et même parfois l'espèce des individus encore vivants, en nous basant sur des caractères du cytoplasme, des pellicules et de la partie visible du squelette.

3 - ESSAIS DE CULTURES D'ACANTHAIRES

3.1. - Introduction

3.1.1. - Etat de la question en 1962

Le maintien en vie au laboratoire d'organismes planctoniques a toujours été difficile, pour des causes d'ailleurs mal connues. D'une manière générale, on a réussi l'élevage de nombreux planctontes protégés par une coque solide (Diatomées par exemple; chez les animaux, divers crustacés), le problème s'étant alors limité à des questions de propreté ou même de stérilité des cultures, et de nourriture adéquate; parmi les Protistes planctoniques, ou du moins vivant généralement entre deux eaux, les formes ciliées ou flagellées, donc capables de mouvements rapides et d'une mise en suspension "active", se laissent fréquemment cultiver sans trop de difficultés. (GROSS, 1937, et nombreux auteurs plus récents).

Les planctontes d'aspect "gélatineux", c'est-à-dire en fait assez grands et très aqueux, ont un mode de flottaison généralement passif, et ne peuvent donc s'échapper rapidement de lieux où ils subissent des conditions défavorables. Or l'une de ces conditions défavorables paraît être le contact avec des solides, par exemple avec la paroi des récipients. Pour aider ces organismes à se maintenir en suspension au laboratoire, il a fallu pallier l'absence des courants marins et de la turbulence de l'eau en imprimant une agitation lente à l'eau des élevages par des moyens divers. On peut ainsi garder actuellement "in vitro" des Méduses, Chétognathes, des larves diverses, tous à propulsion active relativement faible ou nulle par rapport à leur taille.

Le problème se complique encore si de tels organismes sont très denses, au point que les appareils d'agitation lente des eaux de culture sont impuissants à les maintenir loin du fond des récipients. C'est le cas pour les Protozoaires Rhizopodes pourvus d'un squelette minéral. (Foraminifères planctoniques, certains Héliozoaires, et tous les Acanthaires, Polycystines et Phéodaires). Nous n'avons pu trouver dans la littérature au sujet de ces groupes, que des méthodes permettant de les faire survivre "in vitro" quelque semaines au grand maximum, avec de fréquents renouvellements d'eau accompagnés ou non de la nourriture habituelle de ces animaux dans leur milieu naturel. Le record en ce domaine a été obtenu par HOLLANDE et ENJUMET (1953) pour certains Thalassophysidae (Polycystines), restés vivants dans des récipients de verre pendant 6 semaines, mais qui s'étaient en quelque sorte "adaptés" à ces conditions inhabituelles: la majeure partie de cette période avait été occupée par leur multiplication asexuée, et l'ectoplasme des coenobies caractérisant cette phase, s'était étendu sur le verre au point de donner à ces apocyties un aspect d'amibes benthiques.

Les Acanthaires paraissent encore beaucoup plus fragiles que les Polycystines et Phéodariés. Chez eux en effet, la dégradation de la cellule s'accompagne de la dissolution du squelette (cf. 7.1.) et celle-ci à son tour provoque l'effondrement et la désagrégation rapides de la membrane cellulaire, de la pellicule externe et des formations qui en dépendent.

Quelques-uns des points précités avaient déjà été reconnus, en 1960 et 1961, par les Drs. VON SCHENK (Bâle), MUELLER (Bâle) et LUSCHERT (Tübingen) qui, à la demande de la Direction de la Station zoologique de Naples, avaient prospecté les possibilités de cultiver des Acanthaires. L'on avait essayé de maintenir les Acanthaires en suspension en agitant la surface des eaux de culture par un jet d'air tangentiel, ou en les plaçant dans un récipient cylindrique oscillant en permanence autour de son axe horizontal; l'on avait attribué l'effrayante mortalité constatée, à des organismes pathogènes, et l'on avait appliqué aux cultures divers désinfectants et antibiotiques sans obtenir aucune amélioration. Finalement, l'on avait siliconé le matériel d'élevage, pour supprimer éventuellement une tension superficielle, trop forte entre le verre et le cytoplasme des animaux, mais sans résultats. Devant ces échecs, les chercheurs précités concluaient que la mortalité des Acanthaires en élevage devait être attribuée à une rupture de "l'équilibre biologique" de leur milieu, opinion dépourvue de précision et partagée aussi par HOLLANDE et Mme CACHON-ENJUMET (communications verbales). D'autres spécialistes du plancton ou des Protistes: Drs. PROVASOLI et LANCE (New York) et BRINCKMANN (Naples), estimaient que la culture des Rhizopodes planctoniques serait très difficile ou même impossible, et nous faisaient éventuellement part de leurs échecs en ce domaine.

3.1.2. - Première série d'essais: Le temps disponible pour les essais d'élevage a toujours été très limité. Les chercheurs qui nous avaient précédés dans cette voie à Naples n'avaient pu consacrer aux Acanthaires qu'une faible par-

tie de leur temps; il a donc paru nécessaire de vérifier d'abord quelques-uns de leurs résultats, d'août à octobre 1962.

3.1. 2.1. - Conditions imposées:

- a) Densité des ensemencements: Les 300 individus sur lesquels ont porté ces premiers essais ont été choisis parmi les animaux en excellent état. Ils ont été placés (sans séparer ceux d'espèces différentes) dans des verres de Syracuse de 10 ml contenant de l'eau de mer fraîche, et ce à raison de 20 à 30 individus par verre.
- b) Renouvellement de l'eau: L'eau employée était toujours prélevée le jour même à 100 m de profondeur, avec une bouteille Nansen, et maintenue, à la Station, à la même température que les élevages auxquels elle était destinée. L'on a renouvelé l'eau des élevages une fois par jour, en transférant chaque fois les Acanthaires encore vivants dans des verres propres remplis d'eau fraîche. L'eau de mer, au début de ces essais, était toujours filtrée sur plusieurs épaisseurs de papier-filtre avant l'emploi, pour éliminer le gros des micro et macro-organismes qu'elle pouvait contenir. Dès qu'il est devenu évident que les Acanthaires se nourrissent principalement de bactéries marines, l'eau n'a plus été filtrée sur papier mais sur soie à mailles de 150μ de largeur, afin de retenir uniquement le macroplancton et de laisser passer le microplancton dont la présence était supposée favorable au maintien en vie des Acanthaires.
- c) Température: Les élevages ont été faits dans des chambres thermostatées à 23°, 18° et 13 °C. Les couches d'eau où étaient pêchés les Acanthaires avaient à la même époque une température variant de 25° à 19 °C. Les températures au laboratoire ont été choisies généralement inférieures à celles du milieu naturel pour se conformer aux conseils des spécialistes en la matière, et ce choix a été justifié par les résultats obtenus (cf. 3. 1. 2. 2.).
- d) Agitation de l'eau: L'on a repris la solution, plus simple que les autres, du souffle d'air tangentiel à la surface de l'eau et orienté de plus de manière à imprimer une rotation dans le plan horizontal à la masse d'eau contenue dans chaque verre; ce procédé provoque une évaporation assez rapide qui entraîne une augmentation de la salinité dans les cultures. On a ensuite essayé d'agiter l'eau en plaçant les verres sur un support vibrant. L'examen à la loupe binoculaire montre que ni l'un ni l'autre de ces procédés n'est suffisamment puissant pour maintenir les Acanthaires. Il est de même des agitateurs mécaniques (baguettes de verre) introduits dans les récipients, ainsi que des élevages dans des verres placés sur les "balançoires" utilisées pour les Méduses. On ne peut décoller les Acanthaires du fond que par une agitation violente qui serait susceptible de les abîmer rapidement. Tous les expédients cités favorisent aussi une bonne oxygénation du milieu.
- e) Illumination: Seulement la lumière du jour.
- f) Nutrition: Outre les Bactéries et autres microorganismes présents dans l'eau des élevages (surtout lorsque celle-ci n'a plus été filtrée que sur nylon), les Acanthaires ont eu à leur disposition des doses de Dunaliella salina, Chlorophycée monocellulaire flagellée qui a été cultivée à partir d'une souche du Dr. K. BETH, de la Station, et selon la méthode employée par ce spécialiste.

Formule du milieu de culture:	Eau de mer filtrée et tyndallisée	2000 ml
	Extrait d'humus, bouilli	100 ml
	NaNO ₃	200 mg
	NaH ₂ PO ₄	40 mg

Ce milieu est pratiquement stérile et la multiplication rapide des Duna -

liella y empêche une croissance importante de Bactéries compétitives. Les fioles de culture ont été maintenues à 18 °C. (température optimale pour la croissance de l'algue) et à la lumière du jour. Les repiquages se font tous les 15 jours. Pour nourrir les Acanthaires, on lave d'abord les Dunaliella à l'eau de mer filtrée sur papier, pour éliminer le gros des acides humiques qui pourraient nuire peut-être aux animaux et en outre à la flore bactérienne dont ils se nourrissent également. Pour ce faire, quelques ml de culture d'algues sont centrifugés à 1000 g pendant 5 minutes; le surnageant est éliminé et le culot de Dunaliella remis en suspension dans de l'eau de mer; on recommence l'opération plusieurs fois. Les Dunaliella supportent très bien ce traitement. On les additionne ensuite par petites quantités aux cultures d'Acanthaires dont l'eau vient d'être renouvelée.

Les individus en bon état ont régulièrement absorbé ces algues, de façon à en présenter toujours quelques-unes dans leur ectoplasme.

3. 1. 2. 2. - Résultats: La mortalité des Acanthaires a été catastrophique dans toutes les formules essayées, au point qu'il a paru inutile de comparer les différentes courbes de décroissance des populations, ce qui aurait d'ailleurs donné des conclusions sans grande valeur à cause du petit nombre d'individus mis en culture. Plus de la moitié des protozoaires mourait au cours du premier jour d'élevage. Un seul a survécu 12 jours, 4 autres 8 jours. . .

L'agitation de l'eau semblait être un facteur défavorable au maintien de vie.

Le séjour à 23 °C. s'est nettement révélé beaucoup plus meurtrier que celui à 18° ou 13 °C.

De plus, nous n'avions pas encore à cette époque de microscope inversé: ont été considérés "en bon état" sans que la vérification à fort grossissement ait toujours pu être faite, les Acanthaires à ectoplasme invisible sur fond noir, (sauf éventuellement les myonèmes, ainsi que la couche ectoplasmique interne des Pseudolithidae) et à squelette intact.

Le cytoplasme des Acanthaires mourants s'opacifie, le squelette se dissout lentement; ils sont alors parfois entourés par des Flagellés ou de petits Ciliés ayant pu s'introduire accidentellement dans l'eau des élevages (surtout lorsque celle-ci n'est filtrée que sur nylon). Selon les Drs. VON SCHENK et MUELLER, ils sont attaqués, à un stade ultérieur de décomposition, par des champignons, surtout si la culture contenait des antibiotiques.

Notons que les Dunaliella se concentrent souvent autour des Acanthaires par les animaux, ou sont-elles attirées par un milieu plus acide (suite à l'excrétion des Acanthaires) qui leur est plus favorable comme à beaucoup d'autres Volvocales? (cf. PAVILLARD, 1952, p. 198).

3. 2. - Seconde série d'essais

3. 2. 1. - Hypothèses de travail: Après l'hiver 1962/63, pendant lequel les possibilités de récolter du plancton en bon état ont été rares, on a repris les essais de manière plus rigoureuse. La mortalité des Acanthaires étant un fait apparemment inévitable, il a paru nécessaire d'en analyser méthodiquement les causes, en soumettant un grand nombre d'animaux à des conditions bien définies et peu variées afin de se rapprocher lentement des conditions optimales de survie.

Deux hypothèses de travail ont été prises en considération:

- a) les recherches bibliographiques et surtout l'examen quotidien des Acanthaires font penser que; s'ils sont indemmes de toute blessure, ils peuvent vivre en contact avec un support de verre à condition que celui-ci n'ait

absorbé aucune substance novice.

- b) Le délai s'écoulant entre la pêche et l'isolement en eau propre au laboratoire atteignait à cette époque plusieurs heures, que les Acanthaires passaient au fond de bocaux où de nombreux autres planctons concentrés pouvaient les blesser par leurs mouvements ou les intoxiquer par leurs excréments ou même déjà par un début de putréfaction. Ce délai a été supposé d'autant plus léthal qu'il était plus long.

3. 2. 2. - Conditions de travail

3. 2. 2. 1. - Pêche des individus: selon la vieille méthode décrite sous 1.1. pp. 5 Les expériences ont porté sur 930 Acanthaires pêchés du 29 mars au 19 avril, et triés un par un parmi les individus en bon état. Pour chaque ensemencement, il a été tenu compte, sur la foi des renseignements fournis par les marins de la Station, du délai écoulé entre l'heure de la pêche et celle de la mise en culture (de 2 à 8 heures en général). Il ne nous a pas été possible de contrôler cette donnée en accompagnant les pêcheurs, car la récolte du plancton s'effectue à la fin des expéditions matinales dévolues à de nombreux autres travaux en mer et pouvant de ce fait durer 5 ou 6 heures; la présence sur les bateaux pendant tout ce temps constituerait pour les chercheurs du groupe une perte de temps impossible à récupérer.

3. 2. 2. 2. - Ensemencements: On introduit de 5 à 35 individus (une vingtaine en moyenne) dans 10 ml d'eau de mer (cf. ci-dessous, 3. 2. 2. 3.), contenu dans des verres de Syracuse pour les cultures immobiles. Parfois, des individus intéressants ont été isolés chacun dans un récipient séparé, et ce au début de leur mise en culture ou dans les jours qui suivaient; on a pu ainsi observer plus soigneusement leur évolution en élevage et les fixer quand cela a paru nécessaire.

3. 2. 2. 3. - Origine et renouvellement de l'eau de mer: Pour la méthode de prélèvement (cf. 3.1.2.1. b) p. 10. L'eau a été filtrée sur gaze de nylon à mailles de 150 μ d'ouverture. On a estimé que le passage dans les cultures de la population nanoplanctonique de l'eau de mer normale pouvait fournir aux Acanthaires non seulement une certaine part de la nourriture dont ils auraient besoin, mais aussi un supplément d'oxygène grâce à l'activité photosynthétique de nombreux nanoplanctons.

On renouvelle l'eau une fois ou 3 fois par jour (cette dernière alternative est conseillée par HOLLANDE et ENJUMET, 1953, pour leurs Polycystines), et autant que possible aux mêmes heures chaque jour. L'eau employée pour ces renouvellements est toujours prélevée le jour même, et tenue à la même température que les élevages.

3. 2. 2. 4. - Température: En principe, la chambre thermostatée a été réglée pour une température de 13 à 15 °C; celle-ci a été contrôlée par enregistrement, et la variation de 13 à 15 °C. n'a pas pu être évitée. Il y a eu de plus trois brefs réchauffements accidentels de 1, 5 et 3 jours respectivement jusqu'à 17 - 18 °C. Les changements d'eau, comptages et renouvellements de la nourriture ont dû être opérés à la température du laboratoire, toujours bien supérieure à 13 °C., mais avec de l'eau fraîche conservée à 13 °C. et des Dunalielle cultivées à 20 °C.

La température de l'eau d'Ammontatura a varié, pendant les essais, de 13 à 14 °C. entre 0 et 100 m de profondeur.

3. 2. 2. 5. - Eclairage: Un éclairage permanent (jour et nuit) a été assuré par des tubes fluorescents ordinaires (avec, le jour, la lumière solaire en plus),

pour accentuer si possible la production d'oxygène par le nanoplancton végétal présent dans l'eau, les Dunaliella ajoutées et les zoochlorelles des Acanthaires.

3. 2. 2. 6. - Nourriture: Une partie des cultures ont été nourries avec des Dunaliella salina. Lors des premiers essais (cf. 3.1.2.1. p. 10), avant d'introduire les suspensions de Dunaliella dans les élevages d'Acanthaires, on a cru devoir les laver pour en éliminer les substances humiques. Pour éviter cette perte de temps, le milieu de culture pour Dunaliella du Dr. BETH a été remplacé par le milieu ASP de PROVASOLI, Mc LAUGHLIN et DROOP (1957) modifié par Mc LACHLAN et YENTSCH (1959) pour la culture de Dunaliella euchlora: c'est une eau de mer artificielle tamponnée à l'éthylène-diamine-tétracétate de Na (= Na₂EDTA); l'on a espéré que cette dernière substance serait inoffensive, surtout à faibles concentrations, pour les Acanthaires.

Composition de ce milieu:

NaCl	410 mM	K ₂ HPO ₄	100 M
M _g SO ₄ .7H ₂ O :	24 mM	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	100 M
M _g Cl ₂ .6H ₂ O	22 mM	FeCl ₃ .6H ₂ O	1,5 M
CaCl ₂ .2H ₂ O	10 mM	H ₃ BO ₃	185,0 M
KNO ₃	1 mM	MnCl ₂ .4H ₂ O	7,0 M
ZnCl ₂	0,8 M	Na ₂ EDTA	30,0 M
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,02 M	H ₂ O distillée jusqu'à 1 litre.	
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0002 M		

Il n'est pas nécessaire, selon Mc LACHLAN et YENTSCH, d'éviter les bactéries pour avoir une bonne croissance des algues dans ce milieu.

Les Dunaliella salina, prélevées par très petites quantités à partir du Dr. BETH, ont été cultivées à 20 °C. sous lumière permanente fluorescente. Il faut noter que la température optimale de croissance de cette algue est de 18 °C. dans le milieu d'origine à l'extrait humique. On repique les cultures dans de l'ASP frais tous les 15 jours. Les Acanthaires nourris ont reçu des Dunaliella à chaque renouvellement d'eau, à raison de 0,5 ml environ de suspension dense d'algues versé dans les 10 ml d'eau fraîchement renouvelée de chaque culture d'Acanthaires.

3. 2. 2. 7. - Nombre d'Acanthaires traités suivant les diverses conditions:

	Nourris	Pas nourris
Renouvellement d'eau 1 fois par 24 heures	446	383
Renouvellement d'eau 3 fois par 24 heures	56	45

3. 2. 3. - Résultats:

3. 2. 3. 1; - Effet du délai entre le moment de la pêche et celui de la mise en culture: Nous n'avons songé à examiner ce facteur qu'après la fin de ces essais.

Ceux-ci ont porté sur des Acanthaires tous jugés "en bon état", et nous pouvons simplement affirmer que la proportion de ces individus par rapport à l'ensemble des Acanthaires, diminue au cours de ce délai, sans que nous puissions fournir des chiffres à ce propos. Nos statistiques, quelle que soit la manière dont on les examine, montrent que la longueur de la survie des Acanthaires "en bon état" ne dépend pas, ou du moins pas clairement, de ce délai. Ceci pourrait signifier que les dégradations physiologiques de nature à entraîner la mort des Acanthaires augmenteraient parallèlement aux dégradations morphologiques (jusqu'à ce que celles-ci deviennent visibles et nous fassent rejeter les individus comme "en mauvais état") et non pas plus vite, car en ce cas la survie des Acanthaires "en bon état" serait une fonction inverse de ce délai.

3. 2. 3. 2. - Effet de la température: Les quelques sautes de température mentionnées en 3. 2. 2. 4. , p. 12 , ont eu des suites généralement plus néfastes que la conservation constante à 13 °C. , mais ont affecté trop peu d'individus pour qu'on puisse en tirer des conclusions valables.
3. 2. 3. 3. - Effet de la densité des ensemencements: Ce facteur n'a eu apparemment aucun lien avec la survie.
3. 2. 3. 4. - Effet de la fréquence des renouvellements d'eau: Si l'on considère les résultats totaux correspondants à chacun des 4 groupes d'essais mentionnés en 3. 2. 2. 7. , p. 13, le changement d'eau trois fois par 24 heures est nettement plus néfaste que celui opéré une fois par 24 heures, que les Acanthaires soient mis ou non en présence des Dunaliella salina. Mais tous les essais où l'on a renouvelé l'eau 3 fois par 24 heures, ont été faits seulement pendant la première semaine de cette période d'expérimentation, soit du 29 mars au 3 avril, et si on compare leur résultat avec celui des cultures à 1 seul changement d'eau par 24 heures, faites du 29 mars au 4 avril, c'est au contraire le renouvellement une seule fois par jour qui paraît le plus défavorable. On verra ci-dessous que, dans les mêmes conditions de culture, la survie moyenne peut varier de semaine en semaine. Dès lors, on ne peut tirer de conclusion définitive à propos de ces renouvellements d'eau. (fig. 1).
3. 2. 3. 5. - Effet de la présence des Dunaliella salina: Il semble que cette présence augmente légèrement la mortalité des Acanthaires; cette différence n'est peut-être pas très significative, mais on la retrouvera en général dans les 3e et 4e séries d'essais (cf. 3. 3. 3. 4. et 3. 4. 3. 4.), et plus prononcée même dans ce dernier cas. (Fig. 2).
3. 2. 3. 6. - Effet de la date de capture et de mise en culture: La survie moyenne hebdomadaire a régulièrement augmenté de la première à la quatrième semaine des essais, qu'on ait ajouté ou non des Dunaliella. Ce curieux phénomène se retrouvera en général dans les séries expérimentales ultérieures (cf. 3. 3. 3. 5. et 3. 4. 3. 5.). L'interprétation en est difficile; on ne voit pas entre autres, quelles conditions physico-chimiques ont pu changer de manière continue aux endroits d'origine des Acanthaires, pendant la période de ces essais (si ce n'est peut-être une augmentation de la salinité aux profondeurs de 50 et 100 m, et l'augmentation de la température de l'air; mais ce dernier facteur aurait dû être plutôt défavorable, car il peut nuire aux Acanthaires durant leur transport sur le pont du bateau). (Fig. 3).
3. 2. 3. 7. - Record de survie: Une Acanthometra fusca pêchée le 16 avril a survécu 19 jours et demi en gardant un aspect normal. Après quoi l'individu a commencé à s'enkyster. N'ayant jamais vu d'enkystement auparavant, nous avons cru que l'animal, qui avait perdu son squelette, mourait, et il a été jeté.

Comme le montrent les graphiques, les autres Acanthaires mis en culture ont survécu beaucoup moins et 40 à 60 % d'entre eux meurent endéans les premières 24 heures d'élevage.

3.3. - Troisième série d'essais: Ils ont porté sur 1619 Acanthaires "en bon état" pêchés et mis en cultures du 13 mai au 27 juin 1963.

3.3.1. - Les mêmes hypothèses de travail que pour la 2e série (cf. 3.2.1, p. 11) ont été prises en considération, vu l'absence de données nettes à ce propos parmi les résultats de cette 2e série.

3.3.2. - Conditions de travail:

3.3.2.1. - Pêche, données connexes, et ensemencements: On a suivi les mêmes méthodes que pour la seconde série (cf. 3.2.2.1; et 3.2.2.2, p. 12). Les ensemencements, cependant, bien qu'étant de 20 individus par récipient en moyenne, ont oscillé entre des chiffres extrêmes de 5 à 45 individus (par 10 ml d'eau de mer). Les cultures soumises au mouvement, ont été faites, non dans des verres de Syracuse, mais dans des pèse-filtres sans couvercle, contenant eux aussi 10 ml d'eau.

3.3.2.2. - Eau des élevages: Elle est prélevée et filtrée comme précédemment (cf. 3.2.2.3, p. 12). On l'a renouvelée une fois par jour seulement, car la première impression donnée par les résultats de la 2e série semblait conseiller cette solution plutôt que le renouvellement 3 fois par 24 heures. (cf. 3.2.3.4, p. 14).

3.3.2.3. - Température: Maintenu constamment entre 13 °C. et 15 °C. (cf. 3.2.2.4, p. 12). Pendant la période des essais, la température des eaux superficielles d'Ammontatura est passée de 14 °C. à 23 °C., alors qu'à 50 et 100 m de profondeur, elle est restée aux alentours de 14 °C. L'on n'a malheureusement pas noté la profondeur d'où provenaient les Acanthaires cultivés, et on ignore donc quels sont ceux d'entre eux qui ont subi un choc thermique au moment de leur mise en culture. Pour les changements d'eau et de nourriture, même remarque qu'à la p. 12.

3.3.2.4. - Eclairage: Pour la plupart des cultures, il a été assuré en permanence par des tubes fluorescents (avec, de jour, la lumière solaire en plus). Cependant, quelques élevages ont été maintenus en obscurité permanente (sauf lors des comptages, changements d'eau et ajoutés de Dunaliella.)

3.3.2.5. - Mouvement: Les cultures soumises au mouvement ont été effectuées dans des pèse-filtres placés sur une "balançoire" du type de celles employées pour l'élevage des Méduses. Ces récipients sont ainsi soumis à des oscillations continues de 6 secondes de période et de 10° de demi-amplitude de part et d'autre de l'horizontale, dans le but d'éviter l'adhérence du Cytoplasme des Acanthaires au fond des récipients, et d'augmenter si possible l'aération de l'eau. Rappelons que cette méthode ne parvient pas à maintenir les Acanthaires, tous trop lourds, en suspension.

3.3.2.6. - Nourriture: Comme pour la 2e série (cf. p.13).

3.3.2.7. - Nombre d'Acanthaires traités suivant les diverses conditions:

	Avec <i>Dunaliella</i>	Sans <i>Dunaliella</i>
Immobiles, à l'obscurité	71	20
Immobiles, éclairés en permanence	482	376
En mouvement, éclairés en permanence	346	324

3. 3. 3. - Résultats:

3. 3. 3. 1. - Effet du délai entre le moment de la pêche et la mise en culture; effet de la densité des ensemencements: Ces facteurs paraissent toujours sans influence sur la survie des Acanthaires (cf. 3. 2. 3. 1. et 3. 2. 3. 3. , pp. 13 et 14).

3. 3. 3. 2. - Effet de la lumière: Pour les cultures sans *Dunaliella*, celles qui sont éclairées survivent plus longtemps que celles maintenues à l'obscurité; mais ces dernières ont été lancées pendant la première semaine des essais, et les élevages en pleine lumière pendant les semaines suivantes; or la survie moyenne hebdomadaire a progressé à peu près régulièrement de semaine en semaine; et la survie des Acanthaires maintenus à l'obscurité et mis en culture entre le 13 et le 19 mai, est à peu près identique à celle des individus cultivés en pleine lumière du 20 au 26 mai. L'on ne peut donc tirer ici de conclusions nettes. (fig. 4)

Par contre, si l'on ajoute des *Dunaliella* aux cultures, l'obscurité (imposée aux cultures lancées du 13 au 19 mai) apparaît un facteur néfaste aussi bien par rapport à l'ensemble des cultures illuminées, que par rapport à celles faites du 20 au 26 mai. L'on pouvait s'attendre à ce résultat: les *Dunaliella* éclairées consomment le CO_2 produit par les Acanthaires et leur fournissent de l'oxygène, ce qui est certainement favorable aux Protozoaires; au contraire, dans l'obscurité, elles disputent l'oxygène aux Acanthaires et produisent du CO_2 qui s'ajoutera à celui provenant des Protozoaires pour acidifier d'autant plus le milieu (fig. 4).

3. 3. 3. 3. - Effet du mouvement: Il est très nettement néfaste par rapport à l'immobilité. La présence des *Dunaliella* n'atténue que faiblement ce désavantage. (fig. 5).

3. 3. 3. 4. - Effet de la présence des *Dunaliella salina*: Ce facteur semble défavorable pour les cultures immobiles (légèrement pour celles qui sont éclairées; et nettement pour celles laissées dans l'obscurité, ce qui a été expliqué au point 3. 3. 3. 2. , p. 16), et favorable au contraire pour les cultures éclairées soumises au balancement. (fig. 6).

3. 3. 3. 5. - Effet de la date de capture et de mise en culture: Ici aussi, il semble que dans plusieurs cas la survie moyenne hebdomadaire se soit allongée plus ou moins nettement du début à la fin de la période des essais (surtout pour les cultures immobiles sans *Dunaliella* et les cultures balancées avec *Dunaliella*). Rappelons que pendant cette période, la température des eaux à 5 m de profondeur sur les lieux de pêche, est passée de 15 °C. à 23 °C. , mais qu'à 50

et 100 m de profondeur elle est restée constamment comprise entre 14 °C. et 15 °C. Malheureusement, l'on n'a pas noté la profondeur d'origine des Acanthaires mis en culture. (fig. 7).

Notons de plus que, pour les cultures immobiles éclairées pourvues ou non de *Dunaliella*, les résultats sont meilleurs qu'avec les cultures faites dans les mêmes conditions du 29 mars au 19 avril (lorsque toutes les eaux de 5 à 100 m de profondeur, avaient une température de 13 °C. à 14 °C.).

3. 3. 3. 6. - Survie maximum: 9 jours, atteints par 2 individus conservés en cultures immobiles éclairées, en présence de *Dunaliella*.

3. 4. - Quatrième série d'essais: Ils ont porté sur 460 Acanthaires, pêchés et mis en culture du 10 au 23 septembre 1963.

3. 4. 1. - Hypothèses de travail: Outre les deux hypothèses déjà formulées en 3. 2. 1. p. 11, nous avons estimé que notre méthode de pêche traditionnelle (cf. l. l. p. 5, endommageait déjà irrémédiablement les Acanthaires, même si l'on ne tenait pas compte du délai défavorable s'écoulant ensuite jusqu'à leur mise en culture. Aussi, l'on a adopté le collecteur CACHON dans l'espoir d'obtenir de bien meilleurs résultats.

3. 4. 2. - Conditions de travail:

3. 4. 2. 1. - Pêche des individus: Avec le collecteur et le seau accessoire de CACHON (cf. 1. 2. 1., p. 6), et avec des filets de mêmes dimensions que ceux précédemment employés, mais à mailles dont l'ouverture a 200 μ de côté (modèle provisoire employé en attendant la réalisation de celui décrit en l. l. 2., p. 5) Contrairement à ce qui se faisait auparavant, les filets ne sont pas secoués au sortir de l'eau pour récupérer les animaux empêtrés dans leurs mailles, car ceux-ci peuvent déjà être considérés comme endommagés; de toutes façons, les dimensions des mailles permettent déjà un filtrage plus lent et moins brutal.

Les individus sont choisis parmi ceux "en bon état", et le délai entre la pêche et la mise en culture a été noté (cf. 3. 2. 2. 1., p. 12).

3. 4. 2. 2. - Ensemencements: On a introduit de 7 à 46 individus (une vingtaine en moyenne) pour 10 ml d'eau, contenus dans des verres de Syracuse. Toutes les cultures ont été immobiles.

3. 4. 2. 3. - Origine et renouvellement de l'eau de mer: L'eau a été prélevée et filtrée comme indiqué en 3. 2. 2. 3. (p. 12). Elle a été renouvelée une fois par 24 heures.

3. 4. 2. 4. - Température: Chambre thermostatisée maintenue soit à 13 °C. soit à 17 °C., environ, suivant les cultures.

3. 4. 2. 5. - Eclairage permanent par lumière fluorescente, avec la lumière solaire en plus durant le jour.

3. 4. 2. 6. - Nourriture: Les *Dunaliella salina* ont été cultivées, et ajoutées à une partie des élevages d'Acanthaires, suivant les modalités exposées en 3. 2. 2. 7. p. 13.

3. 4. 2. 7. - Nombre d'Acanthaires soumis aux diverses conditions:

	Avec Dunaliella	Sans Dunaliella
Cultures à 13 °C.	155	137
Cultures à 17 °C.	159	9

3. 4. 3. - Résultats:

3. 4. 3. 1. - Effets du délai entre le moment de la pêche et la mise en culture, et de la densité des ensemencements: Ces facteurs paraissent toujours sans influence sur la survie des Acanthaires (cf. 3. 2. 3. 1. et 3. 2. 3. 3., pp. 13 et 14).

3. 4. 3. 2. - La récolte par le système CACHON: n'améliore absolument rien dans les conditions où nous avons travaillé. La proportion d'Acanthaires "en bon état" est apparue manifestement beaucoup plus élevée qu'avec l'ancien procédé, et cet état lui-même est bien meilleur (axopodes très souvent visibles, ce qui n'était jamais le cas auparavant).

La mortalité des Acanthaires dans nos essais résulterait donc, en grande partie au moins, de facteurs qui se manifestent dans les récipients de culture. Cette conclusion ne porte que sur les Acanthaires cultivés à 13 °C., puisque nous n'avons pas cultivé ces animaux à 17 °C. dans les précédentes séries d'essais. (fig. 8).

3. 4. 3. 3. - Effet de la température: La survie moyenne des Acanthaires maintenus à 17 °C., a été beaucoup plus réduite que pour ceux élevés à 13 °C., et à toujours été inférieure à 2 jours. (fig. 9).

3. 4. 3. 4. - Effet de la présence des Dunalielles: Elle est manifestement néfaste pour les Acanthaires cultivés à 13 °C. Ceux placés à 17 °C. ont été peu nombreux, et sont morts trop vite, pour qu'on puisse se prononcer à leur sujet. (fig. 10).

3. 4. 3. 5. - Effet de la date de pêche et de la mise en culture: Parmi les Acanthaires maintenus à 13 °C., ceux pêchés du 10 au 16 septembre ont survécu moins longtemps que ceux pêchés du 17 au 23 septembre, qu'on leur ait ou non ajouté des Dunaliella. (fig. 11). Les mesures physico-chimiques relatives à la zone de pêche en septembre 1963, n'ont pas encore été complètement élaborées et nous ne pouvons donc déjà tenter de rattacher ces variations de survie à des changements dans le milieu d'origine des individus concernés.

3. 4. 3. 6. - Survie maximum: 7 jours, pour 1 individu tenu à 13 °C., sans Dunaliella. Notons qu'une Polycystine ("Radiolaire" sensu stricto) Sphaerofide, conservée dans les mêmes conditions, a vécu 4 semaines, ce qui rejoint les résultats obtenus sur ces derniers Protozoaires par HOLLANDE et ENJUMET (1953, 1960).

3. 4. 3. 7. - Recherche des Bactéries sur les cadavres et dans les récipients qui les contenaient: sur 37 Acanthaires mis en culture dans un récipient, le 13 septembre, à 17 °C., on a trouvé le lendemain 28 cadavres. Ceux-ci ont été appliqués sur des lames, en frottis; ces lames ont été ensuite fixées à l'alcool méthylique (5 minutes) puis colorées au Giemsa (20 minutes). Le fond du récipient où ces cadavres ont été prélevés, a été fixé et coloré de même. Ce fond et les lames, séchés après coloration, ont été examinés au microscope. L'on n'a pu trouver de traces indiscutables de Bactéries ou d'autres microorganismes, excepté trois bacilles dans l'ectoplasme périphérique

d'un cadavre.

Notons que l'un des Acanthaires ainsi examinés possédait outre un reste de squelette normal, une belle enveloppe kystique, très mince et transparente, faite de nombreuses paillettes fusiformes; cette enveloppe a pu être repérée facilement dans ce cas, parce qu'elle était disloquée et que l'individu était monté dans un milieu éclaircissant.

3. 5. - Synthèse des résultats et perspectives.

3. 5. 1. - Validité des résultats: L'idée de faire des examens statistiques des résultats notés ne s'imposa qu'après l'échec des tentatives de septembre 1963 pour maintenir les Acanthaires en survie. C'est pourquoi les essais décrits plus haut n'ont pas été menés dans des conditions réellement expérimentales et rigoureuses.

Le nombre d'Acanthaires soumis aux divers essais était trop faible pour permettre d'obtenir des statistiques vraiment valables. L'heure de pêche n'a pas été notée avec précision. Les comptages et renouvellements d'eau n'ont pas toujours été effectués à des intervalles de temps exactement identiques (8 ou 24 heures suivant les cas). Des essais dont nous comparons les résultats n'ont pas souvent été effectués simultanément, avec des Acanthaires provenant de la même prise, et les variations plus ou moins incontrôlables intervenues au cours du temps dans les facteurs physico-chimiques de l'eau de mer, dans l'environnement biologique (nature et composition chimique des proies, substances exocrines dissoutes dans l'eau de mer) et dans le cycle biologique des Acanthaires eux-mêmes, peuvent donc fausser l'interprétation des résultats. De plus, les populations mises en culture n'étaient pas monospécifiques, mais constituées d'un mélange de plusieurs espèces, selon des proportions qui pouvaient être très variables d'un jour à l'autre. L'eau des élevages était prélevée en mer et ses propriétés pouvaient donc varier. La température des chambres thermostatiques peut être sujette à variations (mais c'est là un facteur indépendant de notre volonté). L'éclairage artificiel, invariable, était augmenté par l'éclairage du jour, variable, car la fenêtre de ces chambres n'était pas occultée. Les quantités de Dunaliella salina ajoutées n'ont pas été mesurées.

Comme on le voit, il s'agit là de défauts qu'il sera généralement facile d'éviter dans l'avenir. Les résultats obtenus jusqu'à présent n'ont donc qu'une valeur orientative.

3. 5. 2. - Effet des moyens de récolte : Le collecteur CACHON endommage beaucoup moins les Acanthaires pêchés, que l'emploi d'un simple bocal en guise de collecteur. On peut supposer que la proportion des Acanthaires en bon état, par rapport au total des Acanthaires, augmente par l'emploi du procédé CACHON. Mais la survie des animaux dans les cultures ne s'en trouve pas améliorée. Les facteurs défavorables aux Acanthaires se manifestent donc, au moins en grande partie, après la récolte et le transport, et dans les récipients de culture.

3. 5. 3. - Effet du délai entre la pêche et la mise en culture: Ce délai abaisse certainement la proportion des Acanthaires "en bon état", mais la survie de ces derniers ne dépend pas clairement dudit délai. On peut supposer que les dégradations physiologiques de nature à entraîner la mort des Acanthaires, augmenteraient au même rythme que les dégradations morphologiques, et non plus vite, car en ce cas, plus le délai serait long, moins les Acanthaires "en bon état" survivraient.

3. 5. 4. - Effet de la date de pêche et de mise en culture: Pour les essais répétés pendant plusieurs semaines, il semble souvent s'être produit un allongement de la survie moyenne par rapport aux semaines successives de mise en culture; donc les Acanthaires placés en élevages la dernière semaine d'une série d'essais, vivent plus longtemps en moyenne que ceux mis en culture la première semaine de ces essais. On est tenté, faute de mieux, de rechercher une explication de ce fait dans des variations continues de la température ou d'autres facteurs physico-chimiques des eaux où ces Acanthaires sont pêchés. Mais, faute d'avoir noté les couches d'où provenaient exactement les animaux (5, 50 ou 100 m de profondeur), aucune conclusion ne peut être avancée en ce sens. De plus, c'est ici que peut intervenir de manière particulièrement importante, un facteur présent dans tous nos essais: l'absence de critères précis pour déterminer le "bon état" d'un Acanthaire; les critères subjectifs employés peuvent varier de manière continue au cours de l'avancement des essais, et diffèrent en outre pour chaque expérimentateur (les mises en culture et comptages ont été effectués par deux personnes alternativement). Les essais non effectués simultanément et par la même personne, ne seront plus comparés entre eux à l'avenir.
3. 5. 5. - Effet de la densité des ensemencements: Dans les limites adoptées pour ces essais (de 5 à 46 individus dans 10 ml d'eau), ce facteur ne semble pas avoir eu d'effet sur la survie.
3. 5. 6. - Effet de la fréquence des changements d'eau: Le changement opéré 3 fois par 24 heures serait peut-être plus néfaste que celui opéré 1 fois par 24 heures. Mais ce résultat n'est pas du tout certain (pour les motifs indiqués en 3. 2. 3.4., p. 14). S'il se confirmait, on pourrait l'interpréter comme dû aux dégâts provoqués par la manipulation des Acanthaires dans les pipettes lors des changements d'eau; ou à la modification brusque des propriétés de l'eau des cultures lors de ces renouvellements, mais ces propriétés, notamment la salinité, ne varient que faiblement d'un jour à l'autre, ce qui rend cette seconde explication beaucoup moins probable que la première.
3. 5. 7. - Effet du mouvement: Celui qui a été imposé à certaines cultures, a été nettement néfaste. L'oscillation des Acanthaires reposant sur un support (il est très peu probable que ce mouvement réussisse à les maintenir en suspension) provoque peut-être des lésions à la périphérie de leur corps? La présence des Dunaliella salina a paru atténuer légèrement cet effet défavorable on ne peut trouver d'interprétation de ce fait, mais cette différence n'est peut-être pas très significative?
3. 5. 8. - Effet de la température: Il n'a pu être nettement démontré qu'en septembre: les Acanthaires maintenus à 17 °C. sont morts beaucoup plus vite que ceux conservés à 13 °C. Mais peut-être ce genre de résultats dépendrait-il de l'époque, de la température des eaux d'où venaient les animaux, etc. ? On ne peut savoir si une température de 13 °C. convient vraiment mieux aux individus que 17 °C. , où si simplement cette température plus froide ralentit les processus biochimiques provoquant la mort de l'animal.
3. 5. 9. - Effet de la lumière: D'un point de vue théorique, la lumière, permettant aux Zoochlorelles symbiotiques de consommer le CO₂ du cytoplasme de l'Acanthaire, et d'y libérer de l'oxygène, devrait être plus favorable à la survie que l'obscurité. En pratique, pour les cultures sans Dunalielles, ceci n'a pu être nettement vérifié, faute de simultanéité dans la mise en route des 2 groupes d'essais (cf. 3.3.3.2., p. 16). Il est évident que l'obscurité doit être encore plus désavantageuse si on introduit dans les cultures des organismes dont la respiration concurrence celle des Acanthaires, dimi-

nuant la quantité d'oxygène disponible pour ces derniers, et produisant un supplément de CO_2 , ce qui accentue l'acidification du milieu de culture; tel est le cas des Dunaliella qui, dans l'obscurité respirent mais cessent leur photosynthèse. Et ce cas, lui, semble bien s'être vérifié en pratique (cf. 3.3.3.2., p. 16); mais rappelons que, de toutes façons, l'ajoute des Dunalielles paraît un facteur défavorable; leur respiration ne serait donc responsable que partiellement (ou pas du tout peut-être) de la chute de survie évoquée ici.

3.5.10. - Effet de la présence des Dunalielles: En général, elle paraît plus ou moins néfaste (à l'exception des cultures éclairées et soumises au balancement, cf. 3.3.3.4., p.16). En théorie, on pourrait pourtant penser que les Dunalielles, qui sont absorbées, on a pu le vérifier, par les Acanthaires "en bon état", fournissent en outre de l'oxygène et captent du CO_2 dans les cultures éclairées, ce qui pourrait être favorable aux Protozoaires. Mais peut-être les algues excrètent-elles ou sécrètent-elles des substances toxiques pour les Acanthaires?

De plus, en les introduisant, l'on introduit aussi quelques gouttes de leur milieu de culture, lequel contient des ions en proportions peut-être nuisibles à nos animaux, et surtout de l'éthylène-diamine-tétraacétate de $\text{Na}(\text{Na}_2\text{EDTA})$, substance absente de l'eau de mer normale, et qui est peut-être nocive pour les Acanthaires, soit à cause de ses propriétés chimiques, soit à cause du pH auquel elle tamponne l'eau de mer (nous n'avons pas mesuré ce pH).

3.5.11. - Infections éventuelles: Il ne semble pas que la mort des Acanthaires dans nos essais soit due à des bactéries, (cf. 3.4.3.7., p. 18), ni à des champignons comme le pensait le Dr. VON SCHENK en 1961. Mais, à un stade avancé de décomposition, les cadavres d'Acanthaires peuvent attirer des Ciliés apparus dans les cultures; la soie de filtrage de l'eau de mer n'arrête pas, en effet, ces Ciliés ni leurs kystes. Si ces derniers sont des osmotrophes stricts, ils ne se nourrissent que des produits de décomposition des Acanthaires; si, comme c'est plus probable, ils présentent la phagotrophie, ils dévorent probablement des bactéries proliférant, déjà avant l'arrivée de ces Ciliés, sur les cadavres d'Acanthaires.

3.5.12. - Survie maximum et enkystement: Les Acanthaires ont donc simplement "survécu" en élevage. De même, HOLLANDE et ENJUMET (1953, 1960) ne parlent que de survie à propos de leurs "Radiolaires". Nous avons également tenu une Polycystine Sphaéroïde en bon état pendant 4 semaines. Notons que chez beaucoup de Polycystines Sphaerellaires, la membranecellulaire ne paraît pas tendue entre les spicules, loin du centre de l'animal, comme chez les Acanthaires, mais paraît se replier tout contre les sphères extérieures du squelette, laissant émerger une forêt de pseudopodes en désordre eux-mêmes protégés par de longs spicules insolubles; le cytoplasme de l'animal n'est ainsi en contact avec le verre que par très peu de points, ce qui n'est pas le cas chez les Acanthaires, où souvent, si un spicule est légèrement écourté par rupture ou dissolution, ou si la membrane cellulaire est tendue entre des points très distaux des spicules, tout un pan de cette membrane repose sur le verre.

Notre record de survie jusqu'à présent est de 19 jours et demi, atteints par 1 seul individu (une Acanthometra fusca) sur plus de 3300 animaux mis en culture; cet individu s'était alors enkysté, et le kyste, pris par erreur pour un cadavre, fut jeté. A Fiascherino (La Spezia), les collaborateurs de SCHREIBER ont atteint un record, lui aussi avec 1 seul Acanthaire, de 21 jours de survie, avant d'abandonner ces tentatives.

En réalité, nous avons dû confondre assez souvent des Acanthaires en voie d'enkystement avec des cadavres, erreur causée par la disparition du sque-

lette normal et la difficulté d'apercevoir, sans examen d'individus fixés et éclaircis, les paillettes des kystes en formation (cf. 3.4.3.7., p. 18).

3.5.13. - Perspectives: Grâce à l'emploi de récipients à fond optiquement parfait, bien que solide et épais, les cultures d'Acanthaires seront désormais facilement examinées au microscope inversé, et non plus à la loupe binoculaire. D'autre part, les essais ultérieurs seront conduits dans des conditions expérimentales plus homogènes et plus rigoureuses (cf. 3.5.1., p. 19); les facteurs dont l'effet doit être comparé, seront appliqués à des cultures lancées simultanément et contrôlées par le même expérimentateur. Ces cultures seront autant que possible monospécifiques. La quantité d'Acanthaires mis en élevage sera augmentée; leur origine (profondeur, etc.) ainsi que les caractères physico-chimiques de ces lieux d'origine (au moins la température) seront notés. La mortalité des Acanthaires en fonction du délai entre la pêche et la mise en culture, sera étudiée quantitativement.

Il est assez probable que les Acanthaires ne sont morts, dans nos essais, ni d'infection, ni par manque de nourriture (vu les abondantes réserves de leur endoplasme). Comme les facteurs mortels semblent bien, cependant, se manifester dans les récipients de culture (cf. 3.5.2., p. 19), l'un de ces facteurs pourrait être le contact avec le verre, vis-à-vis duquel l'eau présente une forte capillarité, capable éventuellement de détruire des formations biologiques fragiles, aqueuses par définition, telles que la membrane cellulaire des Acanthaires. Les animaux planctoniques n'ont plus besoin, en principe, d'être adaptés au contact avec des solides ou pseudo-solides pour lesquels l'eau est un mouillant (cas certainement de la plus grande partie des minéraux, naturels, au moins), et peut-être certains de ces planctontes, les Acanthaires par exemple, ont effectivement perdu cette adaptation nécessaire aux animaux benthiques et qui pourrait expliquer la résistance souvent meilleure de ceux-ci en élevage. Après la fin des essais de septembre 1963, le Dr. ABRAHAM nous a signalé l'intérêt d'employer des récipients et instruments siliconés, donc anti-mouillants, pour la culture des cellules fragiles. C'est dans cette direction que porteront les prochaines tentatives, qui seront d'ailleurs limitées dans l'immédiat à l'étude des facteurs physiques (température, lumière de différentes longueurs d'onde, balancement à divers rythmes, etc.).

Les cultures seules permettront de régler définitivement de nombreux problèmes; biochimie, systématique (variabilité intraspécifique), cycle biologique et développement (y compris l'étude des kystes), etc. Le bon état des Acanthaires prélevés dans ces cultures pour des recherches morphologiques et cytochimiques, sera plus sûr que celui des individus pêchés directement en mer et fixés aussitôt.

4. CYTOLOGIE, CYTOCHIMIE

4.1. - Introduction

En vue des recherches cytochimiques à effectuer sur les Acanthaires, il est nécessaire de connaître leur morphologie. On peut se baser largement sur la monographie de SCHEWIAKOFF (1926) mais celle-ci est surtout d'ordre systématique et contient parfois des données qualifiées d'"extraordinaires" par TREGOUBOFF (1953), et qu'il convient de revoir, surtout en ce qui concerne le développement embryonnaire. La collection de montages "in toto" laissée par SCHEWIAKOFF à la Station est à peu près inutilisable, vu le pâlissement des couleurs, et ne peut servir que pour des comparaisons taxonomiques.

Des recherches plus récentes, à propos des Polycystines surtout (HOLLANDE

et ENJUMET, 1953, 1954, 1955, 1957, 1960; HOLLANDE et CACHON-ENJUMET, 1959b, 1963; CACHON et CACHON-ENJUMET, 1964; HOVASSE et BROWN, 1953), contiennent quelques précisions intéressantes mais limitées, surtout au sujet des noyaux, du centriolaste et des symbiotes et parasites des Acanthaires.

Il y a lieu d'étudier de manière approfondie la cytologie des Acanthaires en microscopie et électronique, et ce pour les différentes espèces disponibles. Les données exposées ci-après, encore partielles, seront complétées ultérieurement.

4. 2. - Techniques

4. 2. 1. - Pour la microscopie optique:

4. 2. 1. 1. - Examen sur le vivant au microscope inversé de préférence (cf. 2. 4. , p. 8), ce qui permet l'emploi des objectifs à immersion et l'observation aux grossissements de 900 X ou 1250 X.

4. 2. 1. 2. - Fixateurs: Les Acanthaires posent un problème spécial en cytologie, vu la dissolution assez rapide de leur squelette dans de nombreux liquides plus ou moins aqueux (eau distillée, eau de ville, eau de mer; autres solutions de sels; solutions d'acides et de bases, surtout diluées; alcools plus ou moins hydratés; etc.).

Cet inconvénient, corrélatif de la mort des Acanthaires, est connu depuis les recherches d'HERTWIG (1879). Ajoutons que, même dans l'alcool éthylique absolu et dans le toluène, le squelette se dissout en quelques semaines.

Or, l'on ne peut souvent déterminer les Acanthaires avec précision qu'en examinant le centre de leur squelette, masqué sur le vivant par un endoplasme opaque; pour ce faire, il faut donc les fixer et les éclaircir. Beaucoup de fixateurs attaquent le squelette, empêchant ainsi une détermination précise; de plus, la destruction des spicules entraîne la désagrégation rapide de toutes les structures externes appuyées sur eux (membrane cellulaire, pellicule externe et ses fibrilles, etc.). Les fixateurs dissolvant le squelette ne sont donc employés que sur des sujets qui ont pu être déterminés encore vivants.

Fixateurs	Temps de fixation	Dissolution du squelette pendant ce temps
Ethanol 70° iodé	15 mn	pratiquement nulle
Méthanol pur	5 mn	nulle
Carnoy (selon les 2 formules ci-dessous)	30 mn	nulle
Formol neutralisé ou non, à 2%, 4% ou 5%.	10 mn 30 mn	faible assez forte
Bouin ordinaire	10 mn 30 mn	assez forte totale

Pfeiffer	pas essayé	assez rapide (selon TREGOUBOFF)
Helly	30 mn	très faible
Zenker	30 mn	forte
Tétroxyde d'osmium 2%	30 mn	faible
Fleming	de 1 à 24 h	totale

Les diverses colorations essayées sont encore trop peu nombreuses pour pouvoir comparer systématiquement la qualité des divers fixateurs en ce qui concerne les Acanthaires. L'on peut cependant faire les remarques suivantes:

- a) Ethanol 70° iodé: couramment employé par SCHEWIAKOFF, surtout pour ses recherches systématiques, il est en effet assez satisfaisant pour ce but; mais la fixation des détails de l'ectoplasme, utiles pour la détermination, laisse à désirer. De plus, l'iode n'empêche nullement les sels marins de se précipiter sur les spicules, quand l'Acanthaire est plongé, avec une goutte d'eau de mer, dans le fixateur.
- b) Méthanol pur: employé avant la coloration de Giemsa. Les détails semblent bien conservés par ce fixateur.
- c) Carnoy: selon les deux formules suivantes:

Formule entière		Formule réduite	
Ethanol absolu	6 vol.	Ethanol absolu	3 vol.
Acide acétique glacial	1 vol.	Acide acétique glacial	1 vol.
Chloroforme	3 vol.		

Ces mélanges, pratiquement anhydres, respectent le squelette même après plusieurs heures. Pour les "in-toto", ce sont de bien meilleurs fixateurs que l'alcool iodé, et entraînent beaucoup moins de précipitations de cristaux sur les Acanthaires.

- d) Formol: Nous ignorons si c'est l'éventuelle acidité de ce produit qui provoque la dissolution du squelette, mais celle-ci est tout aussi rapide dans le formol neutralisé par du CaCO_3 . Le squelette disparaît complètement en quelques heures au maximum. SCHREIBER a fait ajouter du SO_4Na_2 à saturation dans des échantillons de plancton conservés au formol neutralisé, ce qui limite les dégâts dans une certaine mesure même après quelques mois; cependant l'on trouve dans ces échantillons de nombreux individus dont les structures organiques sont assez bien conservées, mais dont les spicules sont dissouts; SCHREIBER (1962) les a interprétés par erreur comme étant des formes auparavant inconnues du cycle biologique des Acanthaires.

Notons que le fait de plonger des Acanthaires, à la pipette ou autrement, dans un liquide de composition et pH donnés, ne signifie pas que les squelettes ou les autres parties des cellules soient soumis à cette composition et à ce pH, lesquels sont localement modifiés par l'introduction d'eau de mer et par les caractéristiques même du cytoplasme des animaux, vivants ou non. Ceci pourrait expliquer l'inutilité de neutraliser le formol ou de le saturer de sulfate.

- e) Bouin: D'après HOLLANDE et ENJUMET (1953, 1960), les résultats obtenus avec ce fixateur sur les Polycystines, sont comparables à ceux obtenus par les fixateurs osmiés, sauf pour la mise en évidence des limites des plasmodes des Protistes symbiotiques. C'est HOLLANDE aussi qui nous a signalé que la fixation pendant 10 minutes seulement est satisfaisante et abime suffisamment peu le squelette pour que les Acanthaires puissent encore en général être déterminés.
- f) Pfeiffer: c'est un mélange d'acide picrique à saturation et de formol, sans acide acétique; il nous a été conseillé par TREGOUBOFF pour la conservation relativement prolongée des Acanthaires; mais toujours selon cet auteur, ce liquide est moins bon que le formol neutre, pour la préservation du squelette.
- g) Helly: L'innocuité de ce fixateur vis-à-vis du squelette serait peut-être due à son pH voisin de la neutralité?
- h) Zenker: Les résultats ont été très précis après une coloration de Feulgen (cf. 4. 2. 1. 3. pour une discussion de la valeur du Feulgen après l'action de ce fixateur).
- i) Fleming: HOLLANDE et ENJUMET (1960) ont obtenu de beaux résultats, avec ce fixateur, au Feulgen (cf. critique en E. 2. 1. 3.) et même à l'hématoxyline ferrique.
- j) Tétroxyde d'osmium: en solution aqueuse à 2%, il paraît un excellent fixateur de l'ectoplasme, et surtout de la pellicule externe, comme le montrent des "in-toto" d'Acanthaires ainsi fixés et non colorés.

4. 2. 1. 3. - Colorations cytologiques et cytochimiques:

L'on a essayé les combinaisons suivantes de fixations et colorations:

Fixations	Colorations	Technique de montage
Alcool iodé	Carmin boracique	in toto
Formol 5%	Carmin boracique	in toto
Carnoy (formule réduite)	Carmin boracique	in toto
Bouin	Trichrome de PRENANT (Hématoxyline ferrique de Heidenhaim + phloxine + vert lumière).	coupes sériées
Fleming	Hématoxyline chromique de GOMORI + phloxine	coupes sériées
Carnoy (formule complète)	Mann-Dobell biacide (bleu de méthylène + éosine) différencié à l'Orange G.	coupes sériées
Zenker	Feulgen	"Frottis"
Helly	Mann-Dobell (cf. ci-dessus)	coupes sériées
OsO ₄ à 2%	Orcéine + Safranine hydro- soluble de Babès + vert lu- mière	coupes sériées

Méthanol	Giernsa	Frottis
Non fixés	H ₂ SO ₄ 10%	Examen dans le réactif
Non fixés	Lugol	Examen à frais

- a) Carmin boracique de GRENACHER: Employé à raison de quelques gouttes dans 10 ml d'alcool 70°. Colorant peu sélectif (un peu meilleur après fixation au formol; dans ce cas il colore surtout, et nettement, les noyaux). Il convient pour les in-toto à usage systématique, et pour la précoloration des pièces destinées à être sectionnées (cf. 4. 2. 1. 4.). Si l'on veut conserver le squelette intact, on ne peut différencier les pièces au HCL, d'où la nécessité d'une coloration "montante" en solution diluée.
- b) Trichrome de Prenant: La différenciation de l'hématoxyline est délicate, vu la petitesse des noyaux et leur forte concentration en chromatine. Les résultats sont très fins après le Bouin.
- c) Hématoxyline chromique + phloxine: Les temps de coloration essayés (respectivement 20 mn pour le premier et 5 mn pour le second colorant, comme on le pratique pour divers Métazoaires), sont trop longs pour ce matériel-ci, à moins que la fixation au Fleming ne convienne pas dans ce cas.
- d) Mann-Dobell biacide: très intéressante technique pour des formations colorables au bleu de méthylène (centroplastes, matrices spiculaires). Ici la fixation au Bouin (dont nous avons pu contrôler les effets sur des préparations du Professeur HOLLANDE), paraît supérieure à celle au Helly. Les lames de HOLLANDE colorées ainsi après fixation au Fleming, montrent plus nettement les noyaux qu'après fixation au Bouin ou au Helly, mais moins nettement les formations colorables par le bleu de méthylène.
- e) Orcéine + safranine de Babés + vert lumière: cette coloration n'a été essayée que sur des pièces fixées au tétr oxyde d'osmium par nos devanciers, et conservées depuis trop longtemps dans l'éthanol absolu. L'orcéine colore certaines formations fibrillaires faiblement mais avec précision; il n'en est pas de même de la safranine (coloration massive et floue) ni du vert lumière (coloration nulle).
- f) Feulgen: Après fixation au Zenker, cette coloration nous a donné des résultats morphologiquement très fins, mais cytochimiquement contestables; en plus de la coloration nette des noyaux, spécialement des chromosomes, divers autres organites ont présenté une teinte rose plus ou moins intense.

BRACHET a souvent fixé au Zenker et coloré ensuite au Feulgen des noyaux apparemment pauvres en DNA (noyaux des ovocytes mûrs d'Oursins, par exemple). Sur nos indications, à la Station, le Dr. DE PETROCELLIS essaya de démontrer au Feulgen les noyaux contenus dans une suspension de matériel biologique additionnée de sels minéraux et de "tris", triol artificiel servant de tampon. Auparavant, la coloration d'Unna au vert de méthyle-pyronine avait montré que ce matériel fixait surtout la pyronine, et que les noyaux y étaient apparemment très rares. Des "gouttes épaisses" de cette suspension furent mises à sécher sur des lames albuminées, fixées soit à l'alcool méthylique, soit au Zenker, puis colorées au Feulgen sans aucune précaution particulière avant l'hydrolyse acide. Les temps optimum d'hydrolyse pour les différents modes de fixation, tels qu'ils figurent dans la littérature (PEARSE 1961, LISON 1960), furent respectés. Après fixation au méthanol, la coloration fut pratiquement nulle. Après fixation au Zenker, se forma sur la plage de matériel fixé une mince pellicule qui résista à tous les traitements ultérieurs et se colora violemment par le Feulgen; une telle pellicule ne peut être due qu'à l'action du fixateur sur le "tris" et non sur le matériel biologique. Le triol ou son dérivé (poly-

mérisé?) a donc été coloré par cette méthode. Or les traités de chimie industrielle mentionnent l'emploi de bichromate en présence d'acide acétique comme l'un des moyens de préparer des aldéhydes par oxydation d'alcools. Le Zenker contient du bichromate et de l'acide acétique, et en plus du HgCl_2 qui n'est certes pas un réducteur. La base de Schiff, dans ce cas, colorerait donc non seulement le DNA hydrolysé, mais d'autres molécules fixées et pourvues, avant la fixation, de groupes alcool facilement oxydables. On risquerait ainsi, surtout avec des fixateurs oxydants, d'obtenir souvent, en plus de la mise en évidence du DNA, celle de formations également colorables par un PAS faible. Ce danger-là des fixateurs oxydants n'a pas été retenu par LISON (1960), tandis que PEARSE (1961) ne discute guère le problème de la fixation au sujet de la technique de Feulgen. LISON signale cependant que le réactif de Schiff colore beaucoup d'autres fonctions que les groupes aldéhydiques et cétoniques, et que, de plus, de nombreux lipides et glucides, après oxydation, sont décelés par cette substance. Les choses sont d'ailleurs encore plus complexes et des vérifications méthodiques seraient nécessaires. Par exemple, selon LUMB (1950), BAUER en 1932 et HILLARY 1939 ont montré que les fixateurs contenant de l'acide chromique (autre oxydant, remarquons-le) inhibent quelque peu la réaction de Feulgen, mais que les pièces ayant pu être ainsi colorées, gardent la coloration beaucoup plus longtemps que celles fixées sans acide chromique.

On peut donc craindre que des fixateurs donnant de fins résultats morphologiques avec le Feulgen (Zenker, Fleming, etc.) soient à déconseiller si l'on veut obtenir des résultats cytochimiquement valables avec cette coloration, ce qu'il faut rappeler devant les interprétations chimiques de HOLLANDE et ENJUMET (1960), par exemple. A l'avenir nous éviterons les fixateurs oxydants pour ce test, et nous prendrons, entre la fixation et l'hydrolyse, les précautions citées par DANIELLI (1949: réduction à l'hydroxylamine) ou par BURGOS (1955): réduction au SO_2 , puis extraction d'une grande part au moins des lipides par l'acétone; selon HOLLANDE (communication orale), et contrairement à l'opinion générale, on obtient de bons résultats sur les Polycystines soumises à la réaction de Feulgen après fixation au Bouin, si les formations examinées contiennent suffisamment de DNA. L'on peut de plus effectuer des contrôles à la DNase, bien que ceux-ci, selon LISON (1960), soient peu sûrs.

- g) Acide sulfurique 10%: C'est l'un des réactifs histo-chimiques des caroténoïdes, qu'il colore en bleu.
- h) Lugol: Colore l'amidon en bleu-noir.

4. 2. 1. 4. - Procédés de fixation, coloration, enrobage et coupes:

- a) "Frottis": Les Acanthaires sont posés à la pipette sur des lames albuminées, l'eau autour d'eux est absorbée rapidement au papier-filtre et le séchage est achevé à la chaleur d'une lampe; les lames sont ensuite fixées, colorées et montées. Cette technique est rapide mais peu intéressante; leurs longs spicules empêchent les Acanthaires de bien coller à la lame, et l'on en perd un grand nombre pendant les manipulations. Ceux qui restent sont évidemment très déformés.
- b) Fixation, coloration ou précoloration au carmin, et déshydratation, pour "in toto" et coupe: Les "in toto", nécessaires pour les recherches de systématique, sont aussi utiles pour l'étude des parties périphériques de la cellule. Pour la cytologie des Acanthaires, cependant, les coupes sériées sont souvent plus avantageuses: l'endoplasme des adultes peut atteindre souvent 0,2 mm de diamètre, parfois plus, sans compter l'ectoplasme et les spicules qui peuvent porter le diamètre total à 1,5 mm parfois dans certaines orientations; or l'endoplasme est très riche en inclusions de toutes sortes qui le rendent opaque et difficile à étudier in toto.

Les Acanthaires, dans tous les procédés décrits ci-dessous, sont transférés de produit en produit (contenus dans des salières) sous la loupe bino-culaire, au moyen de pipettes et en transférant le moins possible de liqui-
de avec eux.

Après fixation, puis lavage adéquat (mais de préférence dans l'alcool 70° s'il y a lieu de conserver le squelette), les Acanthaires sont, autant que possible, colorés au carmin boracique (préparé comme indiqué en 4. 2. 1. 3. a), p. 25). Après plusieurs lavages rapides dans l'alcool 70°, il sont déshydratés par l'alcool 95° puis l'alcool absolu.

A partir de ce stade, ils sont soit montés en "in toto", soit soumis à des manipulations supplémentaires en vue des coupes sériées.

- c) Montagne des "in toto": Les Acanthaires passent de l'alcool 100% dans 2 bains de toluène ou xylène, puis sont montés individuellement sur lames de microscopie, dans du baume de Canada assez fluide (pour éviter le bris du squelette lors de l'application de la lamelle couvre-objet); les supports latéraux du couvre-objet sont des bandes de "Parafilm" (parmi les autres supports essayés, les allumettes sont trop épaisses et le papier risque souvent d'absorber le baume et les pièces qui s'y trouvent). Les lames sont conservées horizontalement pour empêcher le roulement des Acanthaires dans le baume mal séché.
- d) Détermination et inclusion des Acanthaires à sectionner: Les animaux déshydratés qui n'ont pas pu être déterminés in vivo, sont transférés de l'alcool 100% dans une cellule de Kolkwitz remplie de terpinéol, liquide assez éclaircissant, visqueux et beaucoup moins volatil que le toluol. On peut alors les déterminer au microscope inversé et les grouper espèce par espèce. Puis on les fait passer par quelques bains successifs d'alcool 100% pour les débarrasser du terpinéol.

Les Acanthaires regroupés par espèces et se trouvant dans l'alcool 100% passent alors par 2 bains de toluène ou xylène, puis sont placés dans un premier bain de paraffine à 60 °C. Le transfert dans 2 autres bains de paraffine à la même température se fait très rapidement, en employant des aiguilles et des pipettes chaudes. Finalement, on inclut les animaux, isolés ou groupés par dix environ, dans les blocs de paraffine qui seront sectionnés.

L'on a essayé d'inclure les Acanthaires dans des blocs de cellofndine ou d'agar, pour faciliter ensuite leur manipulation dans les bains de paraffine et lors de l'enrobage. Mais la déshydratation de l'agar, ou l'extraction de l'alcool-éther légèrement hydraté de la cellofndine, provoque de graves défor-
mations des blocs, ce qui abîme les Acanthaires inclus; de plus, ces deux substances font mal prise avec la paraffine et se coupent donc difficilement, la majeure partie des sections étant déchirées ou perdues complètement. En essayant cette technique, l'on enrobait ensemble des Acanthaires d'es-
pèces différentes, dont l'on notait ensuite la position dans le bloc en exa-
minant ce dernier au microscope; l'on essayait ensuite de retrouver chaque Acanthaire en particulier sur les coupes; mais ce procédé s'est révélé trop difficile et imprécis. C'est pourquoi l'on a finalement décidé d'enro-
ber directement les individus dans la paraffine en les groupant espèce par espèce, ce qui entraîne quelque pertes d'Acanthaires lors des manipula-
tions, mais permet d'être sûr de la bonne qualité des lames préparées et des espèces d'Acanthaires examinées.

MAYER (1909), signalant l'intérêt du terpinéol en microscopie, note qu'il parait soluble en toutes proportions dans la paraffine chaude, et pense que l'on pourrait donc transférer directement les pièces du terpinéol dans la paraffine. Nous avons constaté qu'un tel transfert fait apparaître au fond des bacs à paraffine une phase séparée, formé de gouttelettes brunâtres

et visqueuses, dans lesquelles les Acanthaires restent englués et sont endommagés par les phénomènes de tension superficielle; il est difficile de dégager les pièces de ces gouttes sans les abîmer. La suggestion de MAYER est donc à rejeter.

Les difficultés rencontrées en sectionnant les blocs mixtes paraffine-celloïdine ou paraffine-agar, nous ont amené à renforcer la paraffine selon la formule d'ALTMANN pour objets cassants ou climats chauds: (cf. LANGERON 1947)

Paraffine fondant à 60°	850 g
Stéarine	100 g
Cire vierge	50 g

Mais cette formule, dans notre cas, n'améliore rien par rapport à la paraffine pure, qu'elle rend cassante et poudreuse.

Les coupes sont faites à 5 et 7 μ d'épaisseur et sont satisfaisantes si la paraffine pure est le seul milieu d'enrobage employé. Si le squelette est encore présent, il se coupe facilement et reste grosso modo en place, bien que fortement fissuré; il sera ensuite dissout par l'étalement des coupes sur l'eau, le déparaffinage et la coloration.

4. 2. 2. - Microscopie électronique:

L'on a essayé d'abord une technique courante qui reste encore satisfaisante pour divers tissus:

4. 2. 2. 1. - Fixation à 4 °C. au liquide de Palade (tamponné au tampon véronal à pH 7,2) pendant 30 minutes ou 2 heures; le squelette subsiste généralement dans le premier cas, jamais dans le second.

4. 2. 2. 2. - Déshydratation lente par passage 15 minutes dans chacun des liquides suivants: eau de ville, éthanol à 30°, 50°, 70°, 95°, 100° (deux bains dans ce dernier liquide).

4. 2. 2. 3. - Enrobage dans un mélange de méthyl-et butyl-méthacrylate dans la proportion de 3:7 (cette proportion produit, de l'avis général, un plastic assez dur; nous l'avons adopté en espérant que les pièces contenant encore du matériel squelettique seraient ainsi plus faciles à sectionner, ce qui n'a pas été le cas). Initiateur employé: le peroxyde de benzoyle anhydre, à raison de 2% Les pièces sont transférées dans les bains suivants:

- Alcool 100° + méthacrylate, a/a (deux fois 1 heure)

- Méthacrylate (avec initiateur) (deux fois 2 heures)

Elles sont ensuite introduites dans des capsules de gélatine pleines de méthacrylate (avec initiateur), et soumises à la polymérisation à 45 °C. - 47 °C. pendant 12 à 24 heures.

4. 2. 2. 4. - Coupes et examen: Les pièces ont été sectionnées par le Dr. CASTIAUX avec un microtome Porter-Blum et examinées avec un microscope électronique TESLA BS 242, à des grossissements directs de 2.800 à 13.200 X. Les manipulations au microscope et la photographie ont été effectuées par M. le Professeur BOUILLON. Les pièces n'ont pas été colorées, le fixateur les ayant déjà assez bien contrastées.

4. 2. 2. 5. - Qualité des résultats: ils ne sont généralement pas satisfaisants, mais il y a quelques belles exceptions. Il se peut que les Acanthaires n'étaient pas en excellent état lors de leur fixation, vu le manque à cette époque d'un collecteur de Cachon, qui fut remplacé par un collecteur à oreillettes ordinaires. La

polymérisation a manifestement produit de gros dégâts: l'on a observé souvent des formations (mitochondries, etc.) dont les éléments membraneux apparaissent très nets, mais comme pulvérisés dans toutes les directions. La fixation aussi pourrait bien avoir été défectueuse, et il semble que le pH du fixateur, en particulier, aurait dû être plus basique, comme on le conseille en général pour du matériel marin ou très aqueux. De toutes façons, les photos obtenues nous apprennent beaucoup de choses même si elles ne sont presque jamais publiables.

4. 2. 2. 6. - Pour les prochains essais, nous envisageons les modifications suivantes: Fixation à l' OsO_4 en solution aqueuse, ou à l'aldéhyde glutarique avec post-fixation au tétroxyde d'osmium, le tout à des pH compris entre 8 et 9,5 ou 10, obtenus par des tampons au phosphate inspirés de la formule de MILLO-NIG. Enrobage par d'autres substances que le méthacrylate, par exemple l'"Epon" ("Epikote 812" et produits additionnels). Eventuellement, coloration des coupes (par l'acétate d'uranyle, les sels de plomb, le permanganate, etc.) Les méthodes les meilleures pour l'étude des Acanthaires seront recherchées systématiquement.

4. 3. - Résultats

Par rapport à ceux déjà exposés dans le premier rapport technique, nous avons obtenu les données supplémentaires ou nouvelles suivantes:

4. 3. 1. - Pellicules: Les Arthracanthes et les Pseudolithidae ont 2 pellicules, l'une externe, l'autre interne, présentant exactement la même et curieuse ultra-structure en forme de treillis régulier, simple dans la pellicule externe, et polystratifiée dans l'interne. Comme nous l'avions prévu dans le premier rapport technique, il n'y a donc plus lieu de parler de "capsule centrale" chez les Acanthaires.
- La membrane cellulaire forme des lobopodes dans lesquels la pellicule externe ne pénètre pas. La pellicule interne présente des "fusules" ou orifices en forme de cheminée pour le passage des axoplasmes des axopodes.
- Les Symphyacanthes "vrais" (cf. 5. 2.), au moins le genre Astrolithium, peuvent présenter apparemment 3 pellicules, par dédoublement de l'interne. Chez Astrolithium, la pellicule externe est renforcée par une épaisse couche fibreuse et forme d'étroits et profonds sillons qui rejoignent la couche distale de la pellicule interne.
- Chez les Chaunacanthes, l'on trouve, contrairement à ce qu'affirme SCHEWIAKOFF (1926), des Gigartagon, dont la pellicule externe porte des fibres élastiques circulaires et radiales. De plus, une discontinuité dans la périphérie de leur ectoplasme pourrait rappeler l'existence d'une pellicule interne ? L'ultrastructure des pellicules ne rappelle pas celle de la capsule centrale des Phéodaires (CACHON-ENJUMET, 1961), ce qui est un argument de plus pour considérer que ce dernier groupe est très éloigné des autres classes (Acanthaires, Polycystines) contenues autrefois dans le groupe artificiel des "Radiolaires".
4. 3. 2. - Myonèmes: Leur striation (SCHEWIAKOFF, 1926) est confirmée au microscope électronique. Les rapports entre myonèmes et pellicules paraissent un point important pour la compréhension de la classification des Acanthaires et seront examinés plus soigneusement à l'avenir; l'on peut déjà baser sur ce critère la division des Astrolithidae de SCHEWIAKOFF en 2 familles (cf. 5. 2.) pas nécessairement apparentées.
4. 3. 3. - Système centroplastique: Il comprend le centroplaste ("axoplaste" de HOLLANDE et ENJUMET, 1954), l'axoplasme ou axe fibrillaire des axopodes, et

la matrice squelettique avec son dépôt cristallin interne de SrSO_4 ; les axoplasmes et les matrices rayonnent d'un même endroit central de l'endoplasme, qui est le centroplaste, et le squelette serait peut-être dû à la minéralisation de certains axopodes particuliers. L'axoplaste a été vu chez les Chaunacanthes (où il est spécialement volumineux, ce qui confirme une hypothèse formulée dans le 1er rapport technique), chez les Pseudolithidae (où il ne consiste qu'en une jonction punctiforme des matrices et axoplasmes) et chez des Arthracanthes (où il est punctiforme, tantôt plus développé, et ce dans les mêmes familles, semble-t-il: il y a là un problème encore obscur). Tout le système centroplastique peut-être vu en microscopie optique. En microscopie électronique, seules les matrices ont pu être observées: elles sont très fines et délimitent très exactement le squelette.

4.3.4. - Endoplasme: Les mitochondries y sont très nombreuses, et de forme ellipsoïdale, à cristae tubulaires. De même, l'endoplasme est riche en appareils de Golgi, ainsi qu'en vacuoles alimentaires et inclusions de réserves. Les vacuoles alimentaires viennent de l'ectoplasme et contiennent souvent des Bactéries; elles descendent dans l'endoplasme le long des spicules.

Les noyaux ont un petit nucléole périphérique.

Il existe dans l'endoplasme un système de membranes rayonnantes acidophiles dont les connections sont encore obscures; des fragments de ce système ont été observés également en microscopie électronique.

4.3.5. - Zoochlorelles symbiotiques: La microscopie électronique confirme le grand nombre et la position périphérique de leurs chloroplastes.

5. SYSTEMATIQUE

5.1. - Constitution d'une collection: Celle-ci comprend 180 montages in-toto avec plus de 200 pièces. De plus de nombreuses déterminations ont été faites sur des individus destinés aux expériences et à la microscopie électronique.

5.2. - Classification et phylogénie des Acanthaires: Diverses constatations en microscopie optique et électronique, et la critique des données de SCHEWIAKOFF, nous ont amené à imaginer certaines modifications à la classification adoptée dans le 1er. rapport technique (partie systématique, morphologie et biologie.

Voici comment nous concevons actuellement cette classification (la justification de ces vues sera fournie dans un rapport ultérieur):

1° Sous-classe ACTINELIDA Haeckel 1882, sensu Mielck 1907.

Fam. ASTROLOPHIDAE Haeckel 1882, sensu Popofsky 1904.

2° Sous-classe ICOSACANTHA Haeckel 1887.

a) Ordre ARTHRACANTHA Schewiakoff 1926 (définition modifiée par nous).

aa) Sous-ordre PSEUDOLITHACANTHA nom. nov.

Fam. PSEUDOLITHIDAE Schewiakoff 1926.

bb) Sous-ordre SPHAENACANTHA Schewiakoff 1926.

l. Super-famille ACANTHOMETROIDEA nov.

Fam. ACANTHOMETRIDAE Haeckel 1862, définition modifiée par nous: elle ne comprend plus que le seul genre Acanthometra J. Müller 1855 sensu Schewiakoff 1926.

Fam. LITHOPTERIDAE Haeckel 1887, définition modifiée par nous: elle comprend les genres Amphilonche Haeckel 1860 sensu Schewiakoff 1926. Lithoptera J. Müller 1858, et

- Tetralonche Schewiakoff 1926.
- 2° Super-famille DORATASPIDOIDEA nov.
- Fam. PLEURASPIDAE nov. : contient le seul genre Pleuraspis Haeckel 1881 sensu Schewiakoff 1926.
- Fam. LYCHNASPIDAE nov. : correspondent aux Tassaraspida de Haeckel. Avec les genres Stauraspis Haeckel 1881 sensu Schewiakoff 1926, Lychnaspis Haeckel 1887 sensu Schewiakoff 1926, et Icosaspis Haeckel 1881 sensu Schewiakoff 1926.
- Fam. DORATASPIDAE Haeckel 1862, définition modifiée par nous. Elle comprend 3 sous-familles:
- S. - fam. Dorataspinæ Haeckel 1862, définition modifiée par nous: elle comprend les genres Dorataspis Haeckel 1860 sensu Schewiakoff 1926, Hystri-chaspis Haeckel 1887 sensu Schewiakoff 1926, Dictyaspis Haeckel 1887 sensu Schewiakoff 1926, Siphonaspis Haeckel 1882, Coscinaspis Haeckel 1887 sensu Schewiakoff 1926, Craniaspis Haeckel 1866 et Acontaspis Haeckel 1887 sensu Popofsky 1906.
- S. - fam. Hexalaspinae Haeckel 1887 sensu Schewiakoff 1926 (qui en faisait une famille).
- S. - fam. Diploconinae Haeckel 1862 (qui en faisait une famille).
- S. - fam. Phractopeltinae Haeckel 1887 (qui en faisait une famille).
- 3°. Fam. inc. sed. ACTINASTRIDAE Popofsky 1904.
- cc) Sous-ordre PHYLLACANTHA Schewiakoff 1926.
- Fam. PHYLLOSTAUURIDAE Schewiakoff 1926.
- Fam. STAUURACANTHIDAE Haeckel 1887 sensu Schewiakoff 1926.
- Fam. DICTYACANTHIDAE Schewiakoff 1926.
- b) Ordre CHAUNACANTHA Schewiakoff 1926.
- Fam. CONACONIDAE Schewiakoff 1926.
- Fam. GIGARTACONIDAE Schewiakoff 1926.
- Fam. STAUURACONIDAE Schewiakoff 1926.
- c) Ordre SYMPHYACANTHA Schewiakoff 1926, définition modifiée par nous
- Fam. ACANTHOLITHIDAE nov. : avec les genres Acantholithium Haeckel 1887 sensu Schewiakoff 1926, et Heliolithium Schewiakoff 1926.
- Fam. ASTROLITHIDAE Haeckel 1862, définition restreinte par nous: avec les genres Astrolithium Haeckel 1860 sensu Schewiakoff 1926.
- Fam. AMPHILITHIDAE Haeckel 1881, sensu Schewiakoff 1926. A noter que Acanthonia crux Cleve 1900 doit être d'Amphibelone anomala (Haeckel, 1860), contrairement à l'opinion de Schewiakoff, et porter le nom Quadristaurus crux (Cleve 1900) (cf. BOTAZZI-MASSERA, 1963).
- d) Ordre HOLACANTHA Schewiakoff 1926.
- Fam. Acanthoplegmidae Schewiakoff 1926.
- Fam. ACANTHOCHIANSMIDAE Haeckel 1862, sensu Schewiakoff 1926.

Genre inc. sed. Dolichociasma nov. gen. (cf. ci-dessous).

Nos idées sur la phylogénie des Acanthaires sont exposées dans le 1er rapport technique. Ajoutons que nous ne considérons plus la soudure entre eux des spicules des Symphyacanthes comme un caractère s'inscrivant dans une évolution orthogénétique du squelette, mais bien comme un caractère néoténi-

que, cette soudure se rencontrant chez les très jeunes individus dans d'autres ordres d'Acanthaires.

5.3. - Délimitation d'espèces voisines: elles sont vagues et douteuses, notamment dans les genres Astrolonche, Haliommatidium, Acanthometra, Lithoptera, Phractopelta, Phyllostaurus et les Hexalaspinae. La différence entre les genres Stauracantha et Phatpacantha est discutable; il a été trouvé un individu intermédiaire entre Stauracantha orthostaura et Pristacantha octodon, et de manière générale la systématique des Stauracanthidae devra être sérieusement revue, de même que celle des Chaunacanthes et des Dorataspidoïdes. Les Xiphacantha alata semblent constituer une variété différente de la variété printanière, mais peut-être n'est-ce qu'une conséquence de conditions extérieures différentes.

5.4. - Nouvelles espèces: Fin novembre 1963 a été trouvé un individu d'une espèce non encore décrite; il a été nommé Stauracantha candelabrum, n. sp. A Villefranche, nous avons vu très fréquemment un kyste déjà figuré par HOLLANDE et ENJUMET dans de précédentes recherches mais jamais décrit. Un restant de squelette dans le kyste permet de voir qu'il s'agit d'un Holacantha non encore décrit, proche peut-être d'Acanthocolla. En l'absence de trophontes normaux il n'est pas possible de préciser la famille de ce kyste. Nous lui donnons le nom provisoire de Dolichochiasma lanceclatum n. g., n. sp. La description complète de ces deux formes sera fournie plus tard.

6. ECOLOGIE

6.1. - Technique: Les lieux de récoltes, heures de pêche, les instruments et leur emploi en mer, ont été décrits dans le 1er rapport technique, ainsi que dans le paragraphe 1.1. (p. 5) du présent rapport. Les prélèvements, comptages et analyses de l'eau de mer (pour ces dernières, cf. 1er rapport technique) ont continué assez régulièrement, 5 jours par semaine en général, jusqu'au 9 octobre 1963, et les données météorologiques correspondantes ont été notées.

L'emploi des collecteurs CACHON en écologie a été projeté, mais non réalisé à cause de complications pratiques. L'on a projeté également l'emploi de filets améliorés (cf. 1.1.2., p. 5); à ce propos, Mr. le Dr. DOHRN, Directeur de la Station Zoologique de Naples, nous a demandé, avant de faire construire ces nouveaux filets, de nous informer des mesures de standardisation du matériel pour planctologie quantitative actuellement envisagée dans le monde. En conséquence, des renseignements ont été demandés à la F. A. O. (Rome), à l'International Indian Ocean Biological Centre (Cochin, Inde), à l'International Committee for the Exploration of the Sea (Charlottenlund Slot, Danemark), au Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (Cronulla, Australie), au Professeur G. Krey (Kiel), et à une firme privée spécialisée dans ce domaine. Les indications reçues, de même que la bibliographie rassemblée, ont montré que la standardisation des instruments planctologiques n'était nulle part au point, et que ces instruments, là où on les a standardisés, étaient construits selon des directives arbitraires et souvent défavorables à l'obtention de bons résultats. Nous avons décidé à tout hasard d'adopter le filet préconisé par le sous-comité du Plancton de la Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée, mais légèrement amélioré selon les directives de CACHON (1957).

L'usage d'un microscope inversé et de chambres de Kolkwitz avec tubes d'Ütermöhl pour la sédimentation du plancton, ont rendu les comptages plus lents, mais beaucoup plus précis, et ont facilité la reconnaissance et la détermination des planctontes en général.

6. 2. - Valeur des résultats: Leur caractère aléatoire a déjà été souligné dans le précédent rapport. M. TREGOUKOFF, à Villefranche, nous a confirmé le caractère assez douteux des recherches quantitatives en écologie planctonique (excepté pour de petits milieux fermés: étangs, etc.).

Du 6 août 1962 au 9 octobre 1963 ont été réunies un ensemble assez considérable de données faunistiques, hydrologiques et météorologiques. Mais leur valeur est diminuée en particulier par le fait qu'il n'a généralement pas été possible d'aller contrôler à bord le travail des marins, faute de temps. Les résultats sont variables au point qu'on ne peut en tirer de conclusions générales, si ce n'est justement que les conclusions générales sont hasardeuses en planctologie quantitative. Pour faire un travail valable en ce domaine, il faut y atteler une équipe nombreuse pendant plusieurs années consécutives, avec de puissants moyens navals (cas des organisations de recherches sur la pêche dans les mers tempérées et septentrionales).

Les graphiques relatifs aux résultats seront communiqués ultérieurement.

6. 3. - Quelques données partielles sur l'abondance des Acanthaires au cours de l'année: L'hiver est caractérisé par une plus grande abondance de jeunes stades, et l'été par la prédominance des adultes, du moins dans la couche étudiée, entre 0 et 100 m de profondeur.

Les Acanthaires à squelette lourd paraissent plus abondants en hivers quoique toujours minoritaires. (l'eau froide, plus dense, les soutient?)

Parmi les Acanthaires à squelette léger, certains, tels que les Phyllostauridae, sont assez abondants toute l'année.

D'autres ont une période d'abondance plus limitée: Amphilonche elongata et Xiphacanta alata au printemps et en automne (mais sous forme de deux variétés différentes pour cette dernière espèce), Pseudolithium compressus en nombre, et surtout Acanthometra pellucida en été et au début de l'automne; cette dernière espèce forme parfois d'énormes essaims et peut être plus abondante que toutes les autres espèces réunies.

Nous avons pu examiner la collection d'Acanthaires de la baie d'Alger, en possession du Professeur HOLLANDE (Paris). Cette faune ne diffère guère de celle de Naples.

6. 4. - Recherches spéciales: Il s'agit de deux séries de prélèvements de mesures (température, salinité, teneur en oxygène dissout, et en plus, dans le premier cas, nitrites et nitrates) effectuées avec beaucoup de précision et un contrôle permanent du travail des marins:

a) Les 26 et 27 mars 1963, dans le canal de Capri, avec l'ingénieur hydrographe DÜING (Kiel), qui a mesuré l'intensité des courants avec l'appareil d'Ekman: ses mesures et les nôtres, ainsi que nos pêches, ont été faites de 3 en 3 heures à 25, 50 et 75 m de profondeur.

b) Les 2 et 3 mai, "ratissage" de la rade et du port de Naples, avec prélèvements et mesures dans la couche superficielle des eaux en 63 points différents (et donc, malheureusement, sans aucune simultanéité, avec le Professeur I. YAMAZI (Kyoto).

Dans ces deux expéditions, le plancton a été prélevé de manière très précise avec un petit filet fermant pour pêches verticales; les échantillons ont été partagés entre M. Yamazi (pour l'étude des Diatomées, Péridiniens, Copépodes et Appendiculaires) et nous (pour les comptages d'Acanthaires; mais par suite d'une méprise ces échantillons ont été jetés avant d'être analysés). Les données physico-chimiques recueillies montrent de fortes variations, pas toujours faciles à interpréter.

7. BIOLOGIE

7.1. - Mouvements: Ayant pu observer des Acanthaires en très bon état, nous nous rangeons à l'opinion de CACHON et CACHON-ENJUMET (1964) pour qui les pseudopodes de l'extrémité des spicules seraient des axopodes, mais nous pensons que, vu leur position, ils sont d'un type particulier. Les axopodes servent à la locomotion, les uns propulsant l'animal sur le support, les autres jouant le rôle de béquille; mais surtout ils explorent le milieu et en ramènent des proies; ils sont rectilignes et rétractiles, mais leur direction peut être réglée par le jeu de la pellicule externe (dû au fait que les diverses couronnes de myonèmes n'ont pas nécessairement un fonctionnement synchrone), et par les réticulo-lobopodes (ou-filopodes?) périphériques qui s'appliquent sur leur hyaloplasme comme des câbles manoeuvrant une vergue; en ce cas, les axopodes sont pliés net à l'endroit où ils traversent les pellicules externe ou interne.

7.2. - Enkystement: Soupçonné une seule fois à Naples dans une culture, il a pu être suivi en partie sur le magnifique matériel disponible à Villefranche. Il semble être limité aux Holacanthes, Symphyacanthes, Chaunacanthes et Pseudolithidae. Mais de plus il existe de nombreuses formes kystiques encore indéterminables. A Paris nous avons pu examiner les dessins de kystes faits par M. HOLLANDE et ses collaborateurs à Alger (1951-1960) et y retrouver entre autres le Dolichochiasma lanceolatum (cf. 5.4., p. 33); malheureusement les dessins parfois imprécis, et les photos, ne peuvent remplacer l'examen direct; les pièces se trouvent au laboratoire de Luc-sur-Mer (Normandie), où nous n'avons pu aller.

Les Chaunacanthes présenteraient deux types de kystes par espèce, n'ayant peut-être pas la même signification biologique: des kystes coniques, piriformes ou cylindriques, dont le sort est inconnu, et des kystes sphériques précédant peut-être la gamétogenèse, et connus depuis longtemps.

Les kystes piriformes ou ovoïdes que nous avons vu à Villefranche sont solubles dans l'eau de mer après la mort de l'animal enkysté, et dans H_2SO_4 à 96%, insolubles dans l'alcool concentré et dans H_2SO_4 à 50%; ils seraient donc peut-être constitués de $SrSO_4$, comme les kystes sphériques de Chaunacanthes (POPOFSKY, 1906 a). Ces derniers sont bien formés, comme nous avons pu le constater, de petites pastilles imbriquées.

8. REMARQUE

Un rapport plus détaillé sur la morphologie, la systématique, l'écologie et la biologie des Acanthaires sera remis prochainement. Il comprendra de nombreuses figures et graphiques, ainsi que la bibliographie consultée.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON, E. , and BEAMS, H. - 1959 - Electron microscopic observations on the cytology of Actinosphaerium eichhorni; - J. Protozool. , 6 (3, suppl.) : 16.
- ANDERSON, E. , and BEAMS, H. - 1960 - The fine structure of the Heliozoan Actinosphaerium nucleofilum - J. Protozool. , 7 : 190-199.
- BERTAUX, W. S. , and HEDLEY, R. H. - 1963 - Hexagonal patterns in Protozoan cell membranes- Nature, 200 : 89.
- BERTOLINI, F. - 1937 - Sulla classificazione dei Radiolari - C. R. Int. Congr. Zool. Lisboa : 1265-1272.
- BOTAZZI-MASSERA, E. - 1963 - Rivalutazione del genere Quadrystaurus Popofsky 1906 (Protozoa - Acantharia). - Boll. Zool. , 30 : 1-6 + 1 tav.
- BOWEN, V. T. - 1963 - Nature's beauty - Acanthari - Oceanus, 9 (3) : 14-17.
- BRANDT, K. - 1885 - Die Koloniebildenden Radiolarien (Sphaerozoen) des Golfes von Neapel und der angrenzenden Meeresabschnitte. - Fauna und Flora des Golfes von Neapel, XIII. Monographie - 276 pp. + 8 Taf.
- BURGOS, M. H. - 1955 - The Feulgen reaction in mature unfertilized sea urchin egg. Exp. Cell Res. , 9 : 360-363.
- BÜFSCHLI, O. - 1907 - Chemische Natur des Skelettsubstanz des Podactinelius und der Acantharia überhaupt. - Deutsche Südpolar - Exped. 9 (4) : 237-257.
- CACHON, J. - 1957 - Sur quelques techniques de pêches planctoniques pour études biologiques. - Bull. Océanogr. Monaco, n° 1103 : 1-6.
- CACHON, J. - 1964 - Contribution à l'étude des Péridiniens parasites. Cytologie - Cycles évolutifs. - Ann. Sc. Nat. , Zool.
- CACHON et CACHON ENJUMET, M. - Cytologie et ultrastructure de l'ergastoplasme et du système axopodial des Radiolaires Phaeodariés. - Arch. Zool. Exp. Gén. 103, (notes et revue, 1) : 1-12 + pl. 1-2 (1964).
- CACHON et CACHON-ENJUMET, M. - 1964 - Les mouvements de cyclose dans les axopodes d'Acanthaires. Leur rôle lors de la nutrition et de la locomotion Bull. Inst. Océanogr. Monaco, 61 (1286) : 1-8.
- CACHON et CACHON-ENJUMET, M. - Leptospathium navicula nov. gen. nov. sp. et Leptophyllus dasypus nov. gen. nov. sp. , Péridiniens Noctilucidae (Hertwig) du plancton néritique de Villefranche-sur-Mer. - 1964 - Bull. Inst. Océan. Monaco, 62 (1292) : 1-12.
- CACHON-ENJUMET, M. - 1961 - Contribution à l'étude des Radiolaires Phaeodariés. Arch. Zool. Exp. Gén. , 100 (3) : 151-237 + PL. III - XVIII?
- CANNICCI, G. - 1960 - Considerazioni sulla possibilità di stabilire "indicatori ecologici" nel plancton del Mediterraneo. Nota I. Bollett. Pesca, Piscic. e Idrobiol. n. s. , 14 (2) : 164-188.
- CHADEFAUD, M. - Les végétaux non vasculaires (Cryptogamie) - in : Chadefaud et Emberger, Traité de Botanique systématique - T. I, 1018 pp. - Paris.
- CHATTON, E. GRASSE, P. P. et DEFLANDRE, G. - 1952 - Classe des Dinoflagellés ou Péridiniens. - in : Grassé : Traité de Zoologie, I (1) : 309-390 et 404-406.
- CLAPAREDE, E. - 1855 - über die Lebenserscheinungen und insbesondere Bewegungserscheinungen der Acanthometren. - Monatsber. Preuss. Akad. Wiss. : 674.

- CLAPAREDE, E., et LACHMANN, J. - 1858/1859 - Etude sur les Infusoires et les Rhizopodes - 2 vol. - Genève.
- DANIELLI, J. F. - 1949 - A critical study of the techniques for the cytochemical demonstration of aldehydes. - Quart. j. micr. Sc. 90 : 67-74.
- DE ANGELIS, C. M. - 1957 - Ciclo annuale del fitoplancton del golfo di Napoli. - Bollett. Pesca, Piscic. e Idrobiol., n. s., 11 (1) : 37-55.
- DE ANGELIS, C. M. - 1958 - Metodi di ricerca sulla produttività del mare. - Boll. Pesca, Piscic. e Idrobiol., n. s., 12 (2) : 159-211.
- DE ANGELIS, C. M. - 1958 - Seasonal variations of plankton collected in the gulf of Naples during 1954-1955. - Rapp. et Proc. - verb. Comm. Int. Expl. Scient. Médit. N. S., 14 : 247-254.
- DE ANGELIS, C. M., e DELLA VALLE, R. - 1950 - il ciclo stagionale del plancton in rapporto alle condizioni fisico-chimiche del Mar Piccolo e del Mar Grande di Taranto. I. Nota preliminare. - Bollett. Pesca, Piscic. e Idrobiol. n. s., 14 (1) : 21-43.
- DEFLANDRE, G. - 1953 - Acanthaires fossiles. (note infrapaginale et référence) - in : Grassé, P. P. : *Traité de Zoologie*, 1 (2) : 320 et 435.
- DE MAIO, A. - 1959 - Su alcune misure dirette di corrente eseguite nell' ottobre 1959 a bordo della corvetta "Daino" col método del paracadute. Ann. Ist. Univ. Navale, Napoli, 28 : 16 pp.
- DOGIEL', V. A., POLYANSKYI, Yu. I., i Kheissin, E. M. - 1962 - Obschchaia Protozoologiya. - 592 pp. - Moskva.
- DOGIEL', V. A. - Novye dennye po filogenyi Radioliarii. - Zool. Journ., 29 (6) : 562-565. (1950).
- DOYLE, W. L. - 1943 - The nutrition of the Protozoa - Biol. Reviews Cambr. 18 : 119-136.
- ENTZ, G. - 1884 - über die Infusorien des Golfes von Neapel - Mitth. Zool. Stat. Neapel, 5.
- GIACOMETTI-CANNICCI, G. - 1960 - Considérations sur la possibilité d'établir des "indicateurs écologiques" dans le plancton de la Méditerranée. Note II : Sur les Copépodes pélagiques du bassin septentrional de la mer Tyrrhénienne. - Rapp. et Proc. verb. C. I. E. S. M. M., 14 (2) : 208-214.
- GOURRET, P. et ROESER, P. - 1886 - Les Protozoaires du vieux port de Marseille. - Arch. Zool. Exp. Gén. 14.
- FATEMI, M. - 1938 - Les variations saisonnières du plancton de l'étang de Thau à l'embouchure du Canal de Sète. - Thèse (Montpellier) - Sète.
- GRASSE, P. P. - 1952 - Embranchement des Protozoaires. Généralités. in : *Traité de Zoologie*, 1 (1) : 37-132.
- GROSS, F. - 1937 - Notes on the culture of some marine plankton organisms. J. Mar. Biol. Ass. U. K., 21 (N. S.).
- HAECKEL, E. - 1862 - Die Radiolarien (Rhizopoda Radiaria). Eine Monographie. - XIV + 572 pp. + Atlas von 35 Taf. - Berlin.
- HAECKEL, E. - 1865 - Über den Sarcodetkörper der Rhizopoden. - Zeit. wiss. Zool., 15 : 342-370 + Taf. XXVI.
- HÄECKEL, E. - 1881 - Prodomus Systematis Radiolarium. Entwurf eines Radiolariensystems auf Grund von Studien der Challenger -Radiolarien. - Jenaisch. Zeitschr. f. Naturw., 15 : 418-447.

- HAECKEL, E. - 1887 - Report on the Radiolaria collected by H. M. S. Challenger during the years 1873-1876. - Challenger reports, Zoology, 18. - 2 vols. (1760 pp.) + 1 atlas of 141 pl.
- HERTWIG, R. - 1879 - Der Organismus der Radiolarien. - Jena Denkschrift, 1879 (2) : 129-277 + Taf. VI-XVI.
- HOLLANDE, A. - 1953 - Compléments sur la cytologie des Acanthaires et des Radiolaires. - in : Grassé, P.P. : Traité de Zoologie, 1 (2) : 1089-1100.
- HOLLANDE, A., CACHON, J. et CACHON-ENJUMET, M. - 1962 - Mise en évidence par la microscopie électronique, d'une capsule centrale chez divers Péridiniens. Considérations sur les affinités entre Dinoflagellés et Radiolaires. - C. R. Ac. Sc. Paris, 254 : 2069-2071 + 2 pl.
- HOLLANDE, A., CACHON, J. et CACHON-ENJUMET, M. - 1963 - Considérations sur la structure et l'ultrastructure du nucléole de quelques Péridiniens libres. C. R. Ac. Sc. Paris, 256 : 3193-3195 + 1 pl.
- HOLLANDE, A., et CACHON-ENJUMET, M. 1959 a - La polyplotdie du noyau végétatif des Radiolaires. C. R. Ac. Sc. Paris, 248 : 2641-2643 + 2 pl.
- HOLLANDE, A., et CACHON-ENJUMET, M. - 1959 b - Origine, structure et évolution des nucléoles chez les Radiolaires (Collodaires et Spaerellaires). C. R. Ac. Sc. Paris, 249 : 167-169 + 2 pl.
- HOLLANDE, A. et CACHON-ENJUMET, M. - 1963 - Sur la constitution chimique des spicules d'Acanthaires. - Bull. Inst. Océanogr. Monaco, 60 (1263) : 1-4.
- HOLLANDE, A. et ENJUMET, M. - 1953 - Contribution à l'étude biologique des Sphaerocollides (Radiolaires Collodaires et Radiolaires Polycyitaires) et de leurs parasites. Ière partie: Thalassicollidae, Physematidae, Thalassophysidae. - Ann. Sc. Nat., Zool., IIème série, 15 (P : 99-183 + pl. I-VII.)
- HOLLANDE, A. et ENJUMET, M. - 1954 - Sur l'existence d'axopodes et d'un complexe centroplastique chez les Radiolaires. C. R. Ac. Sc. Paris, 238: 1841-1843.
- HOLLANDE, A., et ENJUMET, M. - 1955 - Parasites et cycle évolutif des Radiolaires et des Acanthaires. - Bull. Stat. Aquicult. Pêche Castiglione, N. S., 7 : 151 - 176.
- ENJUMET, A., et ENJUMET, M. - 1954 - Morphologie et affinités du Radiolaire Sticholonche zanclea Hertwig. - Ann. Sc. Nat., Zool., IIème série, 16 : 337-343 + pl. 1-3.
- HOLLANDE, A., et ENJUMET, M. - 1957 - Enkystement et reproduction isosporogénétique chez les Acanthaires. - C. R. Ac. Sc. Paris, 244 : 508-510.
- HOLLANDE, A., ENJUMET, M., et MANCIET, J. - 1953 - Les Péridiniens parasites des Phaeodariés et le problème de la sporogénèse chez ces Radiolaires. C. R. Ac. Sc. Paris, 236 : 1607-1609.
- HOLLANDE, A. et ENJUMET, M. - 1960 - Cytologie, évolution et systématique des Sphaerofidés (Radiolaires). - Arch. Mus. Nation. Hist. Nat. 7e série, 7, 1-134 + 64 pl.
- HOVASSE, R., et BROWN, E. R. - 1953 - Contribution à la connaissance des Radiolaires et de leurs parasites Syndiniens. - Ann. Sc. Nat. Zool., IIème série, 15 : 405-438.
- KRISS, A. E. - 1960 - Meeres-Mikrobiologie. Tiefseeforschungen. - 579 pp. - Jena.
- LANGERON, M. - 1947 - Précis de microscopie. - Paris.
- LE CALVEZ, J. - 1938 - Recherches sur les Foraminifères. Arch. Zool. Exp. Gén., 80 : 163.

- LESSLER, M. A. - 1953 - The nature and specificity of the Feulgen nucleal reaction. - Intern. Rev. of Cytology (N. Y.), 2 : 231-247.
- LISITZIN, E. - 1955 - Contribution à la connaissance des courants dans la mer Ligure et la mer Tyrrhénienne. - Bull. Inst. Océanogr. , 48 (1060).
- LISON, L. - 1960 - Histochimie animale. Principes et méthodes. - 2 vols, XII + 842 pp. - Paris.
- KUMB, E. S. - 1950 - Cytochemical reactions of nucleic acids. - Quart. Rev. Biol. , 25 (3) : 278-291.
- MAYER, P. - 1909 - Über ein neues Intermedium. - Zeit. wiss. Mikr. , 26 (4) : 523-524.
- Mc LACHLAN, J. , and YENTSCH, C. - 1959 - Observations on the growth of Dunaliella euchlora in culture. - Biol. Bull. , 116 : 461-471.
- MIELCK, W. - 1906 - Untersuchungen an Acanthometriden des pacifischen Ozeans. - Zool. Anz. , 30 (23) : 754-763.
- MIELCK, W. - 1907 - Acanthometren von Neu-Pommern. - Wiss. Meeresuntersuch. Abt. Kiel, N. F. , 10 : 39-105 + Taf. IV-VIII.
- NIELSEN, J. N. - 1912 - Hydrographical observations in the Méditerranéan. Rep. Dana Exped. Médit. , 1.
- MARGALEF, R. - 1961 - Caractéristiques et signification des Zooxanthelles du "phytoplancton prisonnier" des Acanthaires. - Rapp. Proc. - verB. C. I. E. S. M. M. , 16 (2) : 141-142.
- PAVILLARD, J. - 1952 - Classe des Phytomonadines ou Volvocales. - in : Grassé P. P. , : Traité de Zoologie, 1 (1) : 154-211.
- PEARSE, A. G. E. - 1961 - Histochemistry, theoretical and applied. - London.
- PERES, J. M. et DEVEZE, L. - 1963 - Océanographie biologique et Biologie marine. T. 2. : La vie pélagique. - 514 pp. - Paris.
- POPOFSKY, A. - 1904a - System und Faunistik der Acanthometriden der Plankton-Expedition. - Inaug. Diss. - 77 pp. - Kiel.
- POPOFSKY, A. - 1904b - Die Acantharia der Plankton-Expedition, Teil 1 : Acanthometra. - Ergen. Plankton-Exped. , 3 (Lief.) : 1-1858 + 12 Taf. u I Tab.
- POPOFSKY, A. - 1905 - Weiteres über die Acanthometriden der Plankton-Expedition. Arch. f. Protistenk. , 5 : 339-357 + Taf. XIV-XV.
- POPOFSKY, A. - 1905/1907 - Die nordische Acantharien. Nordisches Plankton. Lief. 3 : 43-69, und Lief. 16 : 71-90.
- POPOFSKY, A. - 1906 - Die Acantharia der Plankton-Expedition. Teil 2 : Acanthophracta. - Ergebn. Plankton-Exped. , 3 (Lief.) : 1-160 + 16 Tafeln.
- POPOFSKY, A. - 1906 - Über Acanthometriden des indischen und atlantischen Ozeans. - Arch. f. Protistenk. , 7 : 345-394 + Taf. XIV-XVII.
- POPOFSKY, A. - 1909 - Die Radiolarien der Antarktis (mit Ausnahme der Tripyleen). Ergebn. Deutsch. Südpolar Exped. , 10 : 183-305 + 1 Tabelle und Taf. XX-XXXVI.
- PROVASOLI, L. , Mc LAUGHLIN, J. J. A. , and DROOP, M. R. - 1957 - The development of artificial media for marine algae. - Arch. Mikrobiol. , 25 : 392-428
- SACCHI, C. F. , et RENZONI, A. - 1962 - L'écologie de Mytilus galloprovincialis (Lam.) dans l'étang littoral du Fusaro et les rythmes annuels et nyctéméraux des facteurs environnants. - Pubbl. Staz. Zool. Napoli, 32, (suppl.) : 255-293.

- SCHEWIAKOFF, W. - 1902 - Beitrage zur Kenntnis der Radiolaria-Acanthometrea. - Mém. Acad. Impér. Sc. St. Pétersb. 8e série, 12 (10) : 40 pp. + 4 taf.
- SCHEWIAKOFF, W. - 1926 - Die Acantharia des Golfes von Neapel. - XXIV + 755pp. + Atlas von 22 Tabelle und 46 Tafeln. "Fauna e flora del Golfo di Napoli, monografia 37.
- SCHREIBER, B. - 1959 - Ecology of Acantharia and the Sr circulation in the sea. - IAEA/UNESCO scientific conference on the disposal of radioactive wastes. Monaco 16-21 November, 1959 - 4 pp. (stencil).
- SCHREIBER, B. - 1960 - Ecology of Acanthari and strontium circulation in the sea. "Disposal of radioactive wastes", IAEA, Vienna : 25-38.
- SCHREIBER, B. - 1962 - The biology of Acanthari in relation to Sr circulation in the sea. - IAEA : Panel on co-ordination of research projects on radioactivity in the marine environment ; Vienna 21-23 November, 1962. 10 pp. (stencil).
- SCHREIBER, B., BOTAZZI-MASSERA, E., FANO-SCHREIBER, A. GUERRA, F. e Pelati, L; - 1962 - Ricerche sulla presenza dello Sr nel plancton marino in rapporto alla ecologia degli Acantari. Pubbl. Staz. Zool. Napoli, 32 (suppl.): 400-426.
- SCHREIBER, B., CAVALCA, L. e BOTAZZI-MASSERA, E. - 1959 - Ecologia degli Acantari e la circolazione dello Sr nel mare. - Bollett. Zool., 26 (2) : 213-220 + 2 tav.
- SCHRÖDER, O. - 1907 - Eine gestielte Acanthometride (*Podactinelius sessilis* Ol. Schr., n. gen., n. sp.). - Deutsch. Südpolar-Exped., 9 (4) : 225-236 + taf. XIV-XV.
- SVERDRUP, H. V., JOHNSON, M. W., and FLEMING, R. H. - 1942 - The Oceans. Their physics, chemistry and general biology. - 1097 pp. - N. Y.
- TREGOUBOFF, G. - 1953a - Classe des Acanthaires - in : Grassé, P. P. : Traité de Zoologie, 1 (2) : 271-320 et 433-436.
- TREGOUBOFF, G. - 1953b - Classe des Radiolaires - in : Grassé, P. P. : Traité de Zoologie, 1 (2) : 321-388 et 433-435.
- TREGOUBOFF, G. - 1961 - Technique et méthode des pêches quantitatives. Rapp. Proc. - verb. C. I. E. S. M. M., 16 (2) : 227-230.
- TREGOUBOFF, G. et ROSE, M. - 1957 - Manuel de planctonologie méditerranéenne. C. N. R. S., Paris. 587 pp. et 218 pl.
- YAMAZI, I. - 1955 - Plancton investigations in inlet waters along the coast of Japan. XVII. Seasonal succession of zooplankton in the inner area of Tanabe bay from June to October 1954, Publ. Seto Mar. Biol. Lab., 8 (2) : 451-453 + pl. XLI.
- YAMAZI, I. - 1960 - Automatic plancton sampler with multiple nets. - Publ. Mar. Seto Biol. Lab., 4 (2-3) : 311-320.
- YAMAZI, I. - The plancton of Japanese coastal waters. - 1962-238 pp. + 8 pl. Osaka.

PARTIE CHIMIQUE

CHAPITRE 1

ANALYSE DE L'AZOTE ORGANIQUE CONTENU DANS LES ACANTHAIRES

Avant d'aborder l'étude du métabolisme du Sr chez les Acanthaires, il a été décidé d'étudier leur écologie et, si possible, d'effectuer une analyse chimique permettant de mieux connaître leur constitution, vu que les données bibliographiques concernant ces protozoaires sont rares.

Nous avons donc pensé entreprendre les recherches par la détermination de la quantité d'azote organique contenu dans les Acanthaires afin de nous faire une idée de leur contenu protéique. En même temps, la détermination de l'azote organique opérée sur des échantillons d'eau de mer prélevée au même endroit que les Acanthaires devrait permettre, par comparaison des données, d'établir la différence existant entre leur composition et celle du milieu environnant.

Le livre "Apparatus and methods of oceanography", de Barnes, contient la description du semimicro Kjeldall servant à déterminer le total d'azote organique dans le plancton ou l'eau de mer; mais l'auteur n'indique ni les résultats obtenus, ni la zone d'action propre à la méthode. Avant de passer à l'analyse des échantillons faisant l'objet de nos recherches, la méthode a été appliquée à certaines méduses (Rhizotoma, Cotylorisa) en vue de déterminer la précision des résultats obtenus et la zone d'action de la méthode. En ce qui concerne les résultats, on peut dire que la quantité d'azote trouvée concorde sensiblement avec les valeurs indiquées dans la bibliographie. Quant à la méthode, elle donne toute satisfaction pour ce qui est des quantités comprises entre 0,3 mg et 1 mg. Pour des quantités inférieures, on ne peut pas toujours être certain des valeurs obtenues; l'analyse sur les échantillons d'eau de mer a été effectuée de la manière suivante:

A des échantillons de 250 cm³ chacun, nous avons ajouté 9 cm³ de H₂SO₄ concentré, et nous avons laissé évaporer jusqu'à disparition des fumées blanches d'anhydride sulfurique, puis nous avons encore ajouté 4 cm³ d'acide sulfurique concentré et 0,5 g de mélange catalytique formé de sulfate de potassium, de sulfate de mercure et de poudre de sélénium, et nous avons laissé "carboniser" pendant une nuit. La solution acide a été diluée avec de l'eau bidistillée; une part aliquote de cette solution a été versée dans le ballon de Kjeldall, à laquelle nous avons ajouté 10 cm³ d'une solution de NaOH à 40% et de Na₂S₂O₃ à 5%. Durant la carbonisation, l'azote organique s'est transformé en sulfate d'ammonium qui, dans ces conditions, laisse se dégager de l'ammoniac recueilli dans un flacon contenant de l'acide borique à 2%. Grâce au titrage, on peut calculer la quantité d'azote contenu dans l'échantillon. Tous les essais effectués ont été négatifs. Etant donné que ces essais avaient déjà pris un certain temps et que la connaissance de cette importante donnée ne pouvait que servir à comparer la composition des Acanthaires avec celle de l'eau de mer, nous avons jugé opportun de renoncer à cette détermination. Pour les Acanthaires, nous avons appliqué la même méthode. Nous avons prélevé un échantillon d'environ 2.000 Acanthaires dans de l'eau de mer; nous l'avons fait sécher; nous avons ajouté 7 cm³ d'acide sulfurique concentré et 1 gramme du mélange de catalyse, en laissant "carboniser" jusqu'à complète décoloration, puis nous avons dilué avec de l'eau bidistillée. Une partie de l'échantillon a été traitée dans le bal-

lon de Kjeldall. Lorsque la distillation a commencé, nous avons constaté dans le récipient de collecte contenant de l'acide borique, la formation d'un courant d'acide sulfhydrique (reconnaissable à son odeur caractéristique); ce fait imprévu s'est produit dès que les premières gouttes du mélange alcalin sont parvenues dans le ballon de distillation contenant l'échantillon. Nous avons pensé à une action réductrice de l'acide thiosulfurique sur l'acide sulfurique à pH encore acide. Nous en avons eu confirmation en versant dans un tube d'essai d'abord la solution alcalique, puis, goutte à goutte, la solution acide. Dans ce cas, il n'y a pas eu développement d'acide sulfhydrique. Les échantillons ont été à nouveau remis sous hotte dans un bain de sable, pour obtenir une meilleure élimination de l'anhydride sulfurique et diminuer ainsi l'acidité de la solution; toutefois, durant le chauffage, une substance a été introduite par des tierces personnes, substance qui, réagissant avec les vapeurs d'anhydride sulfurique, a donné lieu à un produit visqueux, de couleur sombre qui a rendu les échantillons inutilisables. Nous avons alors pensé à appliquer la méthode colorimétrique de Nessler pour obtenir des données, utilisables tout au moins à titre d'orientation; nous disons d'orientation parce que, lors de l'application de la méthode de Nessler, il se produit des interférences dues aux sels éventuellement présents dans l'échantillon, comme c'est précisément le cas chez les Acanthaires. Le résultat de l'analyse a été de 0,07 gamma d'azote par individu. Nous espérons avoir confirmation de ce résultat lorsque nous disposerons d'un micro Kjeldall, lequel manque actuellement à la Station zoologique.

La technique est la suivante : on prépare une solution standard de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sec, avec une concentration de 0,4 nm d'azote par 0,1 ml de solution, et on procède aux essais avec une quantité de solution $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ variant de 0,05 ml à 0,3 ml.

La mesure de l'intensité de la coloration a été effectuée avec un spectrophotomètre Beckmann d'une longueur d'ondes de 430 millimicrons. Nous avons ainsi tracé un graphique de la variation de l'"adsorbance" en fonction de la quantité d'azote. Puis nous avons prélevé 1015 Acanthaires, nous les avons lavés à l'eau distillée, l'eau de lavage étant éliminée à chaque fois par centrifugation. A cet échantillon, nous avons ajouté 0,5 cm³ d'acide sulfurique concentré et, après l'avoir laissé toute une nuit dans un bain de sable, nous l'avons refroidi et nous y avons ajouté quelques gouttes d' H_2O_2 pour être certains de la "carbonisation" complète; quelques heures après, nous l'avons dilué jusqu'à obtention de 1 cm³. Nous avons prélevé trois échantillons de 0,2 ml de solution et procédé aux lectures 3 minutes après l'adjonction du réactif de Nessler. La valeur moyenne de l'absorption des trois échantillons correspond à une quantité d'azote égale à 71,320 gammas pour les 1015 Acanthaires. Outre la mise au point des méthodes d'analyse concernant l'écologie, nous avons déterminé le poids des Acanthaires selon la méthode décrite dans la bibliographie (Cooper 1934) pour la détermination du poids d'animaux planctoniques. Pour obtenir des données très précises, il aurait été nécessaire d'effectuer un certain nombre d'essais, mais étant donné le caractère précieux de chaque échantillon (caractère dû au fait qu'on ne dispose pas encore du moyen de les conserver en culture et que chaque échantillon est obtenu en isolant un à un les Acanthaires au microscope), nous n'avons effectué que deux essais à titre d'orientation, en nous promettant de procéder à cette détermination du poids sur chaque échantillon d'Acanthaires nécessaire aux analyses futures, si celles-ci permettent de chauffer l'échantillon au four à 110 °C. L'échantillon d'Acanthaires isolés au microscope a été filtré, en opérant une légère dépression à travers des disques de filtre Whatmann n° 42 et on a fait passer l'eau de mer à plusieurs reprises. Nous avons laissé la pompe à vide en fonction pendant 5 minutes. Puis, nous avons pesé le filtre, encore mouillé, avec les Acanthaires; ce filtre ayant été précédemment pesé seul, après avoir subi le même traitement, il a été possible de calculer le poids humide des Acanthaires. Après la pesée, le filtre, renfermé dans un pèse-filtre porté au préalable à poids constant, a été placé dans un four à 110 °C et y a été laissé jusqu'à ce qu'on n'enregistre plus aucune variation de poids. Connaissant le poids du filtre, qui avait été cette fois aussi déterminé au préalable après avoir été maintenu dans le four à 110 °C, nous avons calculé (par différence) le poids sec des Acanthaires. Connaissant leur

nombre, et en adoptant une marge d'erreur maximale de 5% lors des opérations d'isolement et de comptage des Acanthaires, chaque individu devrait avoir un poids sec variant entre 1,8 et 5,6 gammas et devrait contenir environ 90% d'H₂O.

Nous répétons qu'il s'agit là de chiffres indicatifs considérés comme probables, mais que seul un nombre assez élevé de déterminations peut confirmer ou infirmer. Compte tenu du problème fondamental qui est à aborder dans cette recherche, à savoir l'étude du métabolisme du Sr, nous avons décidé de procéder à une analyse au spectrographe d'émission pour pouvoir détecter la présence d'éléments lourds qui pourraient influencer sur le métabolisme de ce cation. En outre, ce type d'analyse nous permettra d'obtenir quelques données sur la constitution, en particulier du squelette, de ces protozoaires, dont on sait bien peu de choses. Nous avons par ailleurs entrepris l'étude du métabolisme de l'ion SO₄.

CHAPITRE 2.

Après avoir examiné la bibliographie concernant ce sujet, nous avons décidé d'aborder le problème en nous fondant sur deux hypothèses également possibles: la première considère l'éventualité d'une absorption par les Acanthaires de sulfates solubles soustraits au milieu ambiant, avec accumulation ultérieure du sulfate de strontium dans le squelette. La seconde hypothèse est fondée sur ce qui a été constaté en de nombreux cas par Dziewiatkowski, à savoir la transformation de soufre organique en ions SO₄. Les substances organiques qui se trouvent à la base de cette voie métabolique sont les amino-acides sulfurés, méthionine, cystine et cystéine.

Cette seconde hypothèse est tout aussi vraisemblable, étant donné que les Acanthaires, non seulement possèdent sans aucun doute certains de ces amino-acides en tant que constituants de leur contenu protéique, mais peuvent aussi en absorber à partir des bactéries dont ils se nourrissent, lesquelles en contiennent indiscutablement, ainsi qu'il est affirmé dans la bibliographie les concernant.

En tout cas, nous avons effectué différents essais visant à prouver la présence de ces amino-acide chez les Acanthaires.

Nous avons en un premier temps cherché à obtenir cette preuve par la méthode électrophorétique à haut voltage, mais il n'a pas été possible d'obtenir par ce procédé une bonne séparation.

Nous sommes donc passés à la chromatographie sur papier et, parmi les différentes méthodes éprouvées, celle qui a donné les meilleurs résultats a été la méthode de Levj et Chung.

Nous avons opéré de la manière suivante; nous avons pris différents échantillons d'un millier environ d'Acanthaires et nous les avons soumis à homogénéisation dans un microrécepteur; puis, nous les avons placés dans une fiole pour hydrolyse, en y ajoutant 6 cm³ d'acide chlorhydrique six normal; puis, nous avons fermé les fioles après y avoir fait le vide, nous les avons laissées dans un four à 110 °C. pendant des durées variant de 50 à 70 heures. Nous avons ensuite laissé évaporer l'acide et les échantillons ont été dilués avec de l'eau distillée; dans la fiole, nous avons constaté la présence de ce qu'on appelle les humines, lesquelles proviennent généralement de la réaction-entre tryptophane et carbohydrates.

Sur des feuilles de papier Whatman n° 1, lavées avec une solution d'acide acétique 1 M, nous avons placé 30λ d'échantillon et nous avons laissé s'écouler la première phase formée de butanol, d'acide acétique et d'eau dans les rapports 4 : 1 : 5, pendant seize heures; ensuite, les feuilles ont été séchées dans un four à 40 °C. pendant deux heures. Puis, en recouvrant par deux plaquettes de verre la zone où se trouvaient les amino-acides, nous avons légèrement arrosé la surface restante avec un "buffer" d'acide borique à pH 8,3 et les feuilles ont été à nouveau placées dans un

four à 40 °C pendant une quarantaine de minutes.

Nous avons également laissé s'écouler la seconde phase, composée d'un mélange de méta-crésol, de phénol et de "buffer", pendant seize heures. Après avoir maintenu les feuilles pendant deux heures dans un four à 40°, nous les avons arrosées d'une solution de ninhydrine et de l'alcool méthylique contenant en outre de la collidine et de l'acide acétique glacial. Nous avons pu ainsi constater la présence des amino-acides suivants: cystine (confirmée par réaction spécifique pour amino-acides contenant du soufre), acide aspartique, acide glutamique, sérine, glycine, thyronine, lysine, alanine, thyrosine, proline, phénylalanine, leucine, plus isoleucine et valine.

En outre, nous avons recherché les amino-acide libres en les isolant selon la méthode de Awapara, mais des essais de confirmation sont encore en cours. Après avoir établi la présence de la cystine en tant qu'acide sulfuré, nous sommes passés à l'autoradiographie pour déterminer si l'ion SO_4^{--} du squelette est, ou n'est pas, de provenance organique.

Nous avons préparé des échantillons d'une vingtaine d'Acanthaires que nous avons mis à incuber dans l'eau de mer contenant 10 μ cml d'isotope radio-actif. Les isotopes utilisés ont été le Na_2SO_4 , la méthionine et la cystine, tous contenant du S^{35} . Les temps d'incubation ont été différents pour chaque type de substance et ont varié d'une demi-heure à une heure, deux heures, trois heures. Après incubation, les échantillons ont été fixés avec de l'acide acétique et de l'alcool éthylique absolu dans le rapport 1 : 3 et, après un séjour d'une demi-heure dans le fixateur, ils ont été colorés au carmin boracique. Après avoir réalisé les coupes nécessaires, nous avons déposé sur elles un film sensible aux rayonnements et nous l'avons développé après des temps d'exposition allant de 10, 20, 30 et 60 jours. Sur les plaques de verre correspondant aux Acanthaires mis à incuber avec du sulfate de sodium marqué, on constate clairement que les spicules n'ont pas incorporé de S^{35}O_4 , tandis que l'on note une légère incorporation par la cellule.

Sur les plaques comportant les sections d'Acanthaires mis à incuber avec de la cystine- S^{35} , on note en revanche une absorption intense au niveau du squelette. Etant donné que le squelette est enveloppé d'une gaine qui est sans aucun doute de nature protéique, on se demande si l'absorption de l'acide marqué provient uniquement de la matrice du squelette; par conséquent, les rayonnements seraient dus à la cystéine- S^{35} qui se trouve en tant que telle dans la gaine et non au S^{35} qui a été métabolisé en SO_4 . Il n'est donc pas possible d'éclaircir avec certitude si les rayonnements proviennent aussi du squelette. On pourrait y parvenir en opérant avec de la cystine- C^{14} , et il devrait alors se produire au niveau des spicules un noircissement plus faible que dans l'expérience effectuée avec la cystine- S^{35} .

On pourrait également procéder à l'expérience avec de la cystine S^{35} et éliminer la partie organique avant l'application du "stripping". Toutefois avant de répéter ces expériences, il a été décidé de procéder à une autoradiographie au Sr^{90} pour chercher à déterminer si le SrSO_4 du squelette des Acanthaires présente un "turn-over" propre, c'est-à-dire s'il s'y produit un dépôt continu de SrSO_4 ou si les Acanthaires, après formation de leur squelette, n'absorbent plus de ^{90}Sr à cette fin. Il ne devrait pas subsister de doute dans l'interprétation des plaquettes, étant donné que si l'on constatait des rayonnements au niveau du squelette, leur provenance serait claire, puisqu'il ne devrait pas y avoir de ^{90}Sr dans la matrice. Parmi les isotopes du strontium, nous avons choisi le Sr^{90} , parce que c'est l'isotope qui a la vie moyenne la plus longue et qui est le moins dangereux à utiliser. Cette fois, après des durées d'incubation différentes, certains échantillons d'Acanthaires ont, après incubation, été placés pendant quelques heures dans de l'eau de mer sans isotope radio-actif, au cas où l'animal aurait besoin de plus de temps pour assimiler le Sr. Le strontium radio-actif a été ajouté à l'eau de mer sous la forme de nitrate. Avant de débiter en coupes, il a été procédé à certaines lectures à l'aide d'un compteur de la Nuclear Chicago, et nous avons pu constater qu'une certaine incor-

poration de Sr^{90} avait eu lieu. En outre, avant d'appliquer le "stripping" sur les sections, nous avons attendu 21 jours, pour la raison suivante: le Sr^{90} donne toujours lieu à la formation d'yttrium 90 qui a une vie moyenne de 2 jours et demi; il est donc préférable de laisser s'écouler un temps égal à dix fois la vie moyenne de l'yttrium avant d'appliquer le film, de manière à être certain que les rayonnements qui frappent le film proviennent du Sr et non de l'yttrium. Egalement dans ce cas, nous avons utilisé des doses de $10\mu\text{c}/\text{ml}$ de substance radio-active. En observant les plaquettes après le développement, nous avons constaté que la dose de Sr^{90} utilisée était très élevée; en effet, au niveau des sections des Acanthaires, on constate des noircissements très intenses. Il sera donc nécessaire de répéter l'expérience avec des doses plus faibles d'isotopes. Toutefois, comme certaines sections de spicules sont également très noircies et compte tenu du fait que le Sr contenu dans les Acanthaires se trouve en majeure partie dans le squelette, nous pensons qu'en répétant l'expérience, avec une plus faible quantité de Sr, il sera possible de constater une incorporation par le squelette. Des photographies de plaquettes concernant l'autoradiographie au S^{35} et au Sr^{90} sont jointes au présent rapport.

Outre ces autoradiographies, il a également été procédé à l'analyse spectrographique d'émission des Acanthaires (à l'Institut supérieur de Santé à Rome). Cette première analyse a permis de se faire également une idée de la quantité des ions présents dans les Acanthaires. Les résultats sont les suivants:

strontium : quantité prédominante
calcium, magnésium, fer : faibles quantités
sodium, potassium, baryum, cuivre, silicium, manganèse, plomb, aluminium, vanadium, titane : traces

Il est actuellement procédé à la préparation d'un échantillon contenant 5000 Acanthaires en vue d'effectuer une analyse quantitative pour les ions Sr^{++} , Ca^{++} , Na^+ , K^+ . Nous portons particulièrement notre attention sur ces ions, étant donné que nous pensons que le Sr contribue non seulement à la formation du squelette, mais prend également part au mécanisme des échanges ioniques entre la cellule et le milieu extérieur. Et pour pouvoir mieux observer ce fait, nous avons pensé à soumettre également à l'analyse quantitative un échantillon d'Acanthaires maintenu pendant 12 heures dans de l'eau de mer artificielle privé de Sr. De cette façon, si les deux analyses donnent les mêmes résultats, on pourra très probablement admettre que le Sr ne participe pas au métabolisme de la cellule mais fait seulement partie du squelette; dans le cas contraire, on peut penser à un rôle régulateur du Sr et il sera intéressant d'entreprendre des recherches dans ce sens.

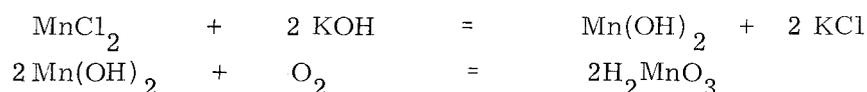
CHAPITRE 3.

DETERMINATION DE L'OXYGENE ET DE LA SALINITE DANS L'EAU DE MER

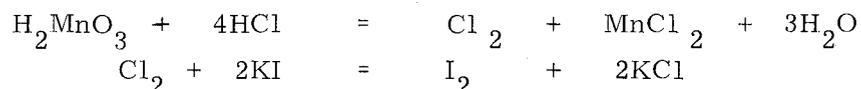
3.1. - Détermination de l'oxygène par la méthode de Winkler

Lors du prélèvement de l'échantillon d'eau de mer, effectué avec une bouteille de Nansen, on fixe l'oxygène dissous dans l'eau par addition de 1 cc d'une solution de KOH à 50% et de KI à 15% et de 1 cc d'une solution de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ à 50%. Les additions sont effectuées sur le bateau où l'on procède aux prélèvements.

On obtient ainsi les réactions suivantes :



En laboratoire, on ajoute lcc de HCl concentré et l'on obtient :



L'iode libéré est titré au moyen de thiosulfate de sodium en présence d'empois d'amidon.

3. 2. - Détermination de la salinité

On a constaté que, indépendamment de la valeur absolue de la concentration, la proportion relative des constituants les plus abondants pouvait être adoptée comme indice de la salinité totale; des échantillons d'eau ayant la même teneur totale en sels ont les mêmes propriétés physiques. Il n'est pas possible de déterminer la quantité de solide dissous dans l'eau de mer par analyse chimique directe, vu la complexité de la constitution.

Il n'est pas non plus possible d'obtenir des résultats reproductibles par évaporation à sec de l'eau de mer et pesée du résidu, certaines substances telles que les chlorures se perdant dans la dernière phase de l'évaporation. Pour résoudre ces problèmes, on peut recourir à une technique donnant des résultats reproductibles qui, bien que ne représentant pas la quantité totale de sels dissous, ne donnent qu'une quantité légèrement plus faible appelée par définition salinité. On détermine la teneur en chlorures par la méthode de Mohr et, en appliquant la formule établie par une Commission Internationale :

$$S = 0,03 + 1,805 \cdot \text{teneur en chlorures}$$

on obtient la salinité.

Ci-joint les graphiques de la salinité et de l'oxygène.

3. 3. - Analyse des nitrites

Pour le dosage des nitrites, nous avons adopté la méthode de Robinson et Thomas G. Thompson de l'"Oceanographic Laboratories University of Washington".

En général, la concentration des nitrites dans l'eau de mer varie de 0 à 2 atomes grammes par litre d'eau à 20°; on trouve rarement des nitrites en-dessous de 100 m et, même à ces profondeurs, on peut ne pas en trouver non plus. Près de la surface, leur concentration est en général de l'ordre de 0,10 atome gramme de NO₂-N/l.

On obtient ainsi la diazotation de l'amine en solution acide par les nitrites dissous dans l'eau de mer.

Il apparaît une coloration rose dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de nitrites présents. Les solutions de réactifs à employer sont les suivantes :

- 1) "acide sulfanilique" : dissoudre un gramme de cette substance par chauffage dans un mélange de 15 ml d'acide acétique glacial et de 15 ml d'eau distillée. Ajouter encore de l'eau à la solution chaude jusqu'à ce que le volume final soit de 300 ml et que la substance soit tout à fait dissoute. La solution doit être conservée en flacon fermé par un bouchon émeri.

- 2) α -naphtylamine : faire bouillir 0,2 g de cette substance avec 40 ml d'eau distillée. La solution non colorée est séparée du précipité de couleur sombre lorsqu'elle est encore chaude et traitée avec 15 ml d'acide acétique glacial. Ajouter encore 285 ml d'eau distillée. Cette solution doit également être conservée dans un flacon bouché à l'émeri.

Pour préparer la solution de référence, on sèche quelques grammes de NaNO_2 dans un four à 110° et on refroidit dans un dessiccateur. On pèse 0,690 g de ce nitrite, que l'on dissout dans de l'eau bidistillée et on porte la solution à un litre. On ajoute 0,2 ml de chloroforme de manière à pouvoir conserver la solution pendant de nombreux mois. On la conserve dans un flacon opaque et dans l'obscurité. Un ml de cette solution contient 10 micro-atomes-grammes de $\text{NO}_2\text{-N}$.

L'échantillon d'eau de mer doit être traité dès que possible avec des réactifs. Dans un ballon étalonné de 100 cc, mettre une certaine quantité d'échantillons (90 cc env.) puis ajouter 4 cc d'un mélange obtenu avec des volumes égaux d'acide sulfanilique et de α -naphtylamine; porter à 100 cc et attendre une heure au minimum. On traitera les échantillons de référence comme les échantillons d'eau de mer. La lecture au spectrophotomètre, effectuée à une longueur d'ondes de $524 \text{ m}\mu$, s'effectue une heure après pour permettre à la couleur d'atteindre son intensité maximum. Les échantillons doivent être à la même température ou n'avoir entre eux qu'une différence de 2°C au maximum.

La courbe de référence peut être établie avec de l' H_2O bidistillée, l'influence des sels dissous dans l'eau de mer étant pratiquement négligeable. Différentes courbes de référence ont été établies et ont confirmé la parfaite reproductibilité de la méthode.

3.4. - Analyse des nitrates

Les nitrates ont, en revanche, été dosés par la méthode de Mullin et Riley, fondée sur la réduction des nitrates en nitrites avec de l'hydrazine en solution alcaline de $\text{pH} = 9,6$, en présence d'ions de cuivre qui font office de catalyseurs. Cette méthode se recommande de préférence par la facilité avec laquelle on peut doser les nitrites. Tous les réactifs et les solutions doivent être préparés à l'eau fraîchement distillée. Les réactifs à employer sont les suivants :

- 1) Solution tampon de phénate de sodium:

Dissoudre 9,40 g de phénol pur dans 200 ml d' H_2O distillée. Filtrer à travers un "sintered glass filter" (porosité 4) et diluer à 250 ml.

Prélever avec une pipette 50 ml de cette solution de réserve de phénol et la verser dans un ballon étalonné de 100 ml ; ajouter 16 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium N, diluer jusqu'à obtention du volume désiré et mélanger intimement. Conserver la solution dans un flacon de verre opaque et la jeter lorsqu'elle se décolore.

- 2) Catalyseur de sulfate de cuivre:

On prépare une solution contenant 0,02512 g de CuSO_4 anhydre et 0,0393 g de sulfate de cuivre pentahydrate pour 100 ml.

- 3) Solution de sulfate d'hydrazine:

Dissoudre 1,2 g de sulfate d'hydrazine dans environ 240 ml d'eau; diluer à 250 ml et filtrer à travers un "sintered glass filter" porosité 4.

- 4) Agent réducteur hydrazine-cuivre:

Mélanger 25 ml de la solution de réserve de sulfate d'hydrazine avec 5 ml du catalyseur CuSO_4 et diluer à 50 ml. Ce réactif doit être préparé journellement.

5) Acide sulfanilique:

A une solution de 0,30 g d'acide sulfanilique dans environ 80 ml d'eau, ajouter 12,9 ml d'acide chlorhydrique concentré et diluer à 100 ml.

6) α -naphtylamine:

Dissoudre 0,60 g de chlorhydrate d' α -naphtylamine ou 0,478 g d' α -naphtylamine recristallisée dans 80 ml environ d'eau contenant 1 ml d'acide chlorhydrique concentré. Diluer à 100 ml.

7) Acétate de sodium 2 m :

27,2 g d'acétate de sodium hydraté dans 100 ml d'eau distillée.

8) Acétone pur

9) Solution standard de nitrate:

(10 μ g de NO_3^- - N/ml) dissoudre 0,0722 g de KNO_3 pur /l.

Traitement des récipients

Nettoyer tous les récipients étalonnés utilisés pour le dosage des nitrates en les remplissant d'abord d'acide sulfurique concentré. Au bout de quelques heures, les vider, les rincer à l'eau, puis au NaOH 0,1n et enfin les laver à l'eau distillée.

5 à 6 heures au maximum après le prélèvement, l'échantillon d'eau de mer est traité comme suit:

Prélever 40 ml de l'échantillon (filtré à travers un papier filtre à texture fine, la présence des bactéries pourrait avoir un effet négatif sur la réduction) que l'on verse dans un ballon étalonné de 50 ml, ajouter 2 ml de tampon de phénate de sodium, puis agiter doucement la solution. Ajouter encore 1ml du réactif hydrazine-cuivre, mélanger intimement et conserver à l'obscurité dans une chambre à 20 °C. La température ambiante est très importante, car on a constaté qu'à température plus basse ou plus élevée, le processus de réduction des nitrates en nitrites n'est pas complet. Ajouter 24 heures après 2 ml d'acétone en vue de "complexer" certains résidus d'hydrazine et de retarder la précipitation du colorant azofque rouge d'une eau de mer riche en nitrates (7-14 atomes grammes de NO_3^- -N/l). On laisse s'accomplir la réaction pendant 2 minutes au minimum, puis on ajoute 2 ml d'acide sulfanilique, en agitant. 5 minutes après, au minimum on ajoute un ml du réactif α -naphtylamine, on agite, puis l'on ajoute un ml d'acétate de sodium 2 M.

On dilue à 50 ml, on mélange intimement et au bout de 15 minutes au minimum on mesure la densité optique de la solution à 500 m μ . Nous avons établi de nombreuses courbes standard, tant avec de l'eau distillée qu'avec de l'eau de mer, et nous avons pu noter une bonne reproductibilité de la méthode. Les courbes établies avec des échantillons d'eau de mer et celles établies avec de l'eau distillée sont différemment inclinées, étant donné qu'il faut faire usage d'un facteur "salt error" qui est, en l'espèce, de 0,75, pour pouvoir lire les valeurs des échantillons d'eau de mer sur la courbe de l'eau distillée.

Le réactif blanc se détermine de la manière suivante:

Avec 40 ml d'eau fraîchement distillée, on détermine la densité optique du réactif blanc total que nous désignons par la lettre A, traité comme il a été dit ci-dessus. On détermine ensuite la valeur de la densité optique d'un échantillon d'eau distillée B, traité de la même manière et auquel on n'a pas ajouté le réactif α -naphtylamine. La différence (A -B) nous donne la valeur des nitrates présents dans les réactifs.

Dans le calcul final, il faut tenir logiquement compte de la quantité de nitrites présents : si elle est inférieure à 5% des nitrates, on opère comme suit : la densité optique de l'échantillon étant désignée par la lettre D, on divise D par

le "salt error" de manière à pouvoir utiliser la courbe standard obtenue avec l'eau distillée. On soustrait de ce rapport la valeur de (A - B) et l'on obtient la valeur de la densité optique à lire sur le graphique. Si, en revanche, la quantité de nitrites présents est supérieure à 5%, il faut en tenir compte dans le calcul. On opère alors de la manière suivante : on multiplie la valeur de la densité optique due aux nitrites par 0,39 qui est le facteur de correction pour leur concentration; on ajoute au produit la valeur (A - B) et on soustrait cette somme de la valeur D/salt error.

Les lectures ont été effectuées à 524 m μ avec des cellules de 4 cm.

3. 5. - Analyse des phosphates

L'analyse des phosphates présente certaines difficultés car les méthodes appropriées pour les échantillons contenant de faibles quantités de phosphates ne sont pas parfaitement reproductibles dans tous les cas. Nous avons adopté la méthode de Proctor et Hood. A cet effet, nous avons préparé les réactifs suivants:

a) Acide sulfurique 18 N.

Se prépare en ajoutant avec de grandes précautions 250 ml de H₂SO₄ concentré à 250 ml d'eau distillée et en portant le tout à 500 ml.

b) Acide sulfurique 1,2 N.

Prélever 67,2 cc d'acide sulfurique 18 N et porter à un litre.

c) Wash acid.

Ajouter 100 cl d'alcool isobutylique à un litre d'acide sulfurique 1,2 N et agiter pour mélanger complètement.

d) Molybdate d'ammonium.

Solution à 10% à conserver dans un flacon en polyéthylène.

e) Solution de SnCl₂ · 2H₂O à 2% dans HCl 2,4 N.

Dissoudre 2,3 g. de SnCl₂ · 2H₂O dans 20 ml de HCl 12 N. Diluer à 100 ml et conserver dans un flacon opaque avec de petites pièces d'étain. La solution est stable pour plusieurs mois.

f) Solution réductrice.

Ajouter 2 ml de la solution de chlorure stannique à 100 ml de "wash acid". Mélanger convenablement. Stable pour une demi-journée.

g) Réserve standard de phosphate.

Dissoudre 0,408 g de KH₂PO₄ dans 900 cc d'eau bidistillée et porter à un litre. Ajouter 1 ml de CCl₄ pour empêcher les altérations dues aux bactéries.

i) Isobutanol et isopropanol.

Procédé

Prélever 75 ml de chacun des échantillons à analyser et verser dans des entonnoirs à séparation de 200 ml. Les échantillons doivent être à la température ambiante. Ajouter 5 ml d'acide sulfurique 18 N à chacun et 5 ml de molybdate d'ammonium à 10%. Pendant que l'on ajoute ces réactifs, il faut agiter les entonnoirs pour éviter la formation de concentrations locales. Ajouter 15 ml d'alcool isobutylique dans chaque entonnoir et agiter pendant une minute. Eliminer la phase aqueuse. La phase organique est extraite à deux reprises avec des fractions de 25 ml de "wash acid". Après élimination de la phase aqueuse, ajouter 0,30 ml d'alcool isopropylique pour éviter la formation de gouttelettes. Le réactif blanc se prépare à l'eau distillée traitée de la même manière. Il convient de noter qu'une partie de l'isobutanol se dissout dans l'eau de mer en laissant une phase organique de 7 ml, environ.

La solubilité de l'isobutanol dépend de la température. C'est la raison pour laquelle les échantillons à analyser doivent être isothermiques.

Nous avons expérimenté cette méthode un nombre considérable de fois, nous avons établi des courbes standard tant pour l'eau distillée que pour l'eau de mer et nous n'avons jamais obtenu de valeurs, je ne dirai pas identiques, mais approximativement égales. Les valeurs relatives aux phosphates ne sont donc fournies qu'à titre d'orientation.

3. 6. - Mesure du pH

La mesure du pH des échantillons d'eau de mer prélevés aux trois profondeurs a été effectuée à l'aide d'un pH-mètre Beckmann automatique.

Essais d'électrophorèse

Nous avons préparé des solutions standard de L-méthionine, L-cystéine, L-cystine, D-sérine et L-sérine, contenant 0,200 mg de substance dans 100 ml d'eau, ainsi qu'une solution saturée de SrSO_4 . Nous avons prélevé 10 cc de chacune de ces solutions et le tout a été porté à 100 cc avec la solution de SrSO_4 . Pour les essais d'électrophorèse, nous avons utilisé 100 Å de cette dernière solution. Nous avons opéré avec un potentiel de 480 V appliqué à une bande de 11 cm de largeur, soit 43 V environ par cm. L'intensité initiale du courant était de 8mA. et, une heure après; lorsque l'expérience a été interrompue, elle était passée à 7,5 mA. Nous avons utilisé pour l'expérience un tampon à pH 1,9 préparé avec 3 ml d'acide formique à 80%, 12 ml d'acide acétique glacial, 15 ml d'acétone, le tout dilué à 100 ml avec de l'eau.

Dans ces conditions la séparation des amino-acides ne s'est pas révélée satisfaisante. Nous avons alors effectué d'autres essais en modifiant convenablement le voltage, le pH du liquide d'écoulement, la durée de l'expérience et la quantité de substance utilisée. A la fin, nous avons constaté que la séparation la meilleure s'obtenait en un temps d'écoulement de cinq heures, avec un voltage de 40 V/cm et avec un tampon d'acide formique 1,5 m et d'acide acétique 2 m (1 : 1) avec un pH égal à 2.

Nous avons utilisé un papier Whatman 3 MM.

Mais en passant à un mélange composé de plusieurs amino-acides, nous n'avons pas obtenu de bonne résolution, nombre de ces amino-acides présentant un RF peu différent ainsi qu'il ressort du tableau ci-après, établi pour différents amino-acides utilisés séparément.

Nous avons utilisé une solution saturée de L-cystine car sa faible solubilité ne permettait pas d'obtenir une solution de 0,2 mg %.

Tableau des RF

1) d, 1 - tryptophane	5,5 cm	10) citrulline	9,5 cm
2) d, 1 - valine	7 cm	11) 1- cystéine	9,7 cm
3) d, 1 - ac. glutamique	7,1 cm	12) d, 1- leucine	10,7 cm
4) 1 - asparagine	7,3 cm	13) 1 - méthionine	10,9 cm
5) 1 - thyrosine	8 cm	14) histidine	12 cm
6) d, 1 - proline	8,1 cm	15) 1- sérine	12,5 cm
7) 1 - isoleucine	8,5 cm	16) a, lysine	12,5 cm
8) 1 - cystine	9,1 cm	17) 1- arginine	12,6 cm
9) d, 1 - glutamine	9,5 cm	18) - alanine	13,6 cm
		19) glycine	16,5 cm

Les essais d'électrophorèse ont demandé plus d'un mois de travail. Nous avons pensé à l'électrophorèse avant de recourir à la chromatographie parce que cette méthode permet de ne pas tenir compte de la présence de sels qui, très souvent, empêchent d'obtenir de bonnes résolutions chromatographiques.

Notes sur la Chromatographie :

Avant d'obtenir de bons résultats avec la méthode de Levj et Chung, de nombreux essais ont été nécessaires, car durant l'exécution de la chromatographie, nous avons constaté un déplacement uniforme de la tache avec la première phase alors que la seconde phase opérait la séparation des amino-acides.

Nous avons pensé que ce fait était dû au type de réactifs utilisés, à la température ambiante, au temps d'écoulement, mais tous les essais tendant à améliorer ces conditions ont donné un résultat négatif. Finalement nous nous sommes rendu compte que ce phénomène résultait de ce que la première phase (butanol, acide acétique, eau) s'écoulait dans un milieu non parfaitement saturé, le "chromatocab" ayant un joint de caoutchouc qui n'adhérait pas parfaitement et empêchait ainsi la saturation. La seconde phase (m-crésol, phénol, eau) n'en était pas affectée car elle n'exigeait pas un milieu saturé. Nous avons donc fait acheter une petite cuve de verre de dimensions convenables et nous avons finalement obtenu de bons résultats. Pour la préparation des chromatogrammes de référence, nous avons utilisé la solution standard d'acides-amino pour l'"aminoacid analyser". Notons que les essais sur les Acanthaires ont exigé beaucoup de temps parce qu'il convenait d'opérer sur 1.000 individus au minimum, nombre difficile à atteindre compte tenu des difficultés déjà rencontrées pour la préparation d'un seul échantillon.

Méthode visant à détecter la présence d'acides-amino sulfurés

Pour confirmer la présence de cystine sur le chromatogramme, nous avons opéré de la manière suivante :

La tache a été découpée et baignée dans un mélange d'acétone et d'acide chlorhydrique N (4 :1) pour éliminer la ninhydrine. Ensuite, nous l'avons immergée dans une solution formée de 4 ml de K_2PtCl_6 0,002 M, de 0,25 ml de KI N, de 0,4 ml de HCl N et de 76 ml d'acétone. Nous l'avons fait sécher et l'opération a été répétée plusieurs fois. La tache est devenue transparente, ce qui n'arrive que lorsqu'il s'agit d'un acide-amino sulfuré.

Note sur l'autoradiographie au Sr^{90} :

Certains des échantillons, préparés pour l'autoradiographie au Sr^{90} , après avoir été plongés dans du xylol pendant 21 jours, ont été placés dans un compteur de la "Nuclear Chicago" en vue de contrôler s'il y avait eu absorption de Sr^{90} . Nous avons obtenu les résultats suivants :

(Les échantillons sont indiqués par $^{90}Sr_x$ où $x = 1, 2, 3, 4, 5, \text{etc.}$ indique le numéro de l'échantillon).

N° échantillon	Acanthaires	Isotopes	Heure inc.	Background du compteur	Lecture de l'échant.	Coups effectifs
$^{90}Sr_7$	60	10 μ c/ml	22	8.124	10.632	2.508
$^{90}Sr_8$	67	"	19	"	18.250	10.400
$^{90}Sr_9$	57	"	8 1/4	"	12.541	4.417
$^{90}Sr_{10}$	87	"	9 1/2	"	18.412	10.288

Le background du compteur obtenu est la moyenne de dix lectures.

Les valeurs relatives aux échantillons sont la moyenne de cinq lectures.

Les lectures au compteur ont été effectuées pour contrôler notamment si l'acide acétique du fixateur provoquait la séparation du Sr^{90} absorbé par la cellule. Nous avons donc tout d'abord procédé à une lecture pour le fixateur avec les acanthaires incubés, puis à une seconde lecture pour le seul fixateur. Cette dernière lecture a révélé une absence totale de radio-activité. Les valeurs de radio-activité lues sur le compteur ne sont pas très élevées, vu les quantités extrêmement faibles d'isotopes utilisés.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) Comar Bromer : Mineral Metabolism. Vol. 2 - Part B - Chapter 28
- 2) Brachet - Mirsky - The Cell - Vol. 1
- 3) Boyd - Autoradiography
- 4) P. J. Fitzgerald - M. D. - and coll. : Radioautography, Theory, Technique and applications
- 5) Block : Paper Chromatographies
- 6) Bolton, E. T. , Cowie, D. B. and Sands, M. K. (1952) :
Sulphur metabolism in *Escherichia coli* III, the metabolic fate of sulphate sulphur.
- 7) Meimberg M, Fridovich I and Mandeer (1953) : The enzymatic oxidation of sulphite. *J. BIOL. Chem.* 204, 1913
- 8) Dziewiatkowski Dominic D. 1952 : Radioautographic studies of sulfate-sulphur (S^{35}). Metabolism in the articular cartilage and bone of suckling rat.
J. Expl. Med. 93, 451
95, 489
J. Biol. Chem. 178, 931
- 9) C. Chapman-Andresen/Autoradiography techniques as applied to unicellular organisms
Pubbl. Staz. Zool. Napoli 31 Sup: 1959
- 10) C. H. Weddington: Autoradiography and some of its uses
Pubbl. Staz. Zool. Napoli 31 Sup. 1959
- 11) Boroughs, Towsley and Ego: The accumulation of Y^{90} from an equilibrium mixture of Sr^{90} - Y^{90} by *Artemia salina* *Limn. Oceanog.* 3, n° 4 414
- 12) Rice T. R. The accumulation and exchange of strontium by marine planktonic algae. *Limnol. Oceanog.* 1 : 123-138
- 13) H. L. Rosenthal. Uptake of Calcium-45 and Strontium-90 from water by fresh water fishes *Science* 126, 699-700 (1957)



Fig. 1. - 2e série d'essais - Influence de la fréquence des renouvellements de l'eau des plevages, sur la survie des Acanthaires.

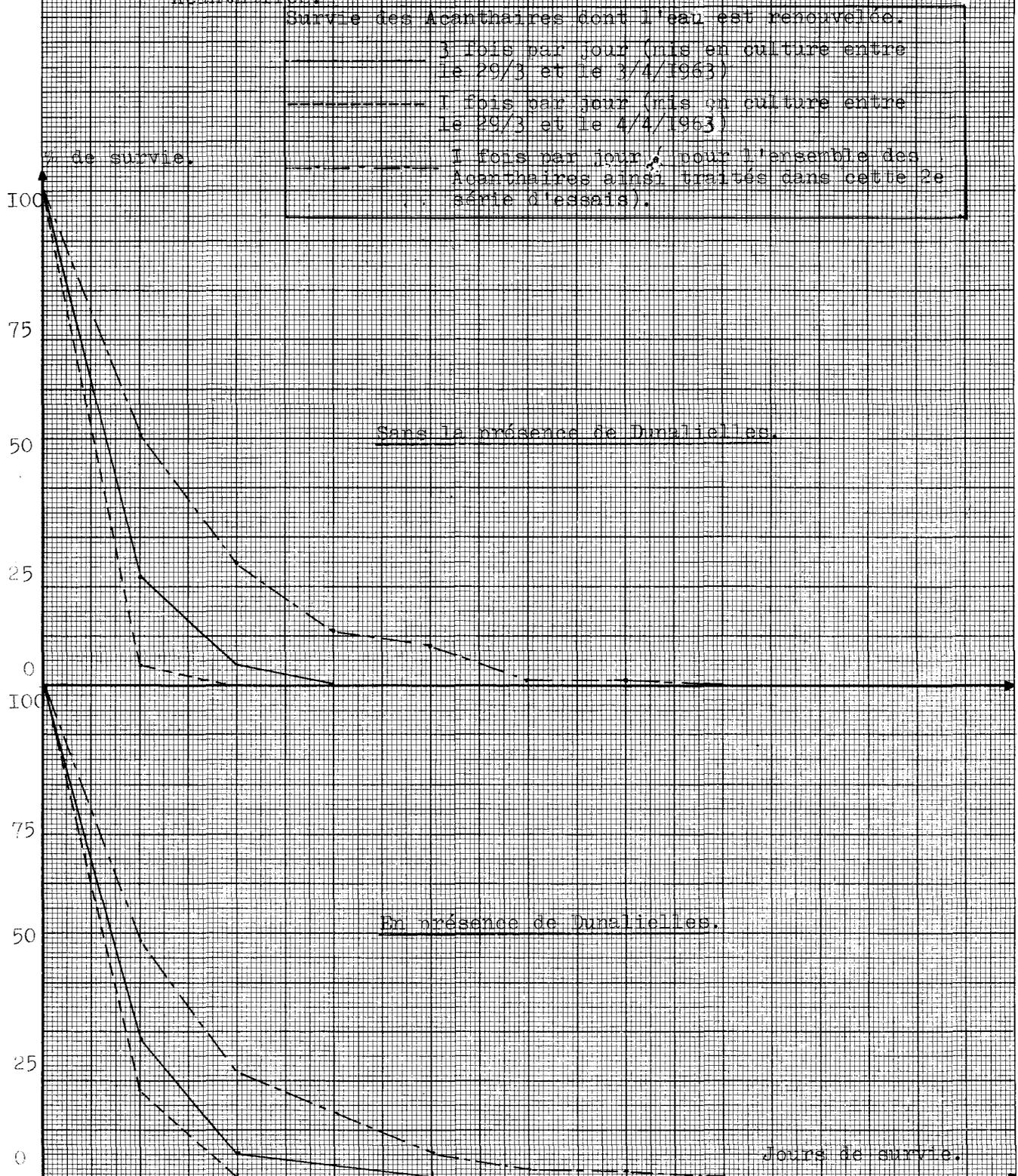


Fig. 2. - 2e série d'essais - Influence de la présence de *Dunaliella* sur la survie des Acanthaires en élevage.

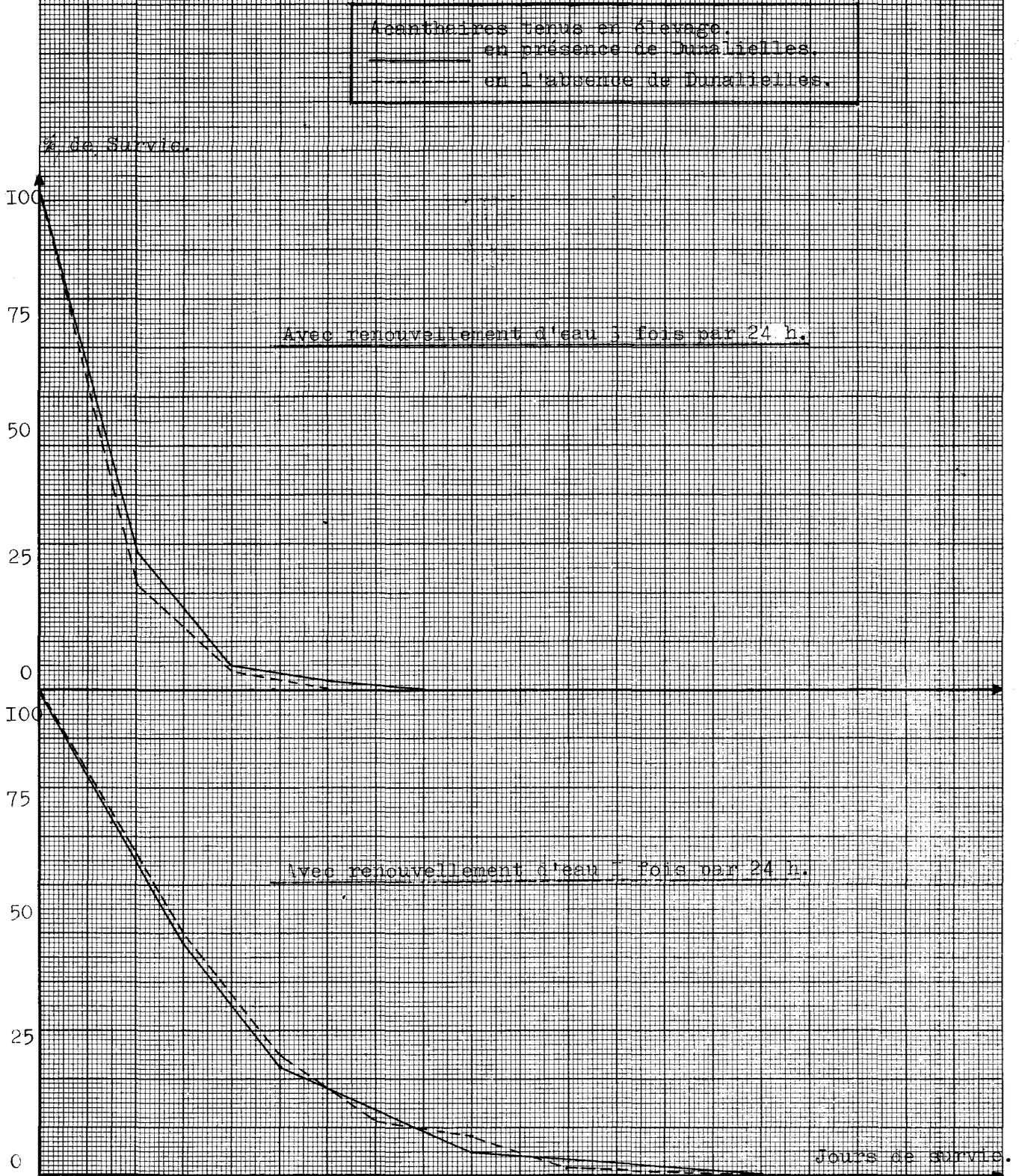


Fig. 4. - 3e série d'essais - Effet de la lumière sur les élevages d'Acariens maintenus immobiles.

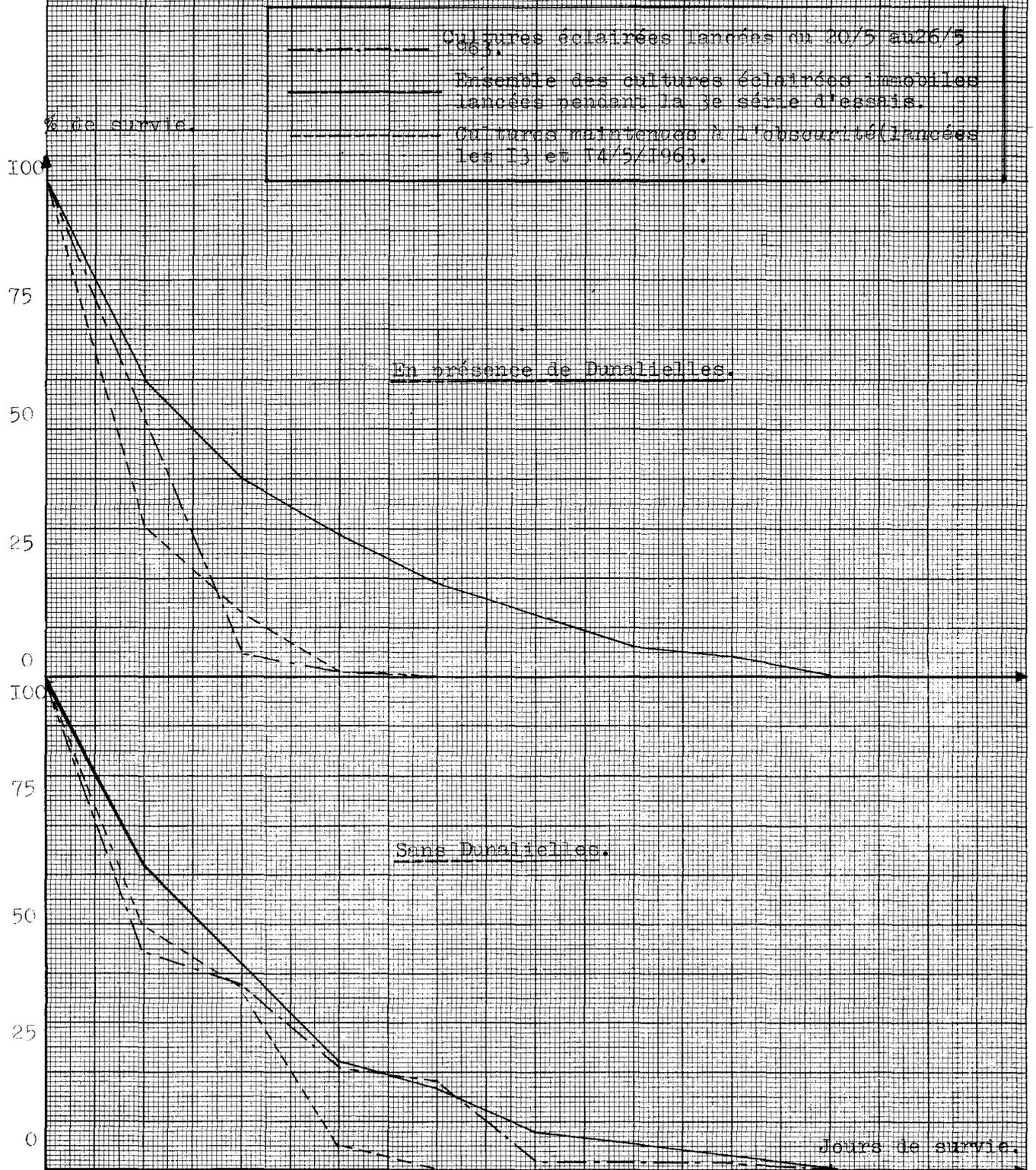


Fig. 5 — Série d'essais. — Effet de balancement des cultures d'*Acanthaires* maintenues en permanence.

--- Cultures immobiles.
— Cultures balancées.

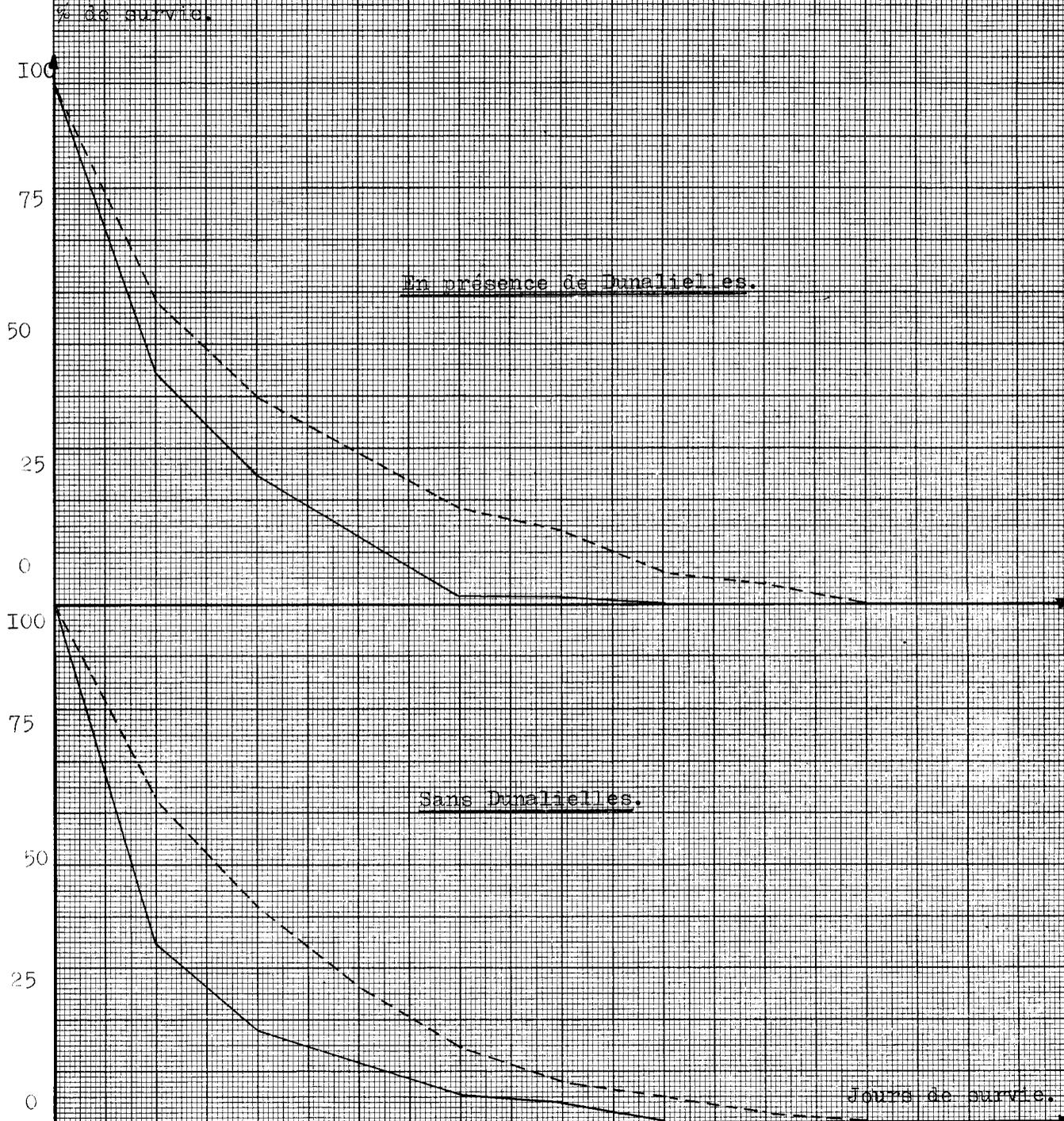


Fig. 7. - 3e série d'essais - Effet de la date de mise en élevage sur la survie des Acanthaires en cultures immobiles, éclairées.

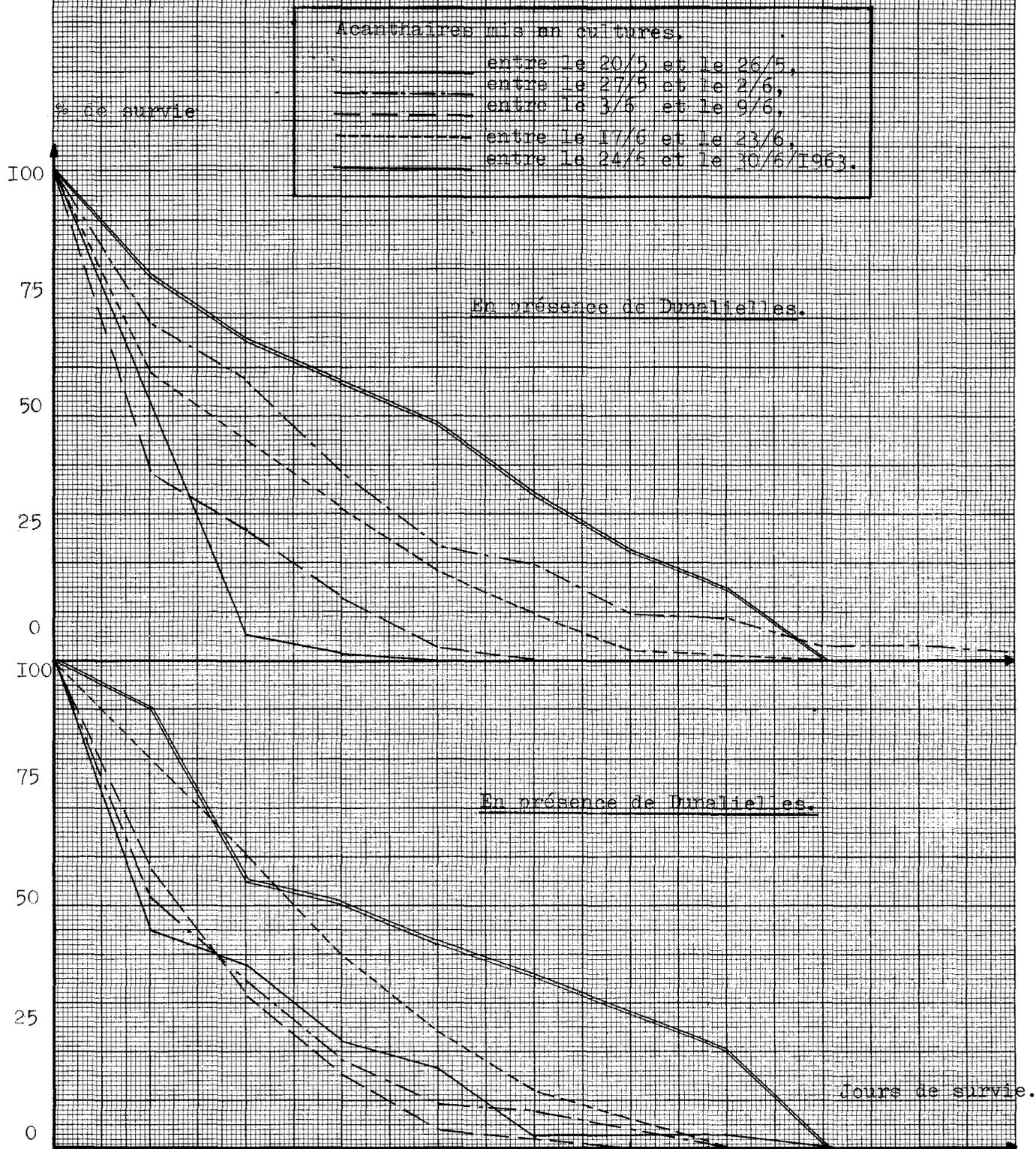


Fig. 7. (suite) - 3e série d'essais. Effet de la date de mise en élevage sur la survie des Acanthaires soumis au balancement et éclairés en permanence.

Acanthaires mis en cultures.	
—	entre le 20/6 et le 26/5,
—	entre le 27/5 et le 2/6,
—	entre le 3/6 et le 9/6;
- - -	entre le 17/6 et le 23/6;
—	entre le 24/6 et le 30/6/1963.

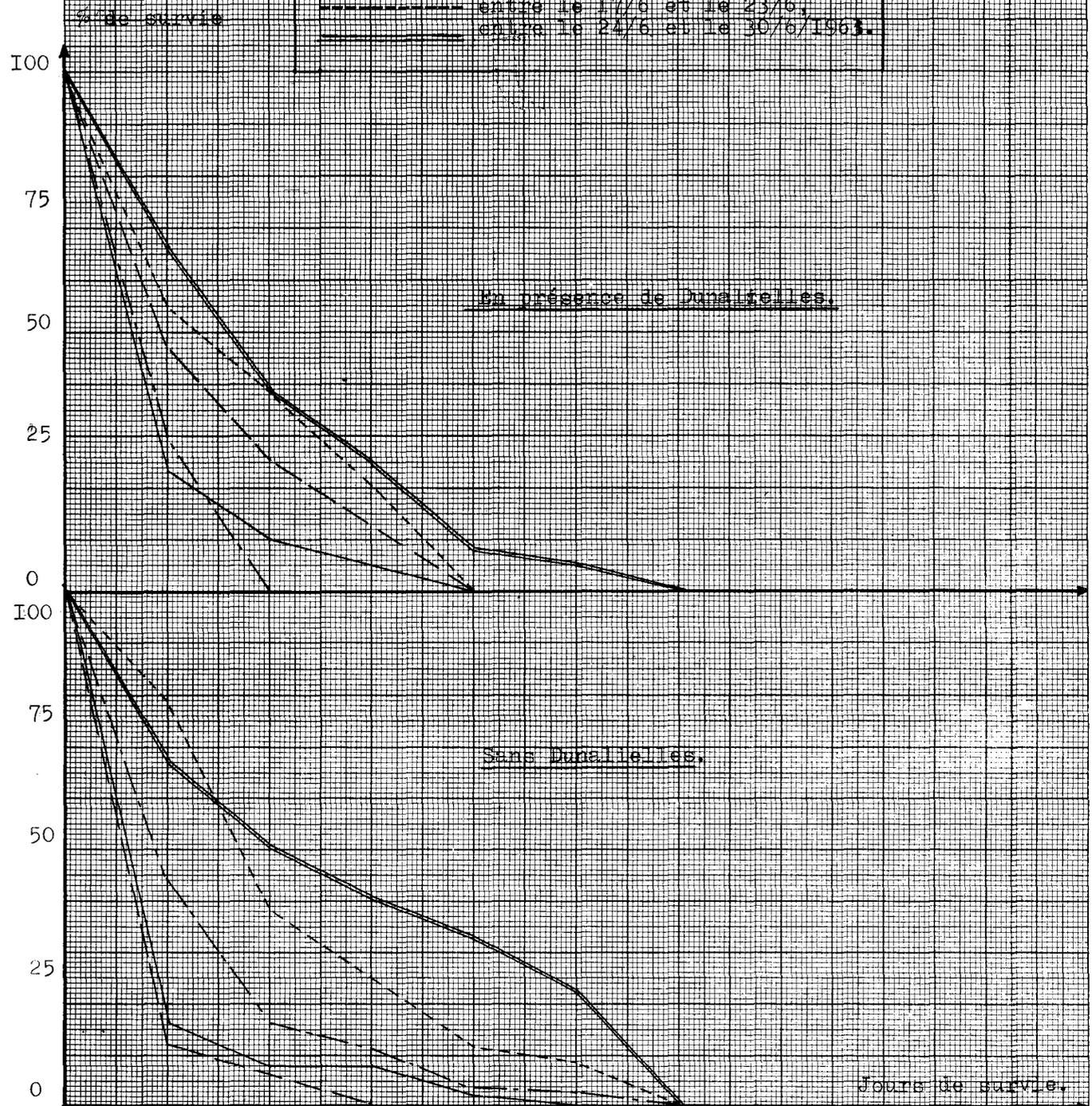


Fig. 8. - 1^{re} série d'essais - Manque d'effet de la pêche par le procédé Cachon, sur la survie des Acarinaires en culture.

Elevages immobiles, éclairés en permanence et maintenus à 13°C., avec un renouvellement d'eau par 24 heures.

— 1^{re} série d'essais (pêche normale).
 - - - 2^e série d'essais (pêche normale).
 - - - 3^e série d'essais (pêche par le procédé Cachon).

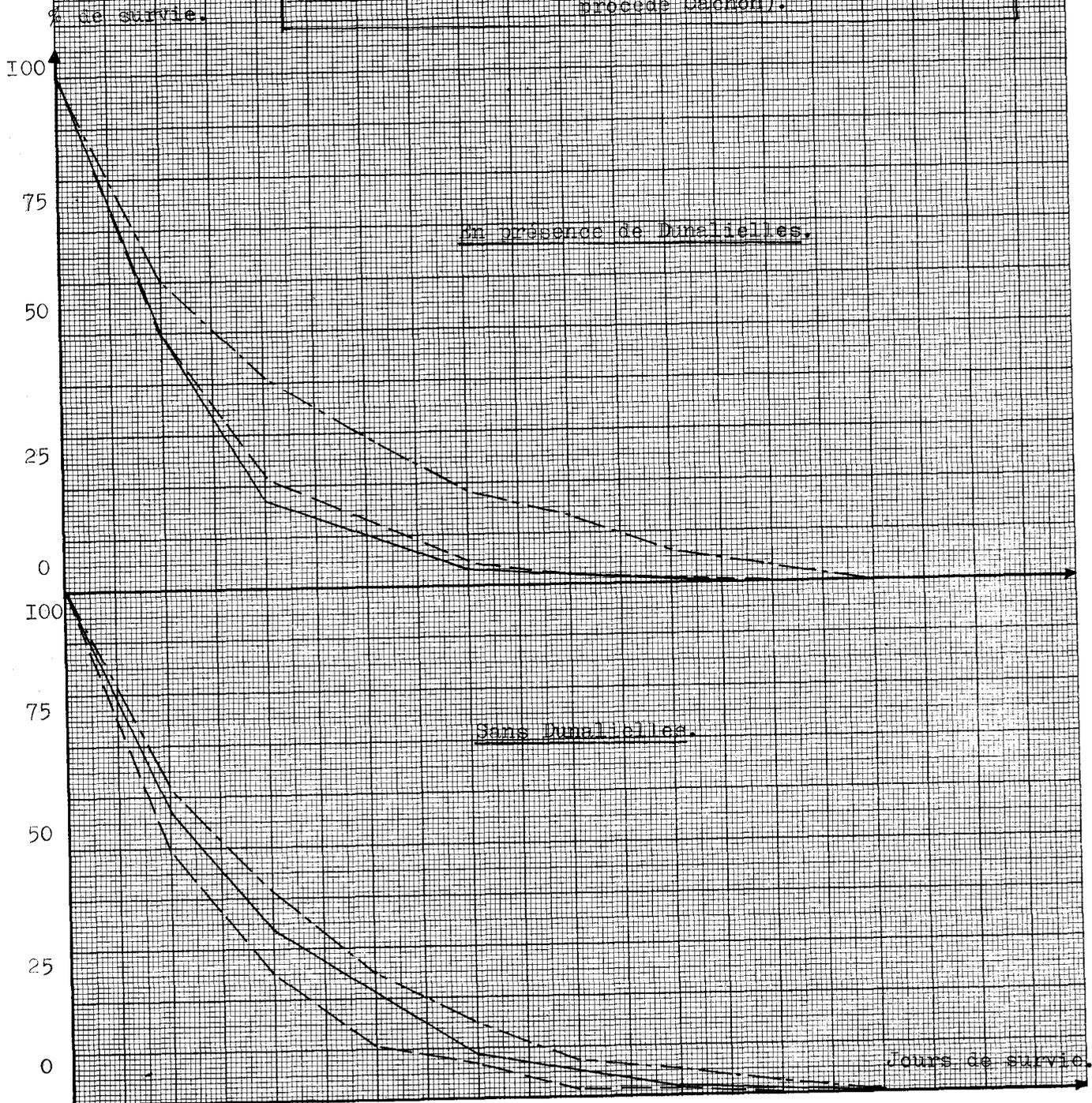


Fig. 9. - 4e série d'essais - Effet de la température sur la survie d'Acanthaires en cultures immobiles, sous éclairage permanent.

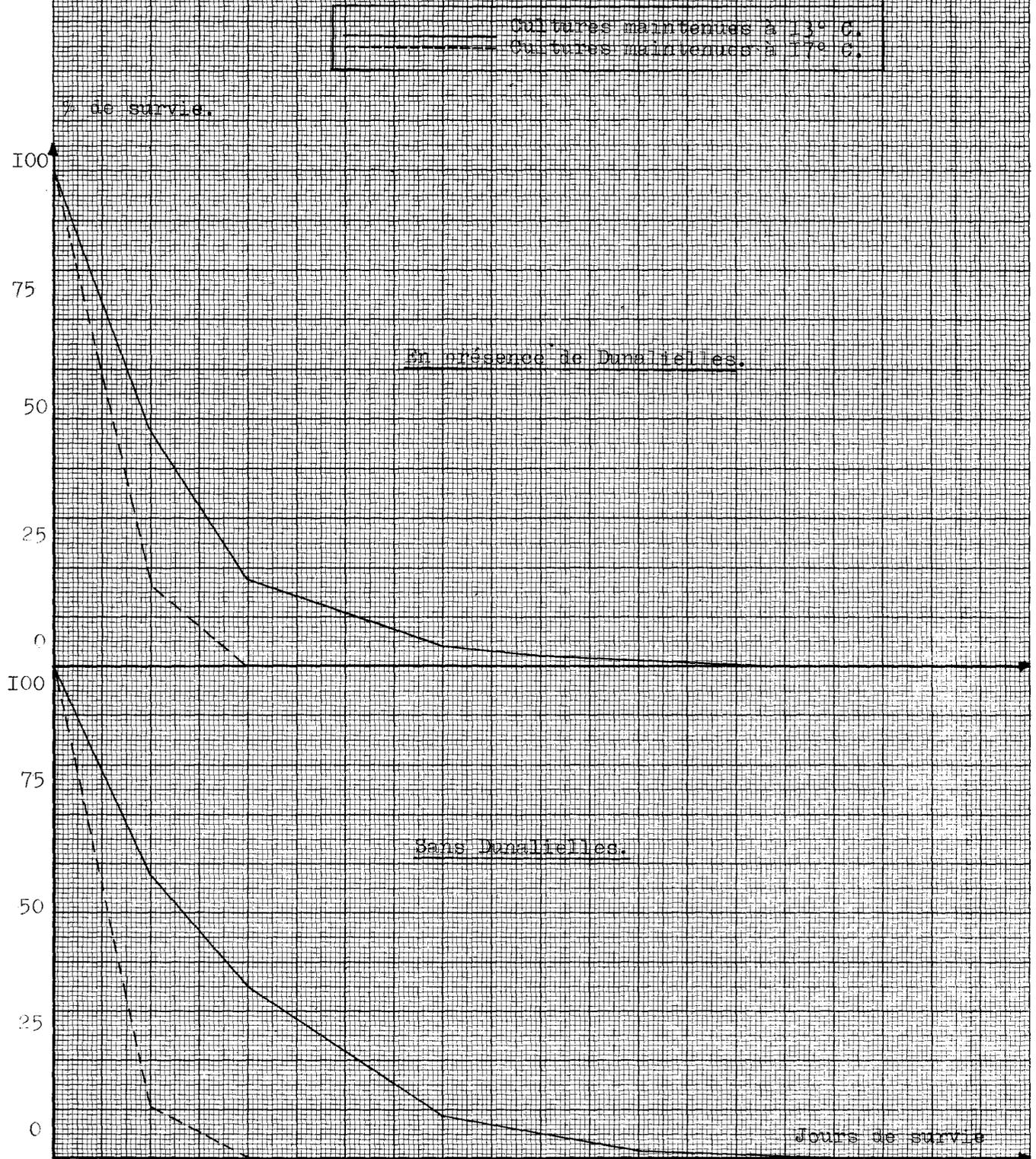


Fig. 10. - 4e série d'essais - Influence de la présence des Dunalielles sur la survie des Acanthaires en cultures immobiles, éclairées en permanence.

— Cultures avec Dunalielles.
- - - Cultures sans Dunalielles.

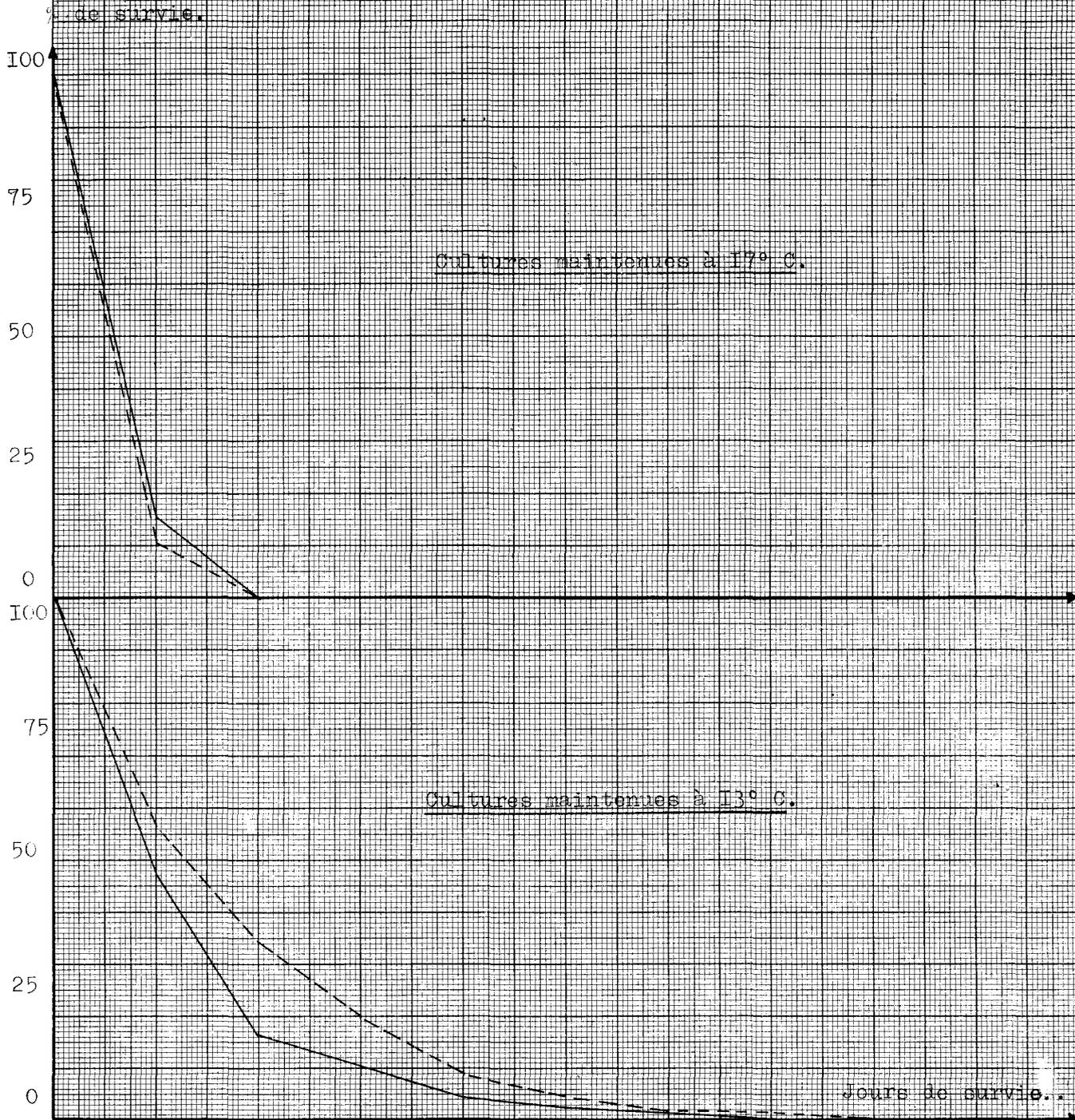
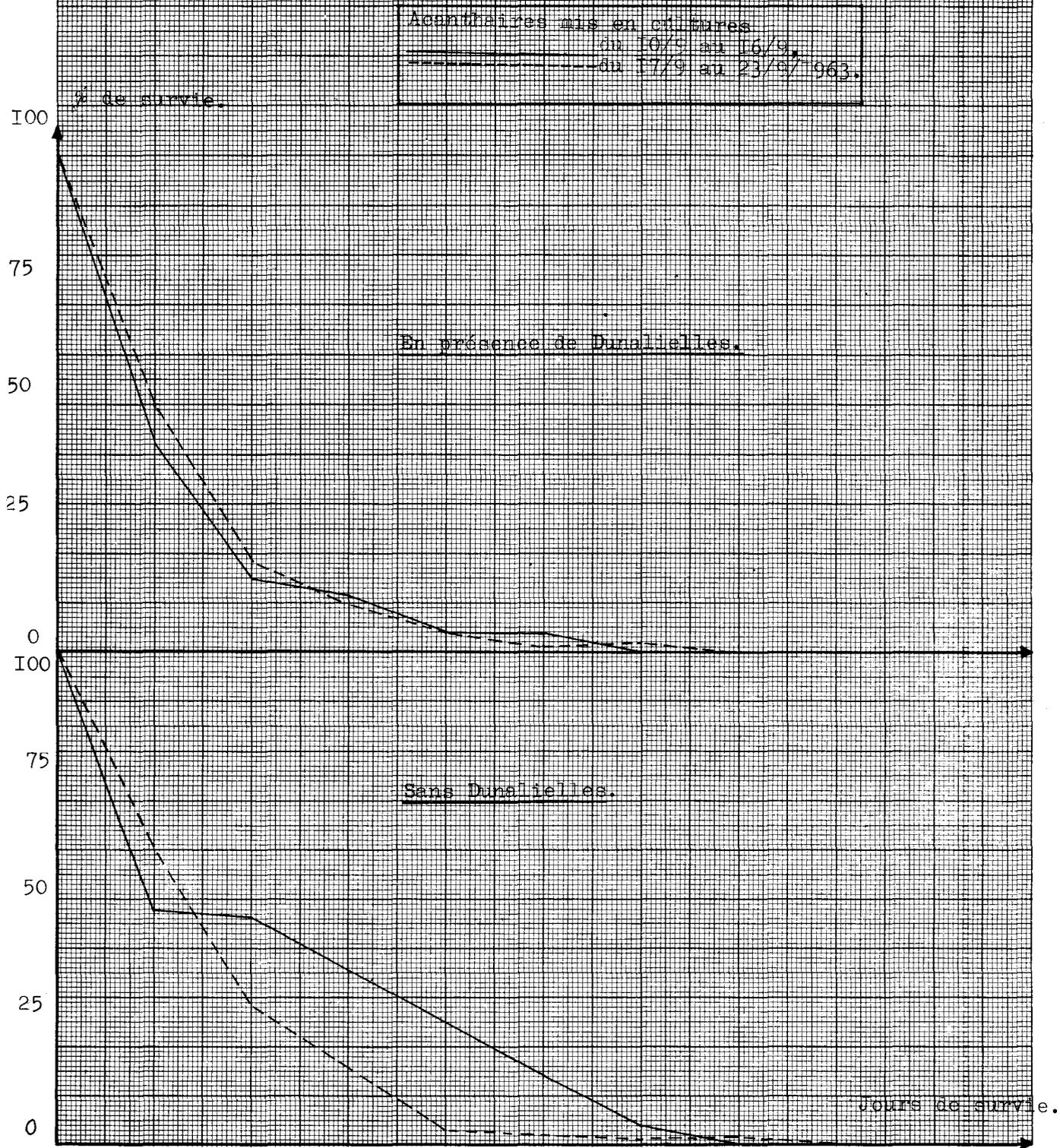


Fig. 11. - Le sérum d'œufs. Effet de la date de mise en culture sur la survie d'Acartulaires maintenus à 15°C, sous éclairage permanent, et immobiles.



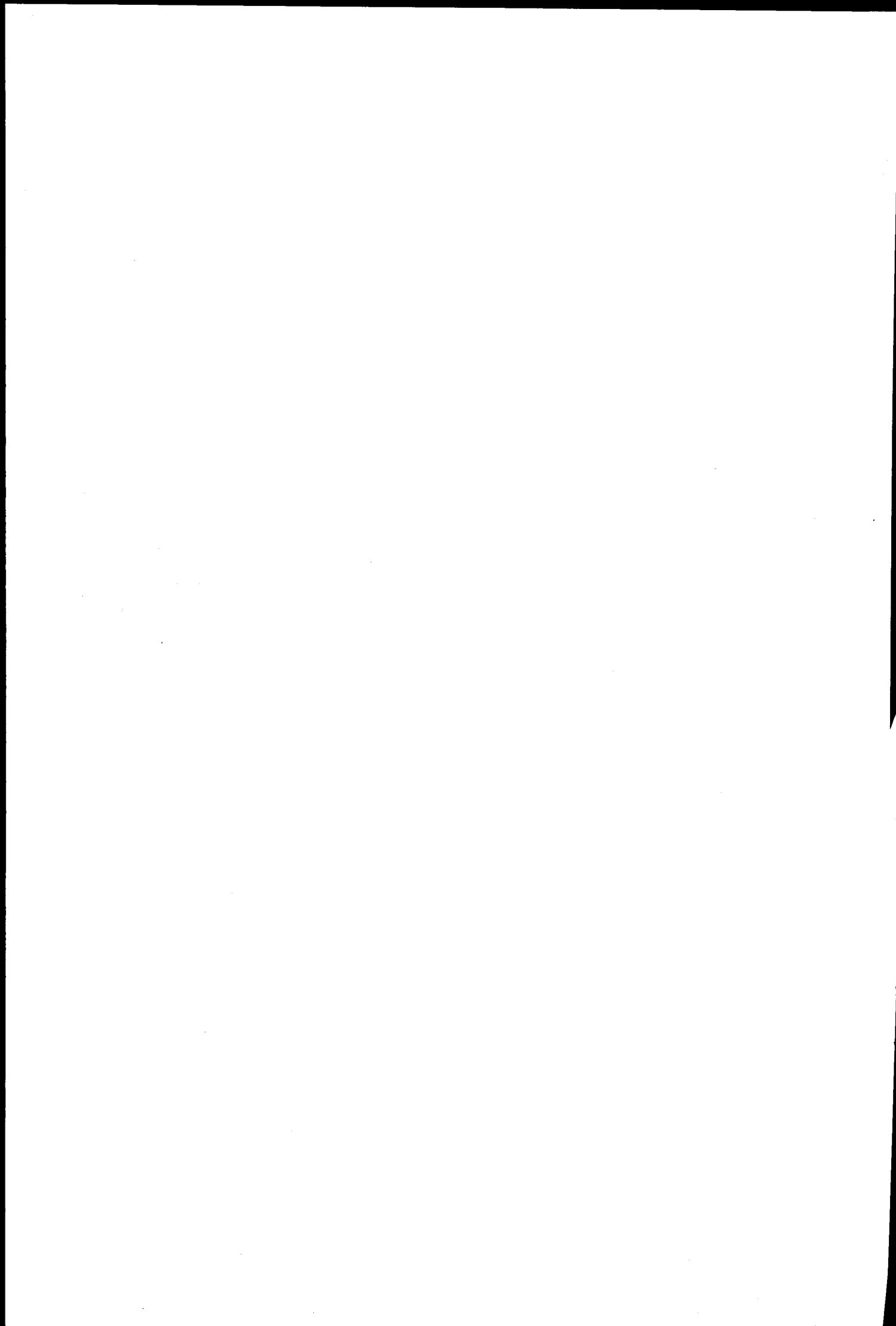


Fig. 13

Acanthostaurus sp.

Coupe intéressant le centre géométrique de l'individu: on voit nettement le centroplaste et des fragments de certaines matrices spiculaires qui en rayonnent. En outre, la figure montre l'endoplasme (avec de nombreuses vacuoles, et des noyaux surtout périphériques fortement colorés) jusqu'à la pellicule interne. Coloration : Mann-Dobbell biacide.

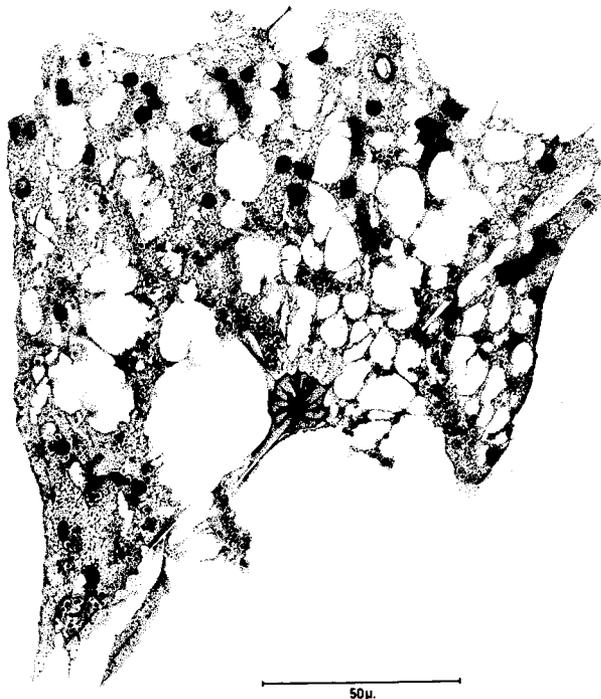


Fig. 14

Phyllacanthé indéterminé.

Détail d'une coupe, montrant la région centrale de l'endoplasme, avec le centroplaste moulé autour des bases spiculaires (qui ont disparu par dissolution), et d'où rayonnent des matrices spiculaires.

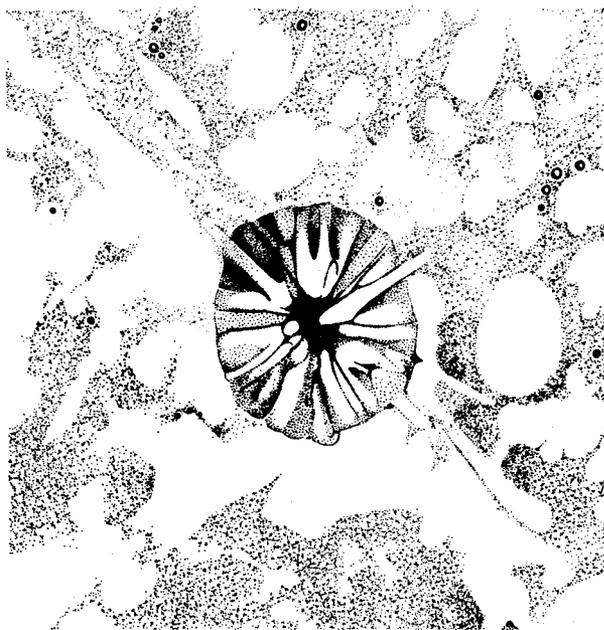


Fig. 15

Sphénacante indéterminé.

Section montrant l'ensemble de l'organisation de l'individu. De l'extérieur vers l'intérieur: pellicule externe (avec quelques filets d'ectoplasme at-tenants) et 2 couronnes de myonèmes, région ectoplasmique (optiquement presque vide), pellicule interne, en-doplasme (avec vacuoles et nombreux noyaux sombres). Au centre, le cen-troplaste réduit, stelliforme, d'où rayonnent les matrices spiculaires (l'une d'entre elles pouvant être suivie jusqu'à la pellicule externe).



Fig. 16

Xiphacantha alata.

Individu anormal: un spicule (le plus long sur la figure) présente, à un endroit, 8 ailes au lieu de 4 (Détail de cette région, en perspective et en section transversale, dans le coin gauche inférieur du dessin).

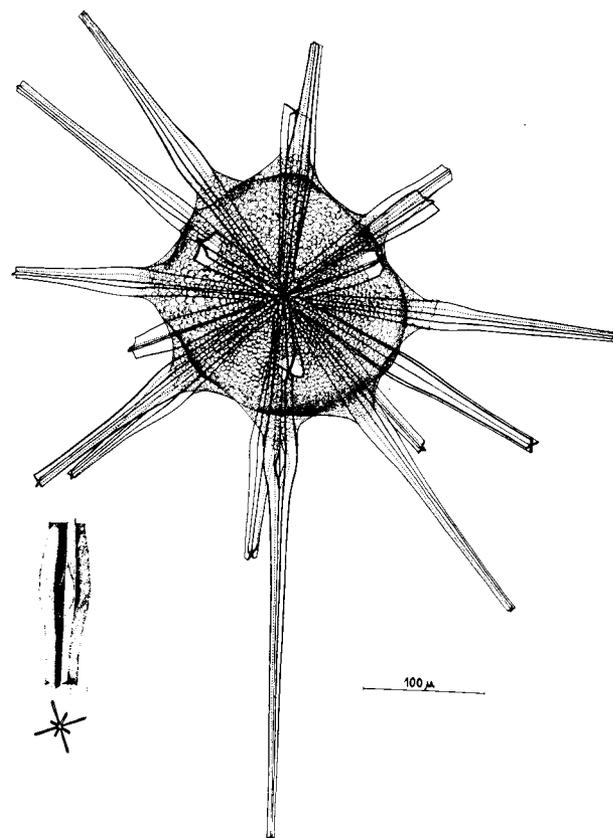


Fig. 17

Acanthometra pellucida.

Individu anormal: l'un des spicules (le plus court sur la figure) porte une apophyse latérale.

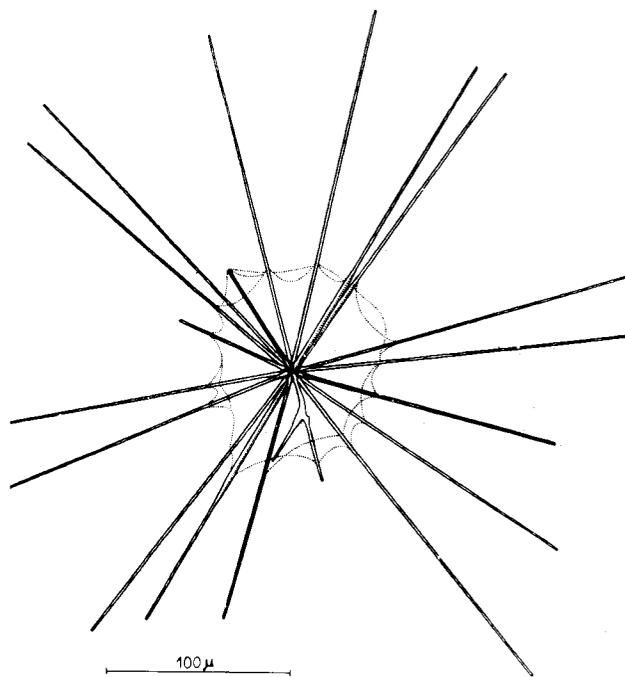


Fig. 18

Stauracantha candelabrum.

n. sp.

Squelette.

Dans le coin gauche inférieur: détail d'un spicule au niveau des apophyses.

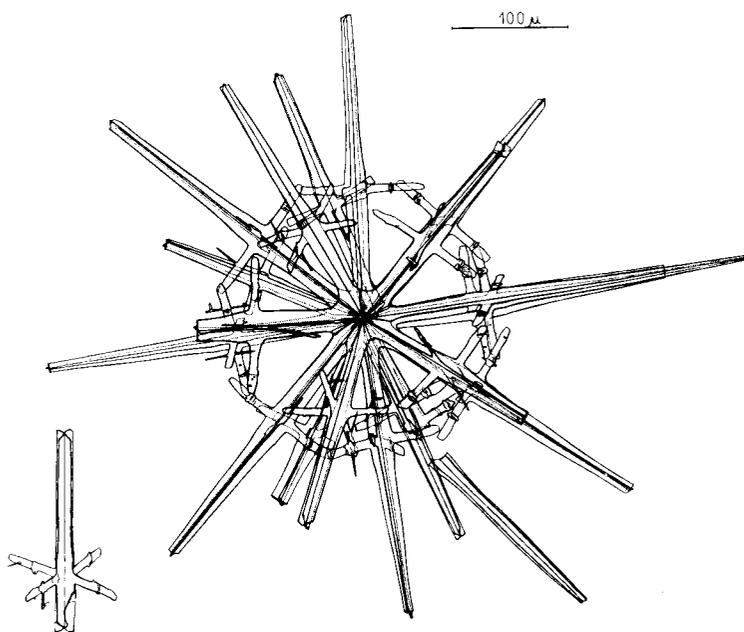


Fig. 19

Phyllostaurus siculus var.
quadrifolius.

Parasité par un individu jeune
(encore mononucléé) d'Amoe-
bophrya acanthometrae
(Dinoflagellé).

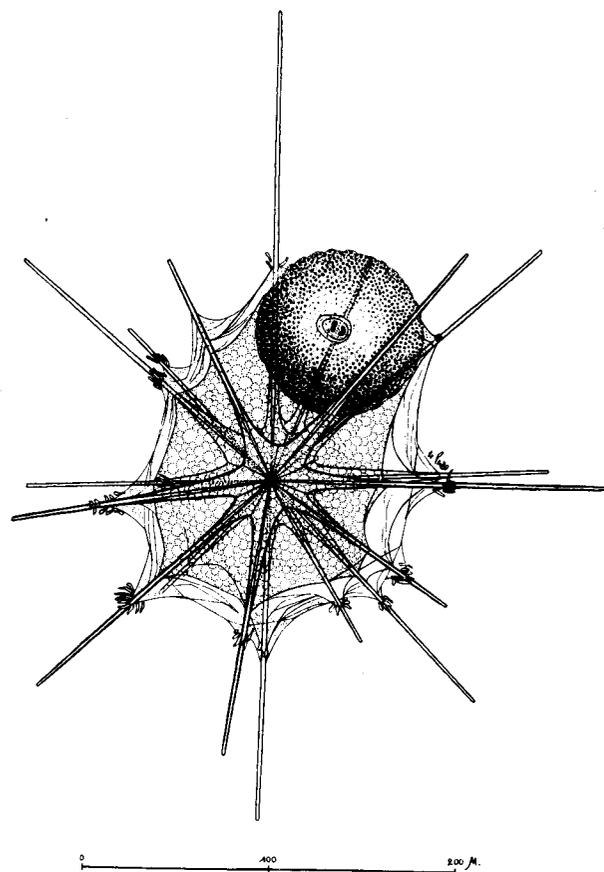


Fig. 20

Gigartacon muelleri

En cours d'enkystement. Les spi-
cules se dissolvent à partir du
sommet, et des pastilles (de Sr
SO₄?) sont mises progressivement
en place pour former l'enveloppe
du kyste.

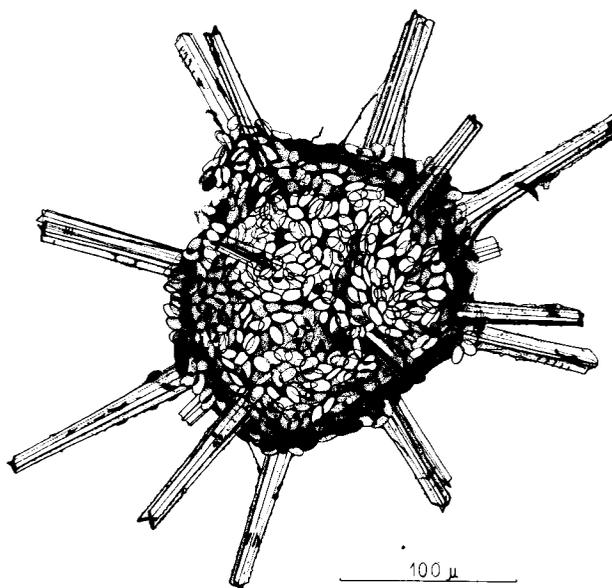


Fig. 21

Gigartacon fragilis

Kyste (variété allongé). Spicules rabattus tous dans la même direction. Des axopodes émergent encore de la région où se trouvait l'endoplasme de l'individu avant l'enkystement.

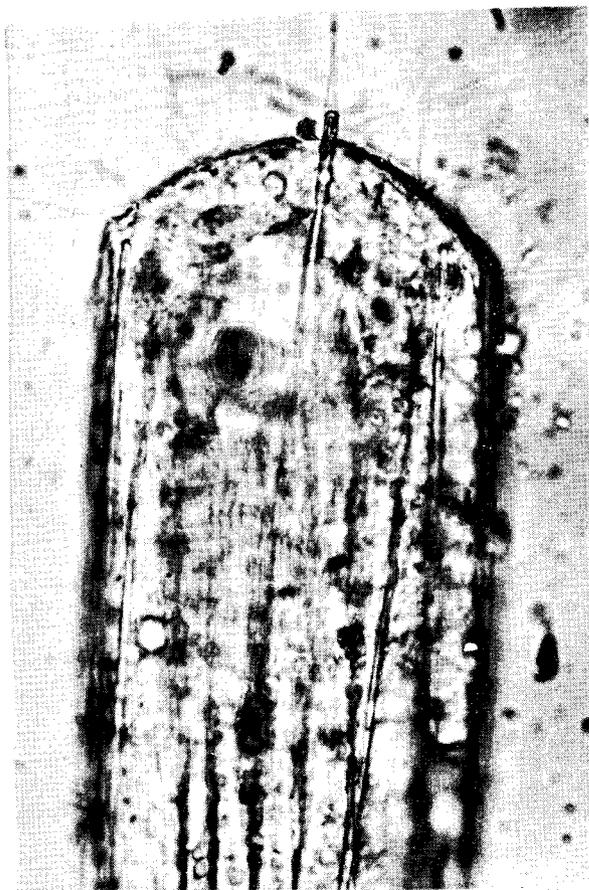


Fig. 22

Dolichochiasma lanceolatum

n. g., n. sp.
Extrémité du kyste en formation,
avec les spicules tous rabattus
du même côté.

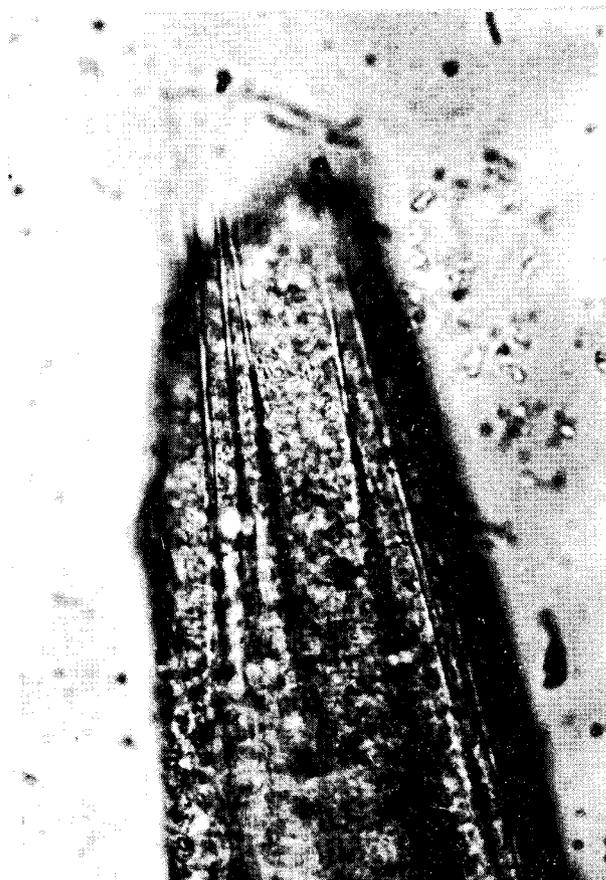


Fig. 23

Section schématique au travers d'un Acanthaire typique (Sphénacanthé), pour montrer la disposition et les rapports réciproques des pellicules et du système centroplastique. (seul un secteur de la section est représenté).

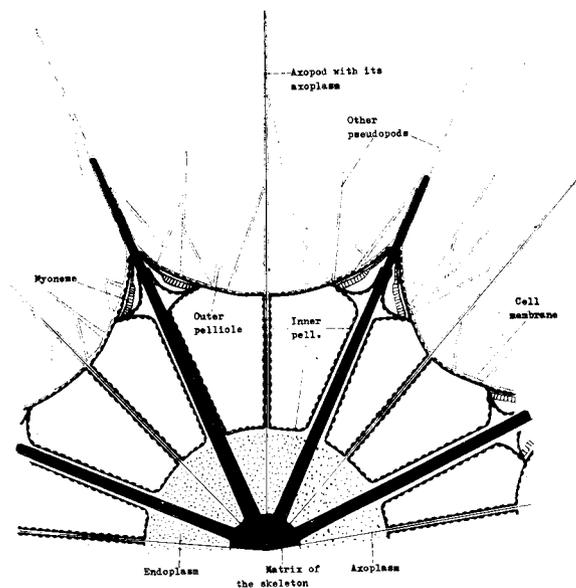


Fig. 24

Ultracoupe tangentielle au travers de la pellicule externe de Haliomatidium muelleri. X 16. 000.

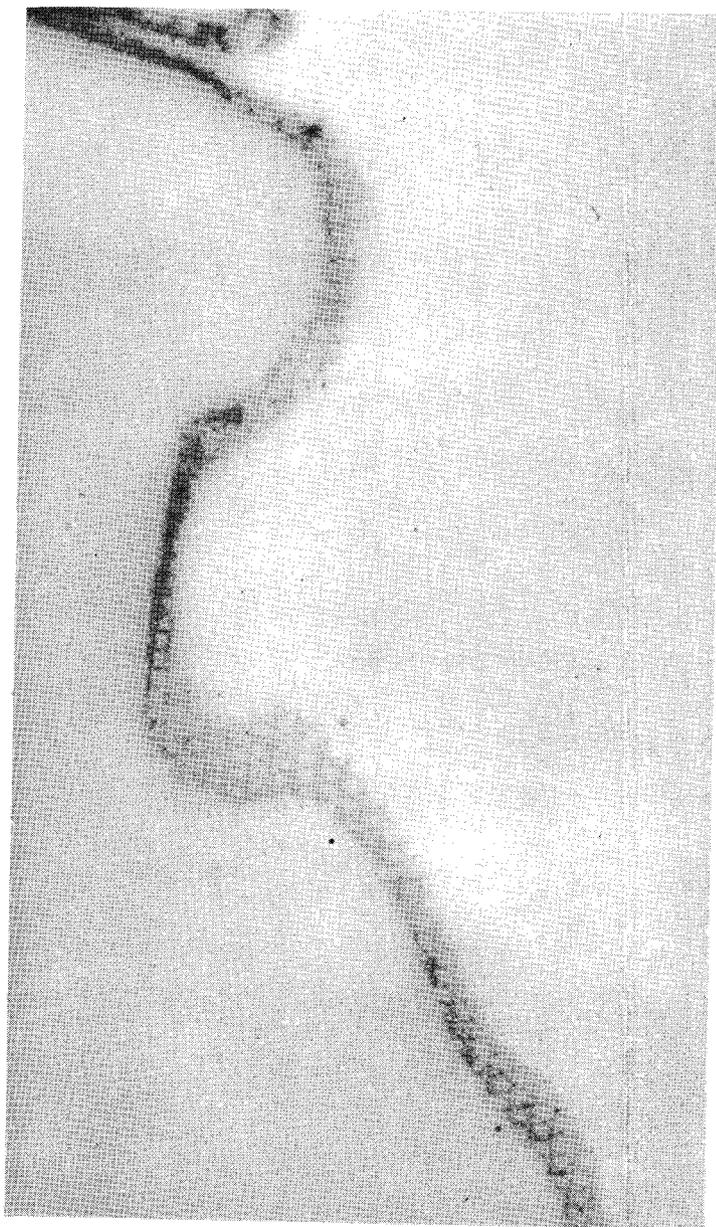


Fig. 25.

Acanthometra pellucida

traité 3 heures par $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ ($10\mu\text{c}/\text{ml}$). Sont marqués: la pellicule externe et, dans le massif cytoplasmique photographié, surtout la région de la matrice spiculaire.
X 600.
(Exposition : 50 jours).



Fig. 26

Acanthometra pellucida

(même traitement). Marquage important des algues symbiotiques du cytoplasme périphérique.
X 600.
(Exposition : 50 jours).

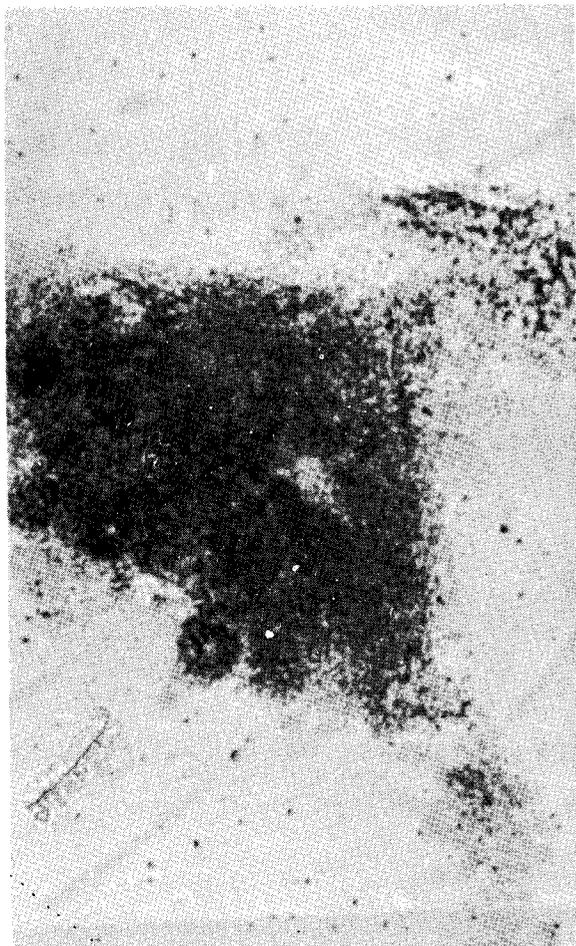


Fig. 27

Phyllostaurus siculus

(même traitement que les spécimens précédents).

Marquage surtout dans la partie centrale de l'endoplasme, autour de la jonction des spicules, et sur la pellicule externe, principalement aux points de sortie des spicules. X 600. (Exposition : 50 jours).



Fig. 28

Individu indéterminé traité par $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ ($10\mu\text{c}/\text{ml}$) pendant 1 heure. Exposition de 9 jours. Faible marquage seulement en certains endroits de la pellicule externe. X 150.

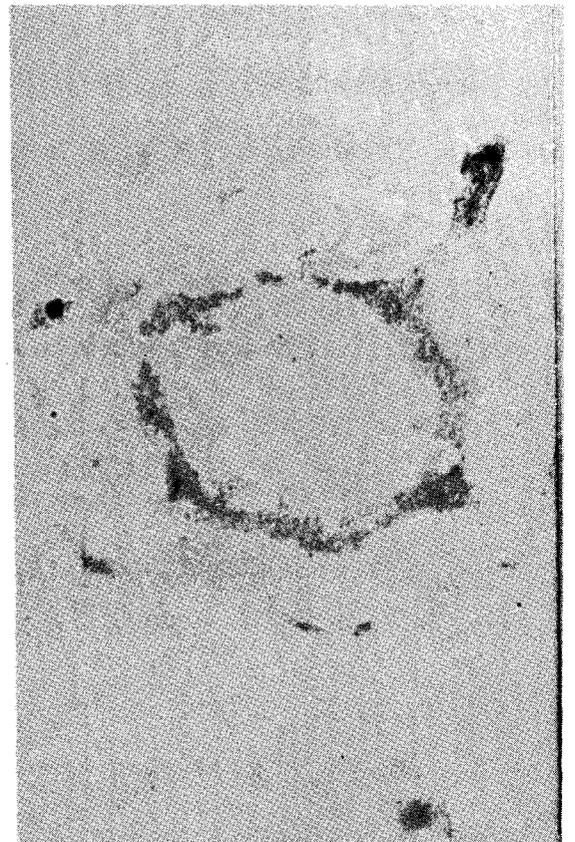


Fig. 29

Individu indéterminé traité par la cystéine- S^{35} ($20\mu\text{c}/\text{ml}$) pendant 1 heure. Marquage léger et uniforme dans toutes les parties du cytoplasme. X 600.

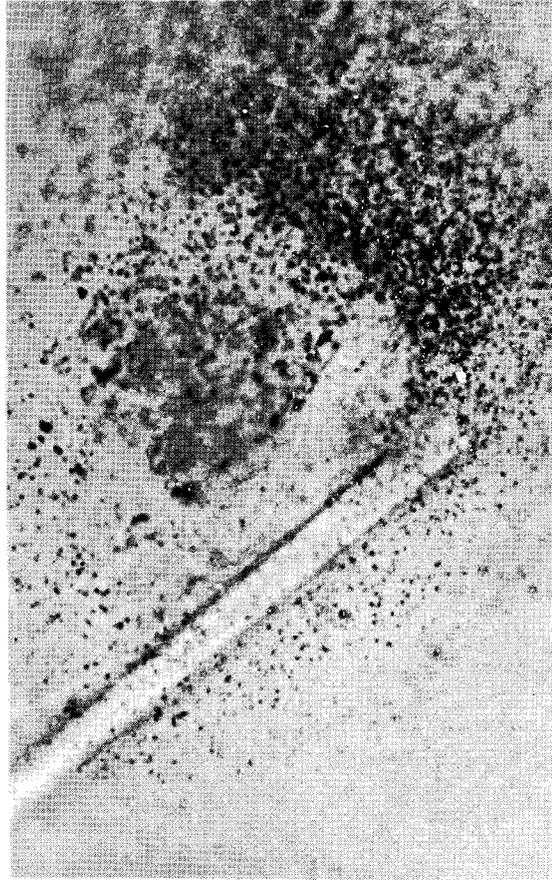


Fig. 30

Individu indéterminé traité pendant 2 heures par la cystéine- S^{35} ($10\mu\text{c}/\text{ml}$). Marquage violent de la pellicule interne et des parties adjacentes de l'endoplasme. X 150.



Fig. 31

Individu indéterminé traité pendant 1 heure par la cystéine- S^{35} ($20\mu\text{c}/\text{ml}$). Marquage léger et uniforme dans toutes les parties de l'endoplasme et de l'ectoplasme. X 150.

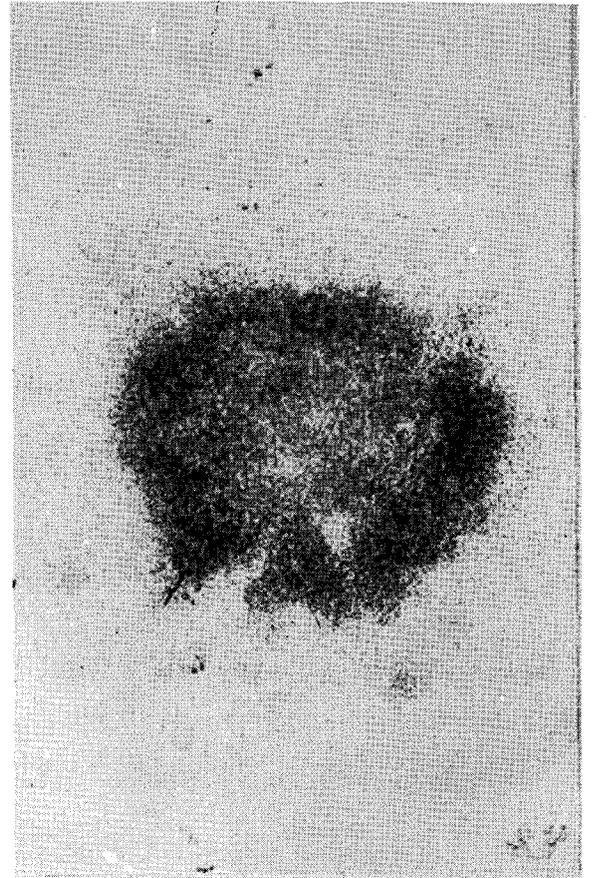


Fig. 32

Phyllostaurus cuspidatus

traité par la cystéine- S^{35} pendant 1 heure ($10\mu\text{c}/\text{ml}$). Marquage très léger sur les 2 pellicules, presque nul ailleurs. Les grosses formations opaques et anguleuses sont des fragments de squelette (non marqués). X 150.

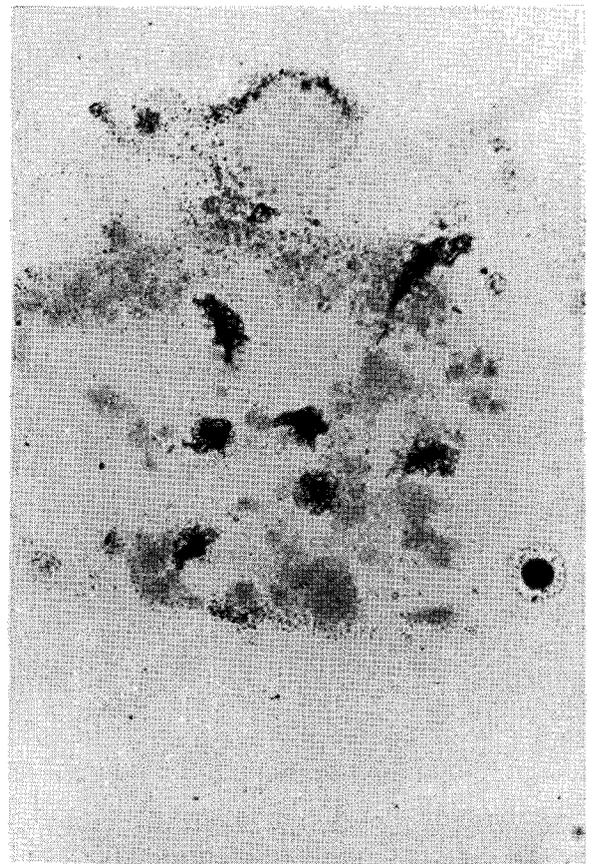


Fig. 33

Individu indéterminé (sur la photo : un secteur de la section seulement), traité par de la méthionine- S^{35} ($20\mu\text{c/ml}$) pendant 1 heure. Marquage important de la pellicule interne et de diverses zones de l'endoplasme. X 600.

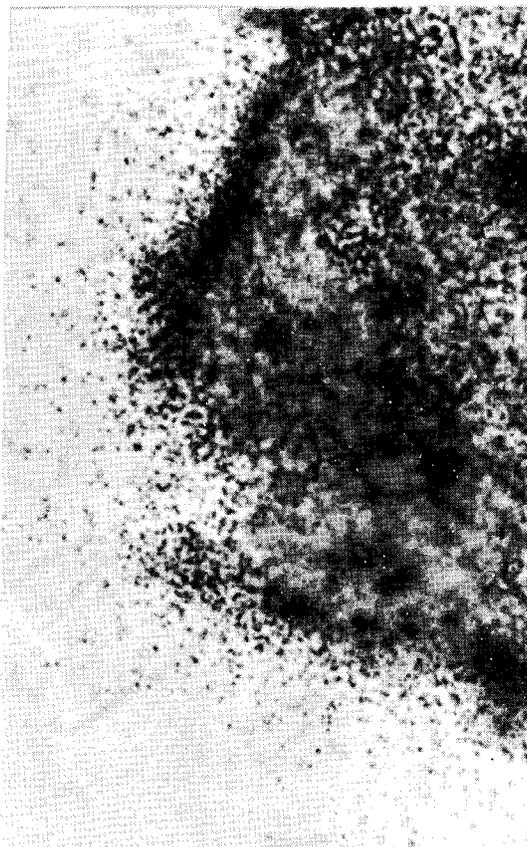


Fig. 34

Phyllostaurus cuspidatus

traité par la méthionine- S^{35} ($10\mu\text{c/ml}$) pendant 1/2 heure. Marquage moyen et assez uniforme de toutes les parties du cytoplasme.



Fig. 35 et 36

Individu indéterminé traité par la cystine- S^{35} ($10\mu\text{c}/\text{ml}$) pendant 1 heure et demie. Le spicule sur la photo est beaucoup plus marqué que les autres zones de l'animal d'où l'hypothèse d'une absorption de cystine par le squelette.

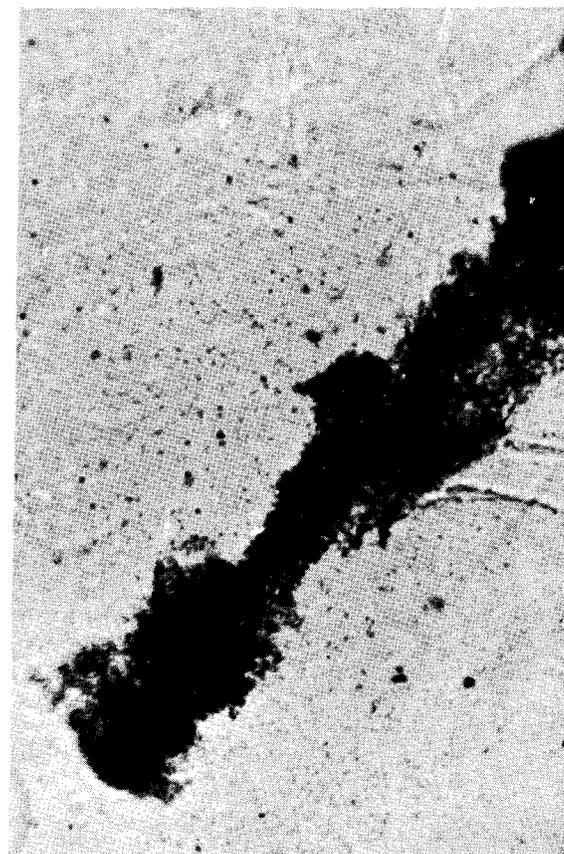
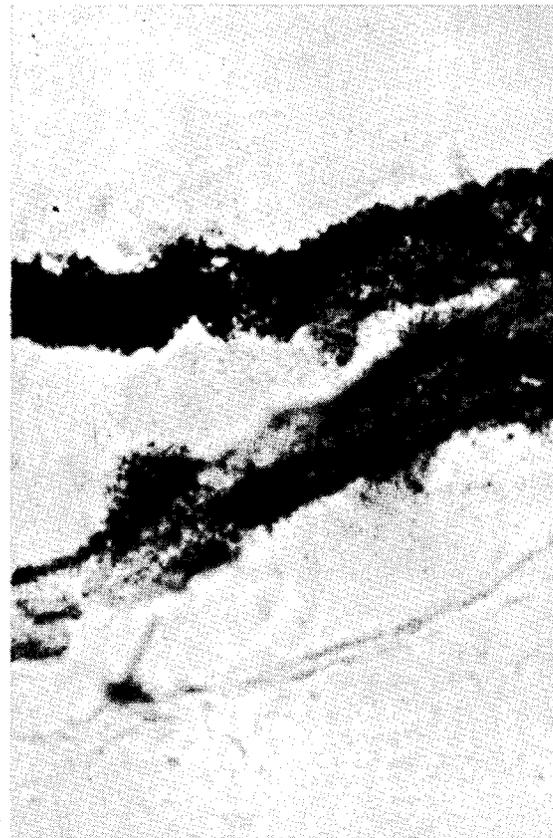
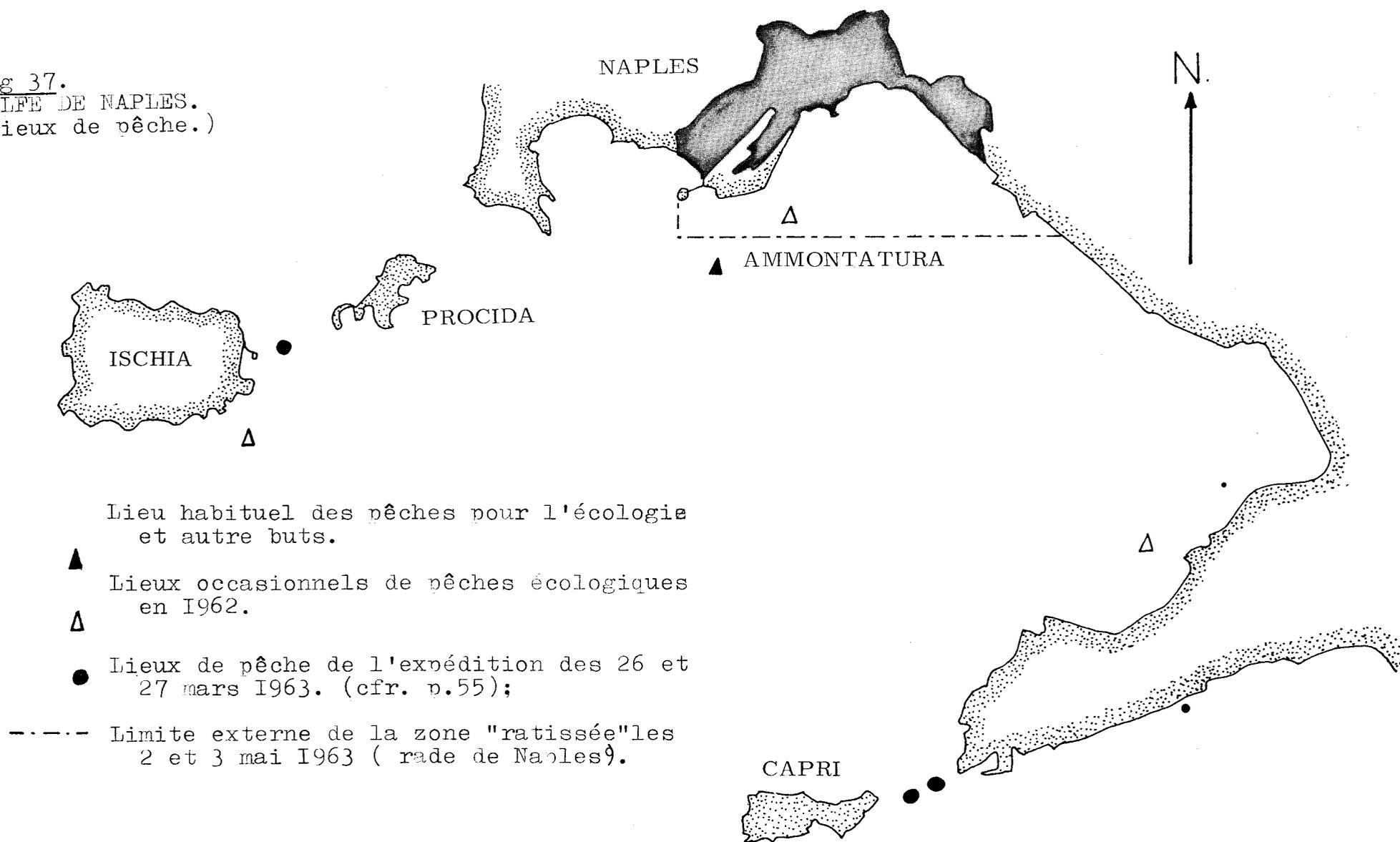


Fig 37.
 GOLFE DE NAPLES.
 (Lieux de pêche.)



Lieu habituel des pêches pour l'écologie
 et autre buts.



Lieux occasionnels de pêches écologiques
 en 1962.



● Lieux de pêche de l'expédition des 26 et
 27 mars 1963. (cfr. p.55);

----- Limite externe de la zone "ratissée" les
 2 et 3 mai 1963 (rade de Naples).

