

**Pollution marine
Embryologie expérimentale**

**ÉTONNANTES POSSIBILITÉS D'ADAPTATION
DE LA LARVE D'ASCIDIE EN MILIEU POLLUÉ**

par

Jacques BOUCHARD

et Christiane BOUCHARD-MADRELLE¹

Nous avons travaillé dès les années 60 sur les hydrocarbures poly-aromatiques et le tabac chez le Professeur R.M. MAY. En parallèle, l'idée d'utiliser les ascidies comme matériel expérimental nous fut suggérée plus tard par J. CUZIN, Ingénieur en Chef au SEITA. Avec l'œuf d'ascidie, nous avons travaillé en toute indépendance vis-à-vis de la Régie des tabacs ; notre expérimentation s'est poursuivie durant plusieurs saisons grâce à l'hospitalité estivale de la Station maritime de Villefranche-sur-Mer (Dir. P. BOUGIS).

Ciona intestinalis et *Phallusia mammillata* ont été récoltées essentiellement dans le port de la Darse de Villefranche qui, comme bien d'autres, était notoirement pollué par toutes sortes de perturbateurs chimiques dus au lessivage des terrains côtiers, mais aussi aux perturbateurs intrinsèques, huiles et hydrocarbures propres à l'activité maritime et produits de décomposition biologique dépendant des peuplements aquatiques. On sait depuis longtemps (KENNAWAY et LINDSEY, 1958 ; et cahiers internes du SEITA, J. CUZIN) que les produits de pyrolyse du tabac sont extrêmement diversifiés et que nombre d'entre eux, en particulier bien des hydrocarbures, sont les mêmes que ceux que l'on trouve aussi dans tous les milieux continentaux ou aquatiques affectés par des phénomènes de pyrolyse naturels ou non.

Les œufs peuvent être obtenus par fécondation croisée dans le cas de *Ciona* et autofécondation avec *Phallusia*. Il faut environ 24 heures pour observer des larves « têtards », lesquelles se métamorphosent en général 24 heures plus tard entre 15 et 18 degrés. Ce qui dépend très étroitement des cellules testales. Et toute l'organogenèse, particulièrement démonstrative, ultra rapide, est clairement analysable au microscope. Ce point fait la richesse de ce remarquable matériel biologique d'analyse (matériel assez

1. Rue Saint Nicolas, 91940 Gometz-le-Chatel (bouchard-madrelle@dbmail.com)

Bulletin de la Société zoologique de France 143 (1)

bien utilisé en France, essentiellement à Villefranche et que les chercheurs asiatiques exploitent aussi intensément – LIU *et al.*, 2006).

Des milliers d'œufs sont répartis dans des boîtes de Pétri contenant ou non des goudrons de tabac en concentrations connues. Par ailleurs, d'autres substances peuvent être ajoutées pour tenter de modifier les effets du tabac. On fait ainsi des batteries expérimentales qui permettent un très grand nombre de comptages échelonnés sur des périodes relativement brèves. La toxicité du tabac est évaluée sur au moins 48 heures, mais les observations peuvent se prolonger durant plusieurs jours jusqu'à la formation de petites ascidies anatomiquement caractérisées et fonctionnelles.

Notre étude vise d'abord à souligner la remarquable valeur du matériel biologique, puis à montrer qu'il conduit, du point de vue expérimental, à des résultats embryologiques étonnants et, troisième point, nous tenterons une réflexion nouvelle, de nature écologique.

Mots-clés : embryon ascidie ; cellules testales ; goudrons de tabac ; pollution marine ; toxicité-hydrocarbures ; phénomènes compensatoires.

Surprising adaptative life of ascidian larvae in polluted harbours

Ascidian egg is a biological material highly suited to experiments with tobacco. Be that as it may, working for a long time on polyaromatic hydrocarbons (PAH) with mice, it seems to be absurd to question about tobacco-tar effects on marine species... But, whatever it can be said, first experiments with ascidian egg are clearly encouraging to do so! Long ago, we have been supported by J. CUZIN, Biologist and Chief Engineer of SEITA, and by Dr R.M. MAY, in charge of our thesis supervision.

It is well known that many toxic products, PAH for example, are widespread in harbors. Being rich in PAH, tobacco-tar toxicity can be methodically evaluated using ascidian eggs, which constitute a very convenient material. In other respects, after some initial success, we used different biological substances in an effort to compensate the metabolic effects of tobacco tar.

Our first results were published long ago, between 1962 and 1966, using eggs of *Ciona intestinalis* (Ruph.) and *Phallusia mammilata* (Cuv.). The results presented here complement and strongly diversify and extend those of the previous studies.

Normal and treated eggs have been studied 1) directly for microscopic counting, 2) with histological methods, 3) with electronic microscopy, 4) by video imaging, a movie has been made to study normal development and, in other respect, with time-lapse method (undercranking).

In this text, we describe effects observed after simultaneous combination of two products: 1) the weaker tobacco tar concentration, which clearly allows the beginning of abnormal organogenesis and 2) increasing concentrations of a test product, that is supposed to interfere with tobacco tar.

The results indicate a remarkable susceptibility of ascidian embryos depending on substances we used at different concentrations in the hope to reduce tobacco toxicity. The results have been described in this text, and they are completed with main graphs and main photographs. The aminoacids, glycine and particularly arginine allow sub-normal development and metamorphosis, as can do glucose or well-known vitamins. It is clear that chemical benefits can clearly depend on extra-embryonic phenomena, which seem to depend on intervention of test cells.

It must be emphasized that the species studied can support strong chemical pollution encountered in harbours. This ability seems to depend on test cells, curiously called "accessory" cells. These can play a part not only during oogenesis, as it has been described by one of us (C.B.-M., 1982, electron microscopy), but also during morphogenesis of larvae.

Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué

As a conclusion, it can be inferred from the clear and surprising activity of the "accessory" cells, closely in constant motion around the embryo, as we observed using time-lapse photography, that the test cells install a chemical barrier and probably a chemical trophic system capable of reducing the toxic effects of sea pollutants.

Keywords: ascidian egg; test cells; marine pollution; hydrocarbons and tar toxicity; compensatory phenomena.

Préambule

Analyse des circonstances qui ont conduit à cette expérimentation

L'œuf d'ascidie est un extraordinaire objet d'expérimentation durant l'organogénèse : c'est un matériel hautement réactif qui est, a posteriori, plus pratique que l'œuf d'oursin, les cultures de tissus ou l'embryon de Vertébré.

Ce matériel biologique, actuellement très exploité du point de vue génétique, permettrait vraisemblablement une multitude d'approches expérimentales dans d'autres domaines – par exemple, de façon assez générale, pour l'étude des pollutions marines impliquant des agents chimiques toxiques.

Faire agir les agents toxiques du tabac sur l'embryon d'ascidie peut apparaître absurde... mais ça n'est pas une gageure. C'est un test expérimental parmi d'autres. Mais pourquoi penser au tabac ?

Le tabac ? L'un de nous (J.B.) l'avait déjà fait agir expérimentalement sur le poumon de souris ; et nous avons minutieusement détaillé son pouvoir antimitotique en soulignant non seulement les défauts de migration, mais aussi les « troubles chromosomiques » observés qui conduisent à la lyse cellulaire.

Par ailleurs, lors d'un séjour au Laboratoire Arago à Banyuls, C. MONNIOT, spécialiste des ascidies, avait attiré notre attention sur ce groupe un peu négligé durant les études universitaires ; il y avait cependant beaucoup à dire sur leur diversité écologique et sur la résistance de certaines espèces à la pollution, en particulier au voisinage des ports ou même dans les ports. Nous avons là une sollicitation implicite. Ainsi, parmi des foules de substances rejetées en mer par l'activité humaine, il y a, par exemple, des hydrocarbures ; or les hydrocarbures répertoriés après pyrolyse du tabac sont souvent les mêmes et sont bien connus des spécialistes. Pourraient-ils induire en laboratoire des troubles cellulaires et prolifératifs remarquables si on les faisait agir sur des espèces d'ascidies présumées résistantes aux pires conditions et, en particulier, lors de leur reproduction ? C'est J. CUZIN, Ingénieur en chef au SEITA, profondément inquiet de connaître les divers effets du tabac, qui nous a aussitôt encouragés dans cette voie. Pour R.M. MAY, le directeur de recherche de l'un de nous (J.B.), cela pouvait constituer ce qu'il appelait « une seconde thèse » – comme il en existait encore en ces temps lointains. Durant plusieurs séjours d'été à la Station de Villefranche, nous avons alors testé la résistance de l'œuf d'ascidie soumis aux effets inattendus de condensats de fumée fournis par la Régie. Ainsi, nous avons publié entre 1962 et 1966 à deux, J. BOUCHARD et C. BOUCHARD-

Bulletin de la Société zoologique de France 143 (1)

MADRELLE ou avec R.M. MAY, quelques résultats de base cités dans notre bibliographie. Cela constituait un ensemble préparatoire où nous constatons que les œufs de *Ciona intestinalis* (Ruph.) ou de *Phallusia mammillata* (Cuv.) étaient bel et bien un matériel très pratique, aux réactions extrêmement nuancées lors d'agressions toxiques.

Ce qui suit est une réflexion complémentaire, une mise au point tardive portant sur de nombreuses expériences anciennes toutes orientées vers un même but, mais non publiées. Ainsi, nous avons constaté, lors de circonstances expérimentales plus ou moins fortuites, qu'il était possible de compenser partiellement certains effets d'agents toxiques sur l'œuf d'ascidie. Par exemple, l'adénine ou l'hypoxanthine compensaient clairement, durant le développement de l'œuf, les violents effets de la 6-mercaptopurine, connue pour inactiver les bases puriques et qui empêche en particulier la mélanisation des taches sensorielles de la larve (BOUCHARD, 1970). En conséquence, nous nous étions demandé si diverses molécules du métabolisme normal, répertoriées chez l'œuf d'ascidie par l'équipe italienne de G. REVERBERI (Palerme et Naples, 1965), pouvaient contrebalancer la toxicité du tabac, de ses HAP comme d'autres composants. Nous avons alors obtenu des résultats étonnants et prometteurs en travaillant avec une série d'acides aminés, de vitamines et de facteurs essentiels du métabolisme général.

Il faut ajouter que la disparition brutale de Mr. MAY en 1968 a profondément remis en cause la poursuite de notre travail. Par ailleurs, cherchant conseil auprès d'A. LACASSAGNE, que Mr MAY connaissait bien, celui-ci s'est plutôt intéressé à certains autres aspects de notre activité de recherche qui le concernaient plus directement (BOUCHARD, 1971), et cela jusqu'à sa disparition en 1971. Après une courte période d'hésitation, nous avons alors mené de front des études bien distinctes. Notons que les faits observés avec les ascidies et qui intéressaient A. BEAUMONT, le successeur de Mr MAY, ont pu être complétés et affermis à partir de 1973.

Pourtant, c'est au début des années 70 que sont apparus en pharmacie des produits médicamenteux sensés réduire l'addiction au tabac. Ces produits contenaient « diverses substances améliorantes » qui, dans l'ensemble, correspondaient à certaines de celles que nous avons testées sur les ascidies... Même si nos résultats prétendaient seulement à n'être qu'une analyse scientifique, nous eûmes l'impression que l'idée était passée sur le marché de la santé. Ce point nous a déroutés ; nombre de nos observations sont alors restées enfouies dans nos dossiers. Nous avons tort. Nous avons seulement fait une démonstration à Dourdan, en 1973, pour la SZF, et rédigé, sur les conseils de F. RAMADE, un bref résumé pour « prendre date ». Les produits anti-tabac du commerce pharmaceutique ont disparu depuis longtemps des officines où ils n'ont pas laissé de souvenirs évidents. Et ce qui est utilisé maintenant concerne essentiellement la nicotine ou la cytisine, voire d'autres molécules citées dans le VIDAL et impliquant des effets annexes paradoxalement très toxiques qui peuvent être extrêmement dangereux. Nous pensons qu'il faut souligner, maintenant, certaines observations que nous avons faites, en reprenant l'étude du matériel marin traité expérimentalement, analysé extemporanément, puis conservé depuis lors,

Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué

repris et augmenté au laboratoire d'Orsay avec les notes que nous avons établies auparavant. Cela nous a conduits à réfléchir sur la signification écologique de notre travail et à mesurer l'importance étonnante de l'œuf d'ascidie.

Introduction

Nous avons découvert très tôt les travaux de l'équipe de G. REVERBERI, à Palerme, en particulier ceux de G. LUNETTA (1960, 1961) qui observait les réactions de l'œuf d'ascidie en présence d'agents découplants affectant la phosphorylation oxydative (cf. aussi PATRICOLO, 1961). Or, on sait depuis longtemps (CONKLIN, 1905) que, lors de la segmentation inégale, les divers blastomères de l'œuf sont d'emblée responsables de territoires précis de l'embryon puis de la larve. On voit, en outre, dans l'œuf et au cours de la segmentation, la migration des mitochondries qui induit, et semble contrôler de façon très complexe, la régularité du développement larvaire (WHITTAKER, 1979). Mais si les aberrations observées par LUNETTA dépendent logiquement de ces faits mitochondriaux, rien ne permettait d'exclure d'autres mécanismes. Par ailleurs, FERRINI *et al.* (1964) ont souligné des points essentiels concernant le contenu, dans l'ovaire, d'un pool d'acides aminés, qu'ils retrouvaient dans l'œuf d'ascidie ; et ce stock pouvait être logiquement sensible aux agents toxiques employés par LUNETTA. Un rééquilibrage était-il possible en faisant intervenir certains d'entre eux ? Paradoxalement, G. REVERBERI a montré en 1965 que certains aminoacides normaux, utilisés seuls, pouvaient curieusement perturber le développement embryonnaire normal de *Ciona*. Ce fait compliquait ce que cet auteur constatait en faisant agir des analogues de ces molécules comme l'a également montré A.M. FIASCONARO la même année avec plusieurs analogues de la phénylalanine. L'ensemble du développement embryonnaire et larvaire des ascidies pouvait clairement susciter des études multiples – pas encore génomiques.

En observant les effets des goudrons de tabac sur les œufs d'ascidies, nous avons souligné, en accord avec ce que ces auteurs avaient décrit, l'étonnante résistance, nous dirons la rusticité du développement embryonnaire de notre matériel, dont l'emploi méritait d'être intensifié (selon R. LALLIER et REVERBERI lui-même). Compte tenu des résultats obtenus par les Italiens, il devenait par ailleurs évident que des perturbations métaboliques majeures multiples pouvaient être provoquées par les hydrocarbures du tabac. On pouvait tenter de poursuivre la réflexion de REVERBERI et de la diversifier grâce à l'emploi des goudrons, et par l'utilisation conjointe de quelques substances-clés du métabolisme. Substances pouvant éventuellement compenser des insuffisances produites par le tabac. C'était un pari.

Rappelons que nous avons initialement repéré une réaction-clé en faisant agir conjointement la 6-mercaptopurine et l'adénine (ou l'hypoxanthine) dont l'antagonisme fondamental était connu. L'embryon d'ascidie avait clairement corroboré cela quand nous avons constaté ce qui se passait au niveau du cerveau et des « taches sensorielles » (1970), sans pour autant permettre de faire le tour des processus. Les pro-

Bulletin de la Société zoologique de France 143 (1)

blèmes concernant la mélanine des taches sensorielles et la tyrosinase furent l'un des sujets d'étude de WHITTAKER jusqu'en 1973.

Or, si des agents toxiques tels que les composants du tabac, dont la nocivité est patente, peuvent perturber profondément le développement, voire le bloquer, il nous est apparu clairement que leurs effets peuvent être atténués, voire supprimés, au point de permettre une organogénèse et une métamorphose sub-normales si on ajoute dans le milieu certaines substances au bon moment et en concentration adéquate. Substances d'ailleurs fort diverses comme nous le verrons. Ce point constitue l'essentiel de notre texte qui n'est qu'un résumé d'observations multiples.

Les problèmes soulevés par nos résultats concernaient donc à la fois les faits expérimentaux mais aussi, plus largement, le matériel biologique lui-même. Matériel exceptionnellement favorable dont la récolte ne pose pas de problèmes, mais qui méritera des remarques essentielles. On devait en effet se demander pourquoi les ascidies étudiées s'accommodaient de conditions *a priori* très défavorables comme celles des ports tels Villefranche, voire d'Arcachon (port de plaisance surchargé comme nous l'avons constaté depuis lors). Leur résistance est évidente. Mais, a posteriori, nous avons envisagé que l'existence de telles conditions pouvait s'avérer très avantageuse, comme nous le soulignerons à la fin de ce texte.

Matériel et méthodes

La récolte des ascidies à Villefranche

Nous nous sommes approvisionnés en ascidies durant plusieurs étés dans le port de la Vieille Darse, extrêmement propice et localement riche d'une biocénose exubérante inattendue. En particulier, nous avons disposé là, dans une eau turbide, d'un site admirable, d'une grande richesse botanique et faunistique très particulière, en travaillant en scaphandre autonome sous la vieille coque en bois d'un grand yacht américain, le *Zaca*, immobilisé là sans entretien durant plusieurs années pour des problèmes juridiques et de succession ; superbe goélette d'une quarantaine de mètres, il a navigué durant près d'un siècle et a récolté, sur sa coque, dans toutes les mers, les organismes les plus divers, incomplètement éliminés lors de carénages. Organismes qui se sont revigorés quand le bateau a été abandonné vers 1960 dans le port de Villefranche après plusieurs années de tribulations.

Nous tenons à souligner la situation précise des conditions de vie des ascidies récoltées. Durant quatre ans, pour cerner clairement les conditions de vie de notre matériel, nous avons exploré un milieu complexe, susceptible d'étonner nombre d'écologistes « de terrain », sans prétendre à en connaître minutieusement le peuplement. C'était une jungle dense, avec une belle végétation algale (*Cystoseira mediterranea* et, en sous strate *Ulva rigida*, *Halimeda tuna*, *Codium species*, *Padina pavonia*, *Halopteris scoparia*, *Ceramium ciliatum* et *Peyssonelia squamaria*, gazon dense et plus ou moins sciaphile). Compte tenu de l'imposant tirant d'eau de ce bateau, nous avons pu récolter, essentiellement sous la large coque et en abondance vers

Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué

5-6 m de profondeur, les *Ciona* et *Phallusia* qui nous étaient nécessaires et qui prospéraient dans l'ombre au milieu d'un enchevêtrement d'algues et de *Botrylloïdes* cf *B. leachy*, ou *B. violacea* en longues guirlandes jaune-citron ramifiées extrêmement abondantes où se glissaient des serrans (plutôt *Serranus cabrilla*) et des anguilles de belle taille, fidèles à cet endroit riche en proies et en détritiques organiques. Signalons que cette remarquable biocénose, ici très brièvement évoquée et qu'il serait utile d'analyser finement, a longtemps prospéré dans une eau notoirement turbide, affectée, bien entendu, par les apports continentaux entraînés lors des pluies, ou les fuites d'hydrocarbures des moteurs, et fréquemment perturbée lors du passage des canots et surtout des unités puissamment motorisées qui soulevaient la vase en ne respectant guère la vitesse limite de 3 nœuds autorisée dans la partie étroite du port où était amarré le Zaca.

Principe expérimental

Plusieurs questions se posaient : la localisation et l'adaptation de ce matériel biologique dans un milieu chargé en polluants, la récolte de données concernant les effets primaires des goudrons, et la récolte d'un maximum de données sur les effets secondaires d'éventuels antagonistes du tabac. Antagonistes qui pouvaient être multiples comme nous l'avons laissé entendre.

Les œufs de *Phallusia* sont obtenus par autofécondation. Avec *Ciona*, la fécondation croisée implique 6 à 7 individus afin d'avoir un nombre d'œufs suffisant – plusieurs milliers. Le taux de réussite est assez variable (entre 80 et 100 %).

Les solutions mères de goudrons de tabac total (TT) sont préparées en brisant finement les ampoules scellées, standardisées, fournies par le SEITA (J. CUZIN) puis en préparant des solutions mères dans l'eau de mer ; ces solutions sont fluorescentes en UV compte tenu de la présence, essentiellement, du benzo[a]pyrène (BaP) : cet hydrocarbure est certes liposoluble, mais, dans les goudrons, diverses substances (telles les phénols) sont des solvants du BaP et permettent de préparer finalement des solutions aqueuses « totales ». Pour préparer les solutions mères, une ampoule de goudrons, soit 2 cigarettes ou 0,057 g de tabac, est mise en solution dans 10 ml d'eau de mer filtrée.

Premier temps. Pour évaluer la toxicité des goudrons, nous disposons des séries ou batteries de 7 boîtes de Pétri contenant 10 ml d'eau de mer filtrée. Chaque batterie comporte une boîte témoin et 6 boîtes où l'on ajoute 6 concentrations de tabac de plus en plus fortes : les 6 concentrations testées vont de 0,05 ml de solution mère/10 ml d'eau de mer jusqu'à 0,30 ml/10 ml d'eau de mer (0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 ; 0,25 ; 0,30 ml/10 ml) cela correspondra au Graphique 1 dont la présentation sera détaillée un peu plus loin.

Initialement, la durée d'observation a été limitée à 24 heures, ce qui permet éventuellement de voir se former et évoluer des larves nageuses, normales ou non, et les premiers cas de métamorphose.

D'autres batteries sont destinées à des observations de plus longue durée, de 48 heures jusqu'à trois semaines – avec passage dans l'eau de mer normale au-delà de 48 heures.

Bulletin de la Société zoologique de France 143 (1)

Deuxième temps. On pratique de même pour d'autres batteries comparables qui sont autant de répétitions des divers tests expérimentaux. Pour un même test, il y a autant de batteries que d'essais identiques. Ces répétitions donnent toujours des résultats légèrement différents compte-tenu du degré de réussite de chaque fécondation. Nous sommes allés jusqu'à quinze batteries pour une seule expérience (ajoutons subsidiairement que des œufs ont été traités plus ou moins précocement ; pour simplifier, nous nous limitons ici à des œufs traités juste après la fécondation et par des goudrons totaux, non dénicotinisés).

Ce deuxième temps est basé sur une idée simple, ou au moins logique : on devait envisager que des composants du pool d'acides aminés ovariens étudié par les chercheurs italiens pouvaient être en partie bloqués ou dégradés par la solution initiale de goudrons de tabac. Si la solution contenant le tabac provoque *a priori* une perturbation métabolique entraînant un appauvrissement en certaines substances à rôle vital, on peut envisager d'ajouter à cette solution une substance dont on veut tester l'effet antagoniste éventuel. Il peut s'agir, *a priori*, d'une simple compensation, mais cela resterait discutable...

La méthode est basée sur un même principe de batteries ; voici les différences essentielles :

- une boîte témoin où les œufs baignent dans l'eau de mer pure, filtrée ;
- une boîte contenant du tabac seul, en concentration choisie dans un premier temps comme ayant un effet moyen ; c'est la concentration la plus faible apparaissant sur le graphique 1.
- six boîtes contenant cette même concentration de tabac, plus des concentrations croissantes de l'antagoniste éventuel selon des proportions allant, là encore, de 1 à 6. Les concentrations « antagonistes » ont d'abord été testées seules, sans tabac, afin d'estimer quelle est la dose initiale sans effet indésirable.

Les concentrations de l'antagoniste potentiel ont été choisies en fonction de la masse moléculaire de la substance, tout d'abord testée pour définir un seuil éventuel de toxicité propre, à éviter soigneusement, et finalement choisies en nous basant sur les publications de l'équipe REVERBERI. On définit ainsi une concentration initiale, en μM , non toxique et utilisée ensuite en augmentant la dose de 1 à 6 dans chaque série où l'on traite les œufs, comme nous l'avons dit, avec la solution de tabac de référence.

Ainsi, nous avons testé les effets anti-tabac éventuels de 18 acides aminés, de 5 vitamines, de la créatine-phosphate et des deux bases puriques dont il a déjà été question pour une manipulation princeps. La plupart des produits utilisés venaient de chez Serlabo, Prolabo, Expandia ou de Burroughs Wellcome.

Les anomalies du développement sont toutes notées depuis les premiers cliques jusqu'à l'éclosion, si elle a lieu. Cela correspond à plus de 10 critères d'analyse faciles à distinguer au microscope.

Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué

L'observation se poursuit sur au moins 48 heures afin d'interpréter complètement la métamorphose – quand elle a lieu.

Dans tous les cas, nous avons évalué le mouvement des larves après 24 heures en établissant quatre degrés d'activité dont on tiendra compte, en ordonnées, pour les graphiques choisis, de 2 à 6 (courbes en vert – voir plus loin) :

- degré 0 : aucun mouvement ; forte intoxication ;
- degré 1 : contractions de la queue très espacées et brèves ; aucune mobilité ;
- degré 2 : déplacements sur très courtes distances et sans orientation ;
- degré 3 : nage orientée, mais larves restant au fond des récipients ;
- degré 4 : nage dans toutes directions et même vers la surface. Intoxication faible ou nulle.

De plus, après 24 heures, en évaluant la proportion d'individus présentant des anomalies morphologiques, nous avons établi des courbes apparaissant sur les graphiques en tenant compte des résultats d'une série de batteries. Seuls quelques-uns de ces graphiques figurent ici (de 2 à 6). Même remarque pour les illustrations photographiques.

Après 48 heures, on a établi des courbes en évaluant la proportion d'animaux en voie de métamorphose. Celle-ci se déclenche normalement entre 35 et 45 h, avec une phase initiale de rétraction de la queue qui ne dure pas plus de 20 minutes. Les courbes apparaissant sur les graphiques choisis et des photographies viennent en complément des résultats de 24 heures.

Grouper les résultats de 24 et 48 heures permet de voir, sur un même graphique, deux effets morphologiques d'une même substance testée en tenant compte en outre de la mobilité des larves de 0 à 4 (s'il y a mobilité).

Enfin, pour vérifier les possibilités de croissance des animaux traités au-delà de 48 heures, on peut aussi conserver ceux-ci pendant plusieurs jours et suivre les étapes de la métamorphose, cette fois dans de l'eau de mer normale renouvelée chaque jour. En fait, les individus poursuivent leur organisation durant plus d'un mois malgré l'absence de nourriture, en utilisant les réserves stockées lors de l'auto-lyse du matériel caudal. Ces dernières observations ne sont pas décrites ici, mais le point est noté pour souligner l'extrême plasticité du matériel biologique, surtout chez *Ciona*.

Résultats et remarques immédiates

Méthodes d'illustration

Dans le texte, nous l'avons dit, nous présentons seulement six ensembles graphiques de 1 à 6, choisis comme suffisants pour illustrer les résultats exposés, dont seulement trois concernent les acides aminés.

Bulletin de la Société zoologique de France 143 (1)

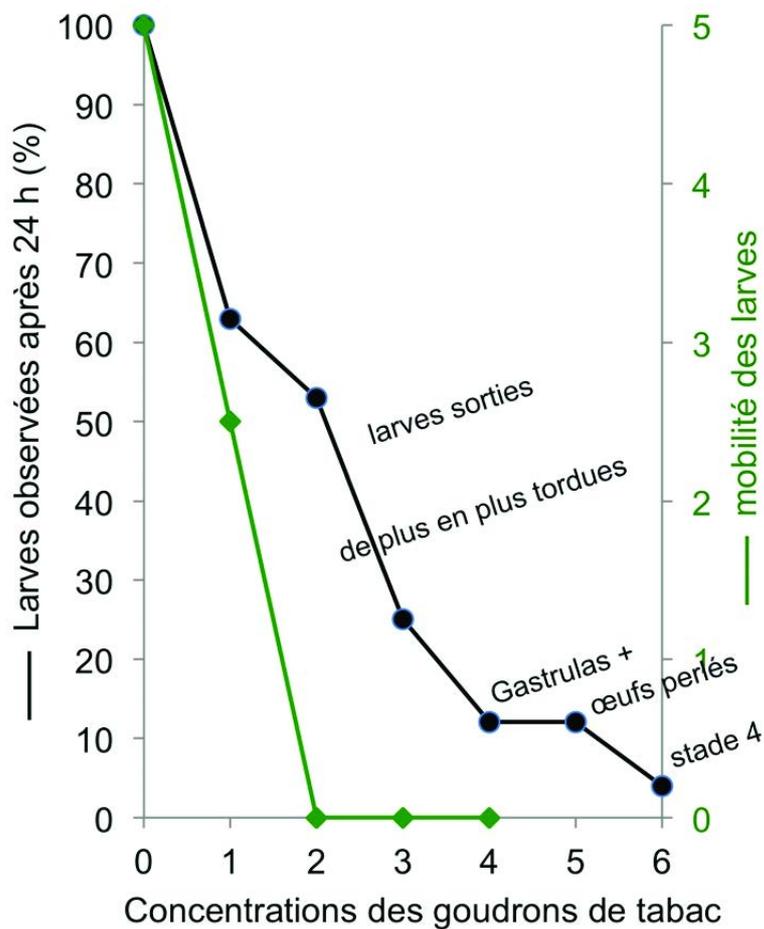
Repères concernant les graphiques (de 1 à 6)

Chacun représente trois dimensions concernant une batterie de résultats, substance X/tabac.

En noir : pourcentages de larves, normales ou non, observées au bout de 24 heures.

En vert : mobilité des larves estimée selon 4 degrés définis dans le texte.

En rouge : pourcentages de larves en métamorphose, normale ou non, au bout de 48 heures – non évaluables quand on étudie les effets du tabac seul, car sans signification.



Graphique 1

Effets de solutions de condensat de goudron de tabac de plus en plus concentrées – des précisions sont données dans le texte. En noir, stades larvaires plus ou moins caractérisés en % au bout de 24 heures. En vert, mobilité des larves, normales ou non, au bout de 24h. Estimation selon une échelle de 0 à 5.

Effects of increasing concentrations of tobacco tar solutions. Black line: percentage of more or less differentiated larvae after 24 h. Green line: motility of larvae, whether normal or not, after 24 h (estimations based on a scale of 1_5). See text for definitions of levels.

Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué

Les planches photos et leurs légendes, de I à VI, comportant chacune une ou plusieurs images numérotées en chiffres arabes, apparaissent *en fin de ce texte*.

Introduction. Les larves et la métamorphose - Ce sont des rappels. Planches de photos I : 8 figures, simplement légendées *en fin de texte*.

Effets des goudrons seuls

Graphique 1 et Planches de photos II : 6 figures, légendées en fin de texte.

Les effets des 6 concentrations utilisées peuvent être constatés directement, au microscope, et évalués grâce aux centaines d'œufs contenus dans chaque boîte de Pétri. Par ailleurs des coupes histologiques viennent corroborer les dégâts particulièrement violents – ils ont fait l'objet de certaines de nos publications (citées) des années 60.

Sur le graphique 1, sont résumés les effets des six concentrations utilisées :

- concentration 1 : stades embryonnaires divers, très avancés, avec 30 % de larves nageuses (degré 2 voire 3), dont la queue est plus ou moins tordue ;
- concentration 2 : même proportion de larves, mais 20 % de tordues et pas de nageuses ;
- concentration 3 : seules 2 % de larves sont écloses, généralement tordues et pourvues d'une seule tache sensorielle ;
- concentration 4 : rares stades embryonnaires interprétables ;
- concentration 5 : tous les œufs sont « perlés » ; aucune organisation de blastomères ;
- concentration 6 : même chose ; on repère seulement les stades 4 – le perlage noté précédemment étant sans doute une tentative avortée de développement.

C'est la concentration 1 qui constitue la base de toutes les expériences qui suivent.

Les résultats des tentatives de compensation des effets du tabac

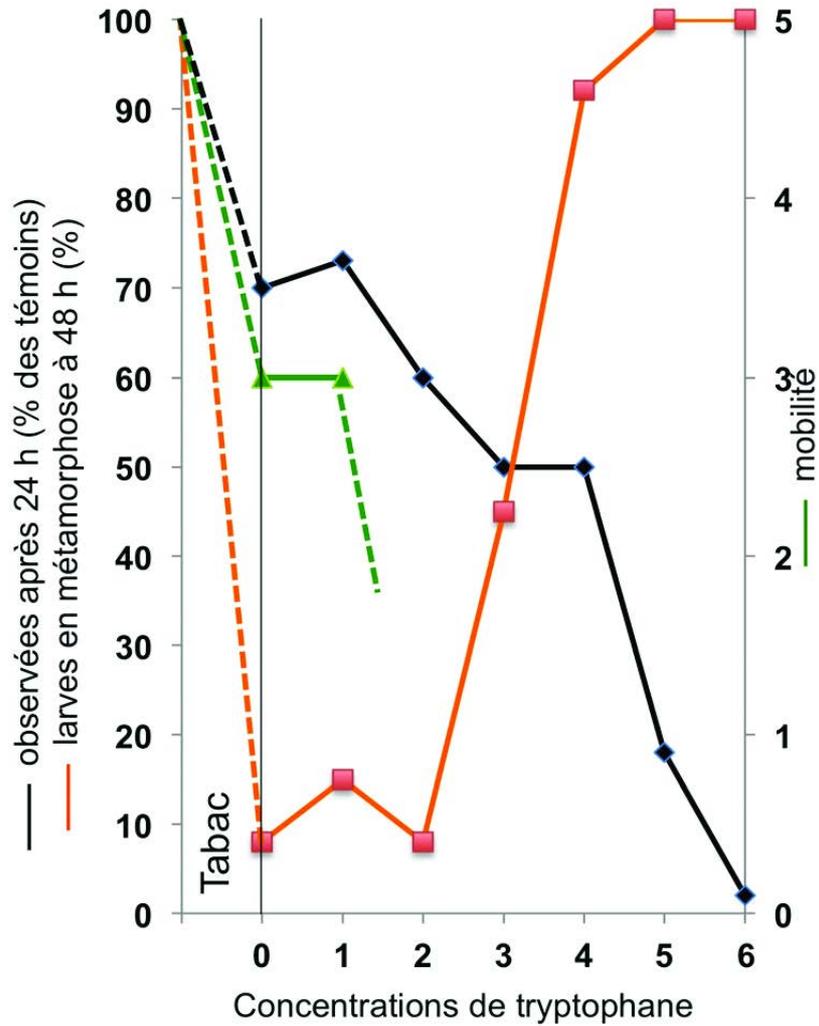
A. Effets des acides aminés (AA), sur les animaux traités simultanément par les goudrons du tabac employés à la dose limite 1 choisie précédemment. Graphiques 2 à 4, Planches III et IV.

Indépendamment de leur nature chimique, plusieurs AA peuvent avoir, dans nos cas, des effets grossièrement similaires sur l'intoxication provoquée par le tabac à dose-limite inférieure. Mais compte tenu des contraintes de l'édition, nous avons choisi d'analyser seulement **trois graphiques** nécessaires et suffisants pour indiquer les effets distincts des AA. Ils sont présentés groupés, N° 2, Tryptophane, N° 3, Cystéine et N° 4, Arginine.

Pour chaque AA, nous indiquons ci-après, entre parenthèses, la concentration de la solution la plus faible qui est utilisée pour la première boîte. Cette concentration, testée initialement sans tabac, est de plus en plus forte de 1 à 6 dans les boîtes suivantes.

1. AA n'apportant aucune amélioration ; nocivité notable par rapport à l'état des animaux traités par le tabac seul. Planche III ; 2 figures légendées en fin de texte.

- La **phénylalanine** (10 μ M) n'apporte aucune amélioration pour *Phallusia*, quelle que soit la concentration et elle est nocive chez *Ciona*. La nocivité observée chez les

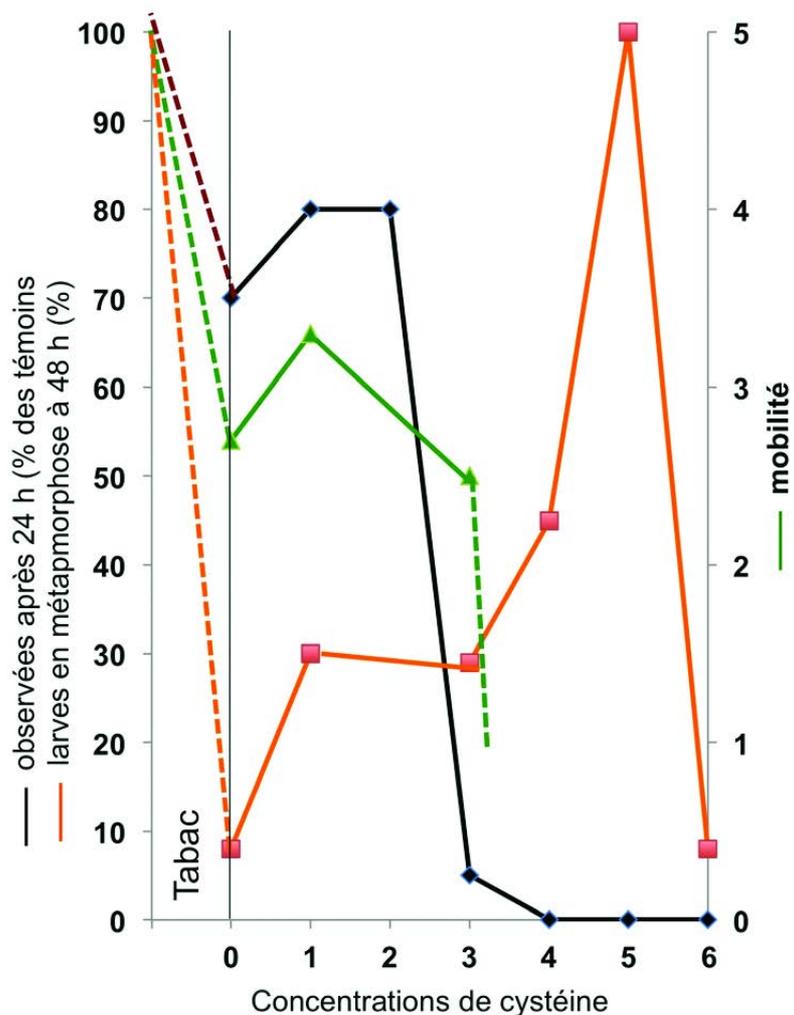


Graphique 2

Effets de solutions plus ou moins concentrées en tryptophane sur des œufs simultanément traités par une solution faible de tabac – cf. texte. **En noir**, % de larves écloses en 24h. **En rouge**, % de larves parvenant à la métamorphose en 48h. Mais avec la concentration 5, la métamorphose se fait dans les enveloppes de l'œuf et est à peine ébauchée avec la concentration 6. **En vert**, estimation concernant la mobilité des larves.

*Affects of different concentrations of tryptophan on eggs simultaneously treated with a weak solution of tobacco. **Black line**: percentage of larvae hatched in 24 h. **Red line**: percentage of larvae undergoing metamorphosis after 48 h (at concentration 5 the metamorphosis occurs within the egg and is barely initiated at concentration 6). **Green line**: estimated motility of larvae. See text for definitions of levels.*

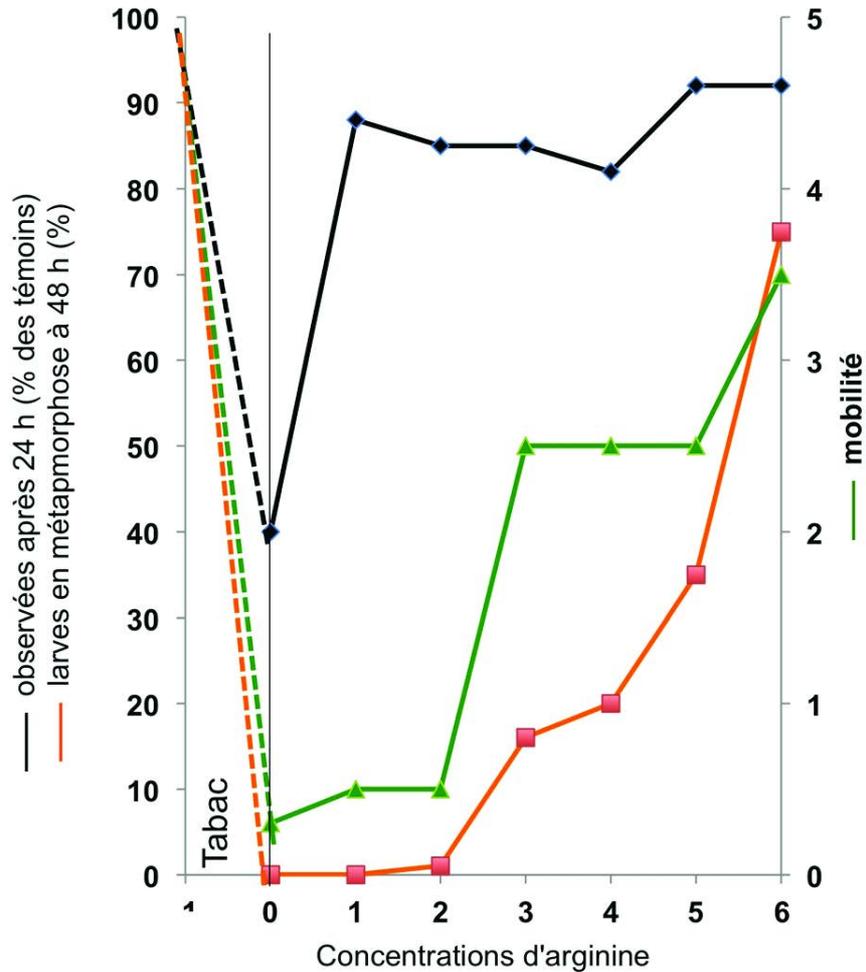
Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué



Graphique 3

Mêmes conditions que pour le Graph. 2, où l'on évalue les effets de la cystéine sur des œufs traités par la solution faible de tabac. **En noir**, les effets évoquent la figure précédente ; mais la toxicité de la cystéine apparaît plus brutalement. **En rouge**, le pourcentage de larves en métamorphose à 48h est *a priori* intéressant mais, dès la concentration 4, un œdème se déclenche, qui interrompt celle-ci, laquelle est totalement inhibée aux plus fortes concentrations.

*Affects of different concentrations of cysteine on eggs simultaneously treated with a weak solution of tobacco. **Black line**: percentage of larvae hatched in 24 h. **Red line**: percentage of larvae in metamorphosis after 48 h, which is initially high but is interrupted at level 4 by the formation of an oedema and completely blocked at higher levels. **Green line**: estimated motility of larvae. See text for definitions of levels.*



Graphique 4

Mêmes conditions, mais on évalue, cette fois les effets de l'arginine sur des œufs traités par la solution faible de tabac. Les effets bénéfiques de l'arginine apparaissent clairement quel que soit le critère à partir de la concentration 3 ; la toxicité de la solution de goudron est presque annulée pour la concentration 6 d'arginine qui permet non seulement un remarquable développement des larves au bout de 24 heures, mais aussi une métamorphose normale à 48 heures.

*Affects of different concentrations of arginine on eggs simultaneously treated with a weak solution of tobacco. The beneficial affects are clear for all criteria from level 3 upwards; the toxicity of the tobacco solution is almost eliminated at concentration 6 of arginine, which not only allows a strong development of the larvae after 24 h, but also a metamorphosis at 48 h. **Black line**: percentage of larvae hatched after 24 h. **Red line**: The percentage of larvae in metamorphosis after 48 h. **Green line**: estimated motility of larvae. See text for definitions of levels.*

Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué

larves s'accompagne paradoxalement d'une accélération de l'entrée en métamorphose des survivantes, phénomène passif sans histolyse de la queue, auquel suit un blocage complet, contrairement à la normale.

- La **tyrosine** (10 μM) est nocive chez les deux espèces traitées-tabac.
- Le **tryptophane** (8 μM), *Graph. 2*, que FERRINI *et al.* (1964) n'ont pas décelé dans l'œuf de *Ciona*, est nocif pour nos deux espèces : éclosion fortement ralentie ou inhibée ; torsion de la queue plus ou moins importante.
- L'**histidine** (10 μM) entraîne un surcroît de nocivité précoce et tardive chez la larve de *Ciona*, ou lors de la métamorphose chez *Phallusia*.

Ces quatre AA n'ont aucune identité d'action ; globalement, ils ne contrebalancent pas l'action de la concentration de référence du goudron et le déséquilibre qu'ils introduisent est de nature très différente suivant l'espèce concernée. Ils n'empêchent pas le déclenchement de la métamorphose ; ils peuvent même l'accélérer, dans l'enveloppe choriale (dans « l'œuf »), mais sans la mener à bien.

2. AA apportant une amélioration qui dépend étroitement de la concentration ; nocivité plus ou moins notable suivant le critère concerné.

- La **sérine** (16 μM) et la **valine** (14 μM) entraînent un bénéfice modeste à faible concentration, mais sont toxiques si la dose est augmentée ; on constate un œdème et la sérine tue les larves.
- La **cystéine** (14 μM), *Graph. 3*, et la **lysine** (11 μM) améliorent plus nettement la croissance larvaire, mais la torsion est importante et la lysine favorise le mouvement ; pourtant, la toxicité apparaît quand on augmente les doses – la cystéine provoque même un œdème qui tend à bloquer définitivement la métamorphose. La lysine donne des résultats qui permettent d'évoquer un équilibre entre la croissance larvaire et l'entrée en métamorphose paraissant être proches de la normale. Il faut pour cela une concentration optimale.

3. AA apportant une amélioration nette de la croissance larvaire et favorisant l'entrée en métamorphose, laquelle est apparemment normale. Aux différentes concentrations, la nocivité est modeste.

- Seule la **thréonine** (14 μM) possède cet effet remarquable, sauf aux fortes concentrations où la toxicité se manifeste par de l'œdème.

4. AA améliorant nettement la croissance larvaire, avec une métamorphose normale et dont la toxicité est nulle ou faible.

- La **proline** (13 μM) ne déséquilibre pas la croissance, et les larves ont un aspect complètement normal. Mais croissance lente des papilles d'accrochage.
- La **leucine** (13 μM) agit de façon assez semblable et améliore considérablement les mouvements tout en ralentissant la croissance des papilles et la régression de la queue.
- La **méthionine** (11 μM) et la **cystine** (7 μM) déséquilibrent encore un peu la métamorphose : si la rétraction et l'histolyse de la queue se font lentement comme chez les animaux normaux (35 à 45 h) la métamorphose du corps et la fixation se produisent rapidement (dès 30 h). Ainsi, avec la cystine, on constate chez *Ciona* une croissance très importante de la papille unique (planche IV, Fig. 2), alors même que la queue est encore parfaitement typique de la larve.

Bulletin de la Société zoologique de France 143 (1)

Pour les trois groupes d'AA précédents, le déséquilibre de métamorphose, très net, se manifestait par une rétraction prématurée de la queue, accompagnée ou non par un remarquable remaniement de l'extrémité crâniale des individus. Ici, au contraire, l'atrophie caudale est lente, alors que la métamorphose du corps apparaît normale ou sub-normale, sinon accélérée (sauf si les doses sont fortes comme c'était le cas avec la cystéine).

5. AA apportant une évidente amélioration de la croissance larvaire ; peu toxiques ou non toxiques.

- La **glutamine** (11 μM) et l'**asparagine** (12 μM) ont des effets très proches : larves normales, comme l'entrée en métamorphose, mais celle-ci est assez lente et peut s'accompagner d'œdème.
- L'**alanine** (17 μM) : la croissance larvaire est encore meilleure et la métamorphose est plus régulière ; œdème caudal rare ; mais défaut de croissance des papilles.
- La **glycine** (22 μM) : très bonne compensation des effets des goudrons chez les deux espèces. Seules les concentrations fortes de glycine peuvent entraîner un léger œdème. La papille de fixation de *Ciona* joue son rôle.

6. AA permettant une bonne amélioration de la croissance larvaire et une récupération frappante de la mobilité.

- C'est le cas de l'**arginine** (10 μM) **Graphique 4**. La mobilité s'accroît entre 24 et 48 h. Si la mobilité pouvait apparaître, plus discrètement, après action de la leucine et surtout de la lysine, l'arginine est encore plus efficace. L'arginine contrebalance presque totalement les effets toxiques du tabac (NB : pour comparaison, et bien qu'il ne s'agisse pas d'un AA, il n'est ni inutile ni incongru de placer ici le cas de la vitamine B1, la thiamine, qui peut être intéressant sous la forme du **Graphique 5**).

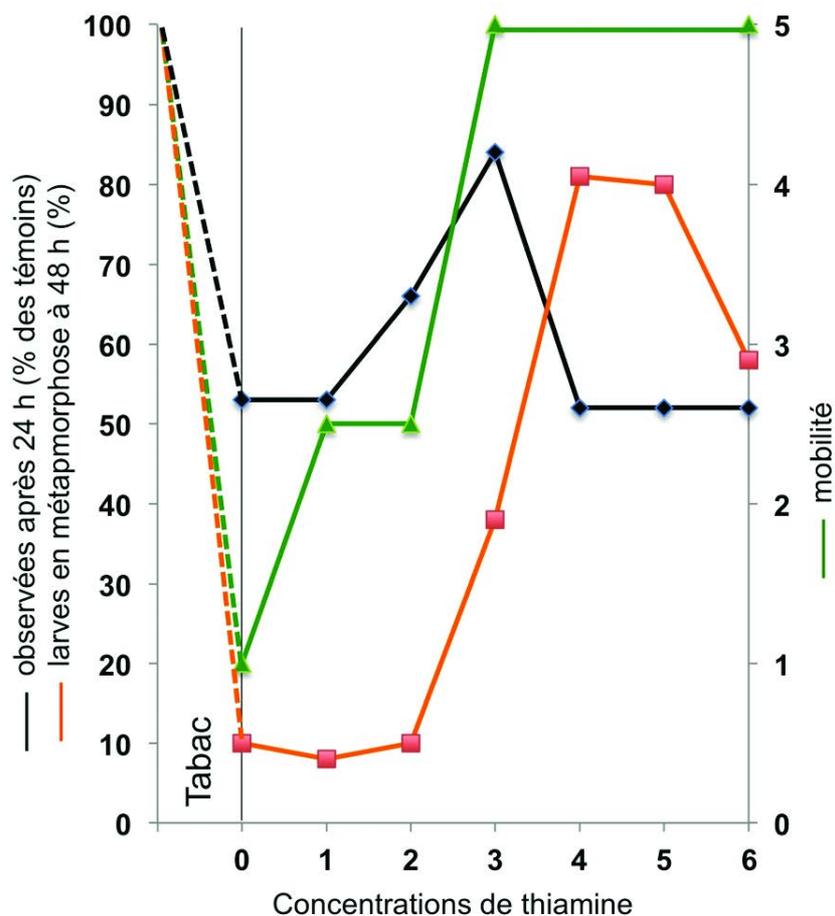
Seuls documents photos choisis pour illustrer des effets remarquables de certains AA : 1°) Planche III qui concerne le tryptophane, Fig. 1 et la cystéine, Fig. 2, et par ailleurs, 2°) Planche IV décrivant des aspects de la métamorphose. Compte tenu de ce que nous venons de décrire brièvement, la planche IV permet, ainsi qu'on le verra, de mieux apprécier comment se font l'entrée en métamorphose et son déroulement.

D'après les résultats de divers auteurs, le déclenchement de la métamorphose pourrait avoir des causes variées. S'agit-il d'un effet positif ou, au contraire, d'un appauvrissement (blocage « partiel » d'un phénomène métabolique normal, mais pas indispensable, chez la larve) ?

L'ablation de la queue de larves normales entraîne une accélération du phénomène (ZHINKIN, 1939 ; C. BOUCHARD-MADRELLE, non publ.). LYNCH & CLONEY (1961), notaient que l'entrée en métamorphose pouvait suivre un traitement chimique.

On sait depuis REVERBERI que l'actinomycine D ou la puromycine empêchent le déclenchement de la métamorphose qui ne serait donc pas directement un simple appauvrissement biochimique, mais un effet conjugué d'acides nucléiques codant pour des protéines spécifiques. Et nous avons constaté que, à faibles doses, l'actinomycine D agit en augmentant de façon paradoxale l'activité natatoire (résultats non publiés).

Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué



Graphique 5

Mêmes conditions, en évaluant les effets anti-tabac de six concentrations de thiamine. Là encore, l'antagonisme est net, en particulier sur l'activité natatoire des larves. Mais, après la concentration 3 de thiamine, celles-ci sont moins nombreuses et, finalement, avec la concentration 6, au bout de 48 heures, le nombre d'animaux en métamorphose diminue très significativement.

Affects of six different concentrations of thiamine on eggs simultaneously treated with a weak solution of tobacco. Here the antagonistic effects are clear, particularly on the swimming activity of the larvae. However, from concentration 3 upwards the larvae are less numerous and at concentration 6 the number of individuals metamorphosing after 48 h is greatly reduced. Black line: percentage of larvae hatched after 24 h. Red line: percentage of larvae in metamorphosis after 48 h. Green line: estimated motility of larvae. See text for definitions of levels.

Bulletin de la Société zoologique de France 143 (1)

Dès lors, il semble normal qu'après intoxication par le tabac, nos larves se développent et se métamorphosent si le milieu contient des acides aminés indispensables pour les synthèses protéiques au niveau de l'ensemble du corps. Mais il est clair que, dans nos cas, il y a plusieurs types de métamorphoses suivant l'AA utilisé.

Ainsi, nous distinguons trois types (Planche photos IV) : 1°) *la métamorphose équilibrée* sur les plans chronologique et morphologique ; 2°) *la métamorphose crâniale*, où les organes se constituent plus ou moins tôt et où les crampons se forment et se fixent au substrat alors que la queue se rétracte peu, lentement, voire pas du tout ; 3°) *la métamorphose caudale*, où la queue se rétracte, se désorganise et tend à s'histolyser, tandis que les autres organes sont remaniés tardivement et que les crampons demeurent atrophiés.

Après action des goudrons, on constate une métamorphose équilibrée en ajoutant de la glycine.

La métamorphose est *crâniale* avec l'asparagine ou la cystine, mais il faut nuancer : 48 h après le début du traitement, il y a des différences dans le degré de rétraction et d'histolyse de la queue ; d'autre part, le développement des crampons de *Phallusia* ou de l'unique pédoncule d'accrochage de *Ciona* sont bien distincts ; par exemple, chez *Ciona*, la croissance du crampon est anormalement forte en présence de cystine, alors que la queue larvaire n'est pas modifiée ; cette action préférentielle est particulière à l'espèce. On constate avec étonnement que ces phénomènes morphogénétiques sont fort délicats à « mesurer ». Ils le seraient plus encore si l'on faisait agir conjointement deux ou plusieurs AA...

On perçoit aussi deux variantes de la métamorphose caudale. Dans la première, les modifications caudales sont relativement tardives et n'entraînent ni la dégénérescence ni la mort des individus. C'est le cas de la thréonine et de l'alanine. Dans la seconde, les modifications sont très précoces, voire brutales, entraînant la mort des larves ; la valine, la sérine et la phénylalanine provoquent cet effet.

Ces phénomènes morphogénétiques complexes mais clairement observables, soulignent à quel point le matériel biologique est intéressant.

B. Effets de quelques substances du métabolisme général sur les animaux traités par les condensats de fumée de tabac.

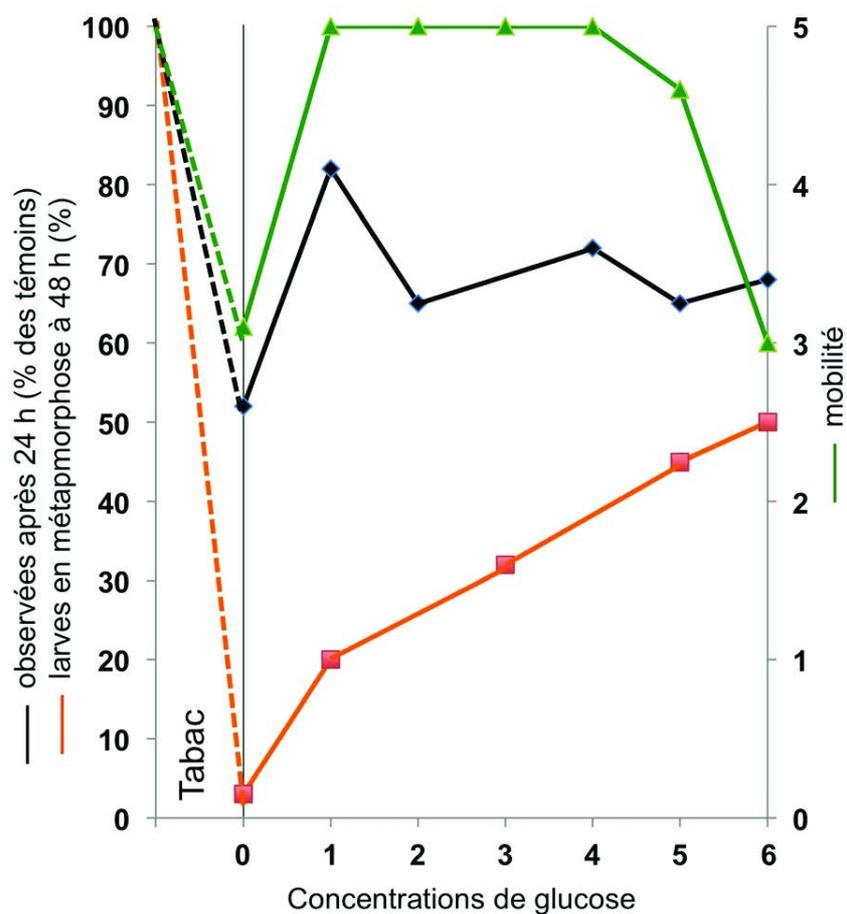
1. Les effets de quelques substrats

L'acide pyruvique (25 μM), le pyruvate de sodium (15 μM), le glycérophosphate de sodium (8 μM), le glycérophosphate de calcium (8 μM) et le glucose (100 μM) (Graphique 6, Planche V, 4 figures) ont nettement amélioré la croissance des larves de *Phallusia*, sauf le sel de calcium (déséquilibre ionique ?).

Le **glucose** (*Graph. 6*) a fait l'objet de quinze séries d'expériences globalement satisfaisantes :

– chez *Ciona*, il a donné de bons résultats (3 séries) sauf pour le mouvement qui n'a jamais pu être rétabli ;

Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué



Graphique 6

Mêmes conditions, en évaluant les effets anti-tabac de six concentrations de glucose. Le bénéfice est d'emblée très remarquable. Il favorise particulièrement l'activité natatoire quand on utilise une concentration faible ou moyenne de glucose.

Affects of six different concentrations of glucose on eggs simultaneously treated with a weak solution of tobacco. The beneficial effects are clear from the start and swimming activity is particularly favoured by weak to medium concentration of glucose. Black line: percentage of larvae hatched after 24 h. Red line: percentage of larvae in metamorphosis after 48 h. Green line: estimated motility of larvae. See text for definitions of levels.

Bulletin de la Société zoologique de France 143 (1)

– chez *Phallusia*, pour 12 séries : 11 séries positives pour l'amélioration de la croissance larvaire et une série négative ; et 10 séries positives pour l'amélioration du mouvement dont 5 extrêmement efficaces (degré 4).

Les autres substrats ont donné des résultats globalement comparables.

Par ailleurs, 9 séries *Phallusia*-tabac/glucose ont été observées systématiquement après 48 heures : toutes montrent que la métamorphose se déclenche normalement pour un optimum de concentration de glucose qui est aussi efficace pour une amélioration significative de la croissance larvaire. L'optimum varie en fonction des individus servant pour l'autofécondation.

2. Effets de quelques coenzymes ou cosubstrats

Ils ont été testés pour tenter d'affiner ce qui précède ; c'est un choix très limité pour lequel nous n'avons eu aucune prétention précise (Tableau 1).

Tableau 1

Les nucléotides et vitamines testés et leurs effets/
Texted nucleotides and vitamins and their effects

Substance	Effet / tabac	Matériel Biologique
ATP 1 μ M	Nul ou toxique	<i>Phallusia</i>
GMP (guanosine monophosphate) 2 μ M	Toxique	<i>Phallusia</i>
Vitamine B1 (thiamine) 5 μ M	Très nettement bénéfique	<i>Phallusia</i>
Vitamine B5 (acide pantothénique) 10 μ M	Bénéfique	<i>Phallusia</i> et <i>Ciona</i>
Vitamine B2 2 μ M	Nul	<i>Phallusia</i>
Vitamine PP 6 μ M	Toxique	<i>Phallusia</i>
Vitamine B6 10 μ M	Bénéfique	<i>Phallusia</i>
Vitamine C 10 μ M	Très nettement bénéfique	<i>Phallusia</i>

Les effets bénéfiques impliquent une bonne activité locomotrice des larves, au moins chez *Phallusia*. De plus, il y a parallélisme entre amélioration des éclosions, bonne morphogénèse des larves et possibilités de métamorphose. On insiste sur le fait que deux vitamines sont clairement antagonistes du tabac (ex. thiamine, ou vitamine B1, signalée dans le Graphique 5) ; vitamines dont on connaît bien des effets chez l'Homme. Est-ce à rapprocher des anciennes préconisations concernant un éventuel sevrage ?

3. Effets d'une base purique, l'adénine, sur les œufs d'ascidies traités par le tabac

On utilise comparativement l'hypoxanthine, base nucléique d'importance secondaire, dérivée de la guanine et qui est présente en petites quantités dans les ARNt.

Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué

Pourquoi penser à des bases puriques ? Ce sont des molécules simples, composantes des nucléosides et des nucléotides, donc des acides nucléiques. Il s'agissait ainsi de changer de « niveau » biochimique. Et dans une brève communication de 1970, nous avons montré que l'adénine et l'hypoxanthine contrebalançaient les effets de la 6-mercaptopurine (6MP) employée sur l'œuf d'ascidie. Outre les effets bénéfiques concernant la morphogenèse des larves, ces bases permettaient la formation d'organes sensoriels bien mélanisés, *a priori* fonctionnels. Ce qui s'expliquait selon les schémas biochimiques (relation essentielle tyrosinase - DOPA > Dopaquinone) bien établis par WHITTAKER (1966).

Notre communication de 1970, très inspirée de WHITTAKER, constitue un document princeps pour l'ensemble de ce chapitre du présent travail où nous cherchons à compenser certains effets du tabac.

En effet, on savait alors que la 6MP était un antimétabolite analogue des bases puriques (cf. belles expériences de DAVIDSON, 1960 ou BIEBER *et al.*, 1961), entraînant des troubles évidents des chromosomes durant l'activité mitotique et possédant une action antitumorale.

Par ailleurs, nous l'avons dit, nous avons présenté autrefois un travail montrant les effets antimitotiques, anti-chromosomiques (ex. cassures) du tabac chez la souris (MAY & BOUCHARD, 1961).

Dans nos « nouvelles » conditions expérimentales, avec nos ascidies, l'emploi de bases puriques pouvait-il non seulement compenser les effets de la 6MP, comme nous l'avons vu, mais aussi d'éventuels effets des goudrons de tabac, eux-mêmes anti-chromosomiques ?

De fait, quand nous testons leur effet antitabac sur nos ascidies, lorsqu'elles sont employées aux concentrations les plus faibles ($\leq 2 \mu\text{M}$), elles favorisent et accélèrent l'éclosion des larves puis leur mobilité.

Pourtant, MANCUSO (1962) avait décrit des troubles morphogénétiques durant le développement des embryons d'ascidies en présence de ces bases puriques (ce que nous avons confirmé depuis, avec des doses faibles ou moyennes). Compte tenu de nos résultats, cette fois positifs, il y a donc bien antagonisme entre ces purines (*sensu lato*) et certains composants des goudrons, mais seulement si elles sont employées à doses très faibles. Et n'oublions pas que, dans les conditions naturelles, l'adénine se transforme progressivement en guanine (TERROINE, 1960), ce qui complique encore. On pense d'emblée à des effets de ces bases sur les HAP du tabac et à leurs effets anti-chromosomiques, mais le choix de cibles est vaste (cahiers du SEITA...). Et les HAP ne sont sans doute pas les seules substances à provoquer ces effets. Il est vraisemblable que, dans nos expériences, les doses extrêmement faibles de tabac que nous avons employées perturbent déjà certaines synthèses d'acides nucléiques durant l'embryogenèse de nos ascidies. Et il est tout aussi logique d'admettre que de telles perturbations soient expérimentalement réversibles, en faisant agir des doses très faibles de purines, ces dernières ne jouant pas pour autant un rôle essentiellement trophique, contrairement à un apport d'acides aminés ou de glucose, par exemple.

Discussion

Sans prétendre à élucider des mécanismes biochimiques évidemment complexes, nous tentons de comprendre certains effets combinés des goudrons de tabac et des substances que nous venons d'indiquer.

A. Augmentation de la toxicité du tabac

On peut tenter d'entrevoir les raisons qui font que certaines des substances que nous avons utilisées pour tenter de contrebalancer les effets toxiques des goudrons de tabac ont au contraire augmenté ceux-ci. Nous envisageons au moins deux modalités :

- cas de la nicotinamide qui augmente la toxicité du tabac ; la vitamine PP, précurseur des nucléotides nicotiniques est déjà l'une des substances contenues dans le goudron (KENNAWAY & LINDSEY, 1958), ce qui peut conduire à une sorte de « surdosage » et au renforcement de la toxicité de la solution de tabac employée ;
- de nombreux acides aminés augmentent la toxicité du tabac lorsque l'on augmente leur concentration. Citons essentiellement la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane et la tyrosine. Les deux premiers sont peu abondants dans l'œuf d'ascidie normal (REVERBERI, 1964). Le tryptophane n'a pas pu être mis en évidence par FERRINI *et al.* (1964). Donc, l'apport de ces AA ne serait d'aucun intérêt pour contre l'effet du tabac, au moins directement (on aurait pu, *a priori*, envisager que leur destruction par l'embryon puisse fournir des molécules finalement utilisables, indirectement...).

Le cas de la tyrosine est plus complexe encore. Elle est présente dans l'œuf normal, mais l'apport de cet acide aminé renforce la toxicité du tabac. Facilement dégradable, il n'est, malgré tout, d'aucune utilité directe pour l'organogenèse. Une remarque déroutante : en présence de tyrosinase, la tyrosine est un précurseur des mélanines chez la larve (WHITTAKER, 1966). Alors, peut-on envisager qu'il y ait un *seuil* de concentration au-dessus duquel, en présence de tabac, elle ne favorise nullement la formation des organes sensoriels et leur pigmentation ? C'est peut-être simpliste... Quoi qu'il en soit, c'est un bon sujet de réflexion et d'expérimentation !

B. Réduction de la toxicité du tabac

Par opposition, il semble qu'il soit moins difficile de comprendre pourquoi certaines substances ont un effet bénéfique et limitent ou réduisent « à rien » les effets du tabac.

1. Cas de divers acides aminés

Les effets de la méthionine ou de la cystéine sont assez modestes. Mais d'autres ont des effets plus spectaculaires : glycine, alanine, asparagine, glutamine et arginine. Les deux premiers, par transamination, donnent de l'acide pyruvique, essentiel pour des synthèses diverses ; mais on sait aussi que l'alanine intervient déjà normalement dans l'élaboration de la queue (Équipe REVERBERI), donc au niveau de pro-

Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué

cessus complexes de synthèses protéiques spécifiques. Cet acide aminé pourrait donc servir à plusieurs fins dans le métabolisme. Même raisonnement pour la glycine qui, par méthylation, donne la sarcosine, « acide aminé » abondant dans l'œuf de *Ciona* et dont l'importance n'est pas clairement définie (FERRINI *et al.*, 1963).

L'asparagine et la glutamine, ainsi que l'arginine, ont en commun d'être des réserves d'azote, fondamentales pour l'organisme en croissance (FLORKIN & SCHOFFENIELS, 1969). Est-ce là leur seul rôle ?

Le cas de l'arginine est intéressant : en présence de tabac, cette substance facilite la mobilité des larves, l'ensemble de l'organogenèse et la métamorphose ; et chez *Ascidia*, ROCHE *et al.* (1957) ont observé que c'est la phosphoarginine qui joue le rôle de phosphagène. Quoiqu'il en soit, sans pouvoir nous éclairer, REVERBERI nous a dit être intéressé par l'arginine. Nous ne savons pas à quoi il est parvenu éventuellement.

Il est vraisemblable que les AA dont il vient d'être question jouent des rôles essentiels pour diverses synthèses normales. Certes l'entrée en métamorphose en présence de tabac est rendue possible si l'on fait intervenir certains acides aminés, mais le phénomène ne peut se dérouler normalement qu'en présence de certains d'entre eux, qui interviennent sans doute au niveau d'un nœud métabolique. Si l'on admet cela, on doit considérer qu'ils n'ont pas seulement un rôle de « complément alimentaire ». Mais peut-on vraiment parler d'un déroulement « normal » ? Nous dirons plutôt qu'il s'agit d'un déroulement qui nous paraît être normal : à la réflexion, même dans les cas les plus spectaculaires, il serait difficile de l'affirmer ; des détails anatomiques ou chronologiques peuvent passer inaperçus. En d'autres termes, à nos yeux, la compensation n'est pas la perfection.

2. Le cas de coenzymes ou de précurseurs multifonctions

Nous avons vu que l'apport de thiamine ou d'acide pantothenique se révèle extrêmement bénéfique pour les embryons et les larves se formant en milieu tabagique, tout comme celui de la vitamine C. On doit donc insister sur l'importance objectivement essentielle d'une « suralimentation » par rapport à ce qui est contenu dans l'œuf initialement intoxiqué par le tabac.

3. Le cas du glucose est peut-être particulièrement intéressant.

Une intoxication par des goudrons de tabac (les variantes n'ont pas été citées ici) est, en général, compensée par le glucose, substrat ordinaire du développement, dans la mesure où la solution de goudron est faiblement concentrée. Il en est de même si l'on utilise le phosphoglycérate ou le pyruvate. Or, par rapport à ce que constatait MANCUSO (1956) durant le développement normal, les coupes histologiques nous ont montré que les larves plus ou moins anormales traitées par le tabac seul montrent un excès de glycogène ; cela conduit à estimer que les goudrons perturbent quelque part l'utilisation (phosphorolyse) du glycogène. D'où le bénéfice obtenu en fournissant du glucose. Et, nous l'avons dit, nous avons effectué un nombre important de tests.

Bulletin de la Société zoologique de France 143 (1)

Rappelons aussi qu'un excès d'ATP empêche la glycogénolyse cardiaque chez les Vertébrés (MORGAN *et al.*, 1964). Or, dans le cas de nos ascidies, les solutions contenant de l'ATP renforcent l'action toxique des goudrons, comme si la substance était en excès. Mais d'autres mécanismes comme une action de l'ATP sur certains récepteurs neuronaux sont également envisageables.

Quoi qu'il en soit, ajoutons que, si le glucose permet une croissance et une métamorphose apparemment normales chez *Ciona* et *Phallusia*, il nous a été impossible de rétablir parfaitement la mobilité larvaire chez *Ciona*, ce qui prouve que la molécule ne possède pas ce « quelque chose » qui conduirait à la compensation parfaite. Il manque dans la molécule de glucose le ou les éléments indispensables pour *Ciona*. Cet exemple simple, qui permet de raisonner « à plat », est particulièrement frappant par rapport aux « à peu près », même très satisfaisants, que nous avons pu obtenir avec d'autres substances capables de compenser les effets du tabac, mais dont la composition élémentaire est plus complexe. Si on prend le cas de l'arginine, il est déjà plus hasardeux de raisonner sur une molécule riche en azote et qui paraît être en mesure, à première vue, de compenser réellement tous les effets du tabac ; mais on note pourtant qu'il faut des concentrations assez importantes d'arginine pour assurer un taux de métamorphoses élevé (Graph. 4) ; c'est donc un « à peu près ». Il en est de même avec la cystine, molécule encore plus complexe chimiquement et qui ne conduit pas à une métamorphose équilibrée (Planche IV).

C. Problème annexe : le cas paradoxal des AA soufrés

Chez nos embryons intoxiqués par le tabac, l'apport d'AA soufrés favorise plus ou moins le développement et la métamorphose, bien que celle-ci soit souvent abortive. Pourtant, selon REVERBERI (1964), la cystéine s'avère normalement toxique pour l'œuf. Dans nos cas, peut-on envisager qu'elle puisse elle-même être antagoniste de cyanures qui sont des composants du goudron de tabac – réaction constatée chez des Vertébrés, selon BACQ & ALEXANDER (1960), lors de l'étude de phénomènes de résistance aux radiations ionisantes ?

En fait, l'équilibre du soufre est un vrai problème... Il est d'autant plus compliqué que, toujours selon l'équipe italienne, la taurine est normalement abondante chez les ascidies. Il est vrai que cette substance formée à partir de la cystéine, n'est pas un AA au sens habituel du terme, puisque c'est un acide sulfonique et non carboxylique. La taurine exerce des actions cytoprotectrices, antioxydantes et anti-inflammatoires ; elle module la concentration intracellulaire en calcium et la fonction de canaux ioniques, et améliore la fonction musculaire (DE LUCA *et al.*, 2015).

Remarque écologique

(c'est la conséquence fondamentale de tout ce qui précède)

Celles de nos expériences qui ont consisté à estimer la susceptibilité de nos ascidies nous ont toutes montré que la résistance, la plasticité de *Ciona* et de *Phallusia* sont exceptionnelles, permettant une très grande variété de traitements chimiques combinés. La plasticité exceptionnelle nous a été signalée par LALLIER, par rapport à l'oursin. Par exemple, nous sommes parvenus à suivre le développement

Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué

embryonnaire et les premiers stades larvaires avec des œufs d'ascidies immergés dans un bain de paraffine liquide (résultats non publiés jusqu'à-présent) et traités en présence de tabac. Et même si l'on n'a pas « testé » d'autres œufs appartenant à d'autres groupes zoologiques en présence de solutions tabagiques, il est clair que divers animaux ne supportent pas les pollutions assez remarquables du port de Villefranche ! La diversité de la faune portuaire est, avouons-le, très médiocre. Ainsi, Serpulidés et Balanidés sont paradoxalement peu abondants sous la coque du Zaca.

On peut se demander pourquoi notre matériel biologique résiste aussi bien dans des conditions difficiles en milieu « naturel » ! Ce qui est aussi le cas d'autres Tuniciers simples ou coloniaux ; même si leurs niches écologiques peuvent être éventuellement plus vastes...

Certes, ces animaux sont des microphages qui se nourrissent en filtrant l'eau grâce à un système branchial particulièrement performant qui permet des récoltes optimales que l'on peut considérer exceptionnelles parmi les filtreurs du Règne Animal. Mais ça n'explique pas leur résistance à des situations difficiles, en particulier en milieux pollués.

Leur multiplication, bien connue, est remarquablement rapide (GRASSE, 1948). Ils sont en compétition avec de très nombreux organismes marins. Les ascidies sont clairement génétiquement programmées pour supplanter tous les autres filtreurs et tendent à devenir intolérables dans des sites qu'elles colonisent depuis quelques années. On pense particulièrement aux côtes canadiennes où l'on pratique les diverses formes d'aquaculture. Deux exemples : l'avis scientifique issu de l'évaluation des risques posés par cinq espèces de Tuniciers sessiles ; Avis scientifique National 049 de 2012 ; et la Squirt conference, de Prince Edward Island, en octobre 2014. Ces Tuniciers surpassent les animaux des élevages dans la récolte du plancton au point d'entraîner la dégénérescence des naissains et de s'installer à leur place sur les supports. La lutte chimique est généralement inefficace car impliquant des doses létales pour les organismes à protéger.

Les pollutions maritimes sont toujours et partout remarquables. En particulier en Méditerranée (MALLET, 1964, et SARDOU, comm. pers.), où les NOx de combustion des fiouls et les huiles usées séjournent dans les ports. Ajoutons que le cas de Villefranche était crucial dans les années soixante, compte tenu de l'importance des grosses unités de navigation qui utilisaient la rade. On peut souligner le cas des cuirassés de la 6^e flotte de l'US Navy qui ont longtemps stationné dans cette base et entraîné des dégâts repérables à l'œil nu sous forme d'irisations, mais aussi de nappes de débris.

Résister à des pollutions implique évidemment la mise en œuvre par les animaux de mécanismes intéressants. Certains groupes d'ascidies les séquestrent dans des « reins d'accumulation » originaux. Mais toutes peuvent aussi les concentrer et les éliminer grâce à des cellules qui sont secondairement excrétées au niveau de la glande hyponeurale et du pavillon de la fossette vibratile. Ces processus sont originaux, bien que certains puissent exister sous une autre forme, chez les Lépidoptères ou les Poissons par exemple. Mais localement, dans un biotope particulièrement pollué, ils donnent un avantage aux Tuniciers.

Bulletin de la Société zoologique de France 143 (1)

L'activité des cellules sanguines a beaucoup suscité l'expérimentation des chercheurs quand ils ont constaté qu'elles accumulaient un métalloïde, le vanadium, en le concentrant de manière extraordinaire ; vanadium qui, certes, n'est pas reconnu comme un polluant particulièrement toxique, mais ce fait est un indice tout-à-fait remarquable. On parle d'ailleurs de vanadocytes. De plus, ceux-ci accumulent aussi le fer et le manganèse (MICHIBATA *et al.*, 1986) aussi bien chez les Phlébobranches (*Ciona* par exemple) que chez les Stolidobranches. Ces trois éléments joueraient un rôle antimicrobien, lequel favoriserait la survie et la prolifération des ascidies dans l'eau d'un port. Selon UEKI *et al.* (2003), le vanadium favoriserait la rétention du fer mais aussi du cuivre grâce à un ensemble de protéines, les vanabines, coordonnées grâce à la lysine, et mises en évidence sur colonnes permettant les chélation métalliques. Par ailleurs, on peut insister sur le point de vue de RUPPERT *et al.* (2004), qui estiment que la bioaccumulation du vanadium au niveau de la tunique limite la prédation.

Par ailleurs, les ascidies tolérantes qui prospèrent dans l'eau des ports profitent d'une alimentation enrichie par les conditions de stagnation relative du milieu. En effet, l'accumulation plus ou moins importante des débris organiques, cadavres des composants ordinaires de la flore et de la faune, sans oublier les déchets rejetés à partir des bateaux, entraînent la concentration de nutriments de nature diverse. Ils profitent en premier lieu aux énormes quantités de bactéries et au plancton, qui sont récoltés sur les branchies des ascidies. Il faut aussi tenir compte des fins débris, des pelotes fécales constituant le fond de vase éminemment instable, bouleversé au passage des bateaux motorisés et où prolifèrent les Bactéries, les Protozoaires, les Annélides, mais aussi des ophiodermes, des gobies et des Mugilidés fouilleurs de sédiment. En milieu anaérobie, qui tend à s'eutrophiser, la dépolymérisation, l'hydrolyse et la fermentation conduisent à la mise à disposition de substrats organiques simples : acides organiques simples, acides gras insaturés à chaîne courte, mono et oligosaccharides et acides aminés ; ce qui nous ramène au centre de notre travail. Certes, cela concerne d'abord les ascidies adultes. Mais cet avantage alimentaire sélectif favorisant les adultes peut aussi concerner l'œuf et l'embryon, bien qu'ils soient vitellolécithes. En effet, ils sont, comme la larve, sous la dépendance des cellules accessoires. Il y en a deux types, deux couches : la couche externe, de formation tardive, de cellules folliculeuses essentiellement protectrices et la couche interne de cellules testales (photos de la Planche VI) évoquées et reconnues depuis CHABRY, étroitement accolées à l'ovocyte puis à l'œuf, bien étudiées par REVERBERI & MANCUSO (1960) et surtout en microscopie électronique par MANCUSO (1965) ; cellules dont les fonctions ne sont pas toujours évidentes (MANSUETO, 1964 ; REVERBERI, 1978 ; BOUCHARD-MADRELLE, 1982). On sait le rôle direct des cellules testales dans le déclenchement de la métamorphose, dans la constitution de la tunique lors de l'allongement de la queue de la larve têtard (SATO *et al.*, 1997) ; leur multiplication et leur migration, qui conduisent à la formation de la tunique, ont été remarquablement mises en évidence par DOLCEMASCOLO *et al.* (2012). Leur migration est assurée grâce à des « pseudopodes » (à vrai dire bien différents de ce que l'on voit chez les Amibes...). Or, à notre grand étonnement, après avoir filmé

Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué

image par image, nous avons constaté que l'ensemble des cellules testales de l'embryon se déplace à sa surface durant tout le développement ; ce déplacement très intense concerne toutes les cellules, lesquelles ne se multiplient pas et ne subissent aucune apoptose. On dira, pour simplifier de manière imagée, que, devenues très mobiles, elles semblent monter la garde entre l'embryon et le chorion. Un tel comportement n'est sûrement pas fortuit et nous en sommes venus à penser qu'il implique des échanges avec l'embryon ; par exocytose, ces cellules testales jouent un rôle de « poubelles » bien décrit en électronique par C. BOUCHARD-MADRELLE au contact de l'ovocyte (tous les documents histologiques et, en particulier électroniques sont sans équivoque - Planches de photos VI), mais aussi sans doute, dans un deuxième temps, de « nourrices » pour l'œuf et l'embryon grâce à des apports extérieurs organiques ou minéraux : l'aspect des « pseudopodes », ou plutôt des figures d'exo- ou endocytose est évocateur. Échanges qui, lors de la formation de la queue, viendraient peut-être favoriser le fonctionnement du « gène caudal » dont parle LAMY (2006), la limitation à 40 du nombre de cellules chordales, leur réarrangement grâce à des jonctions serrées, à des fibres de connexion (fibronectine glycoprotéique selon SEGADO *et al.*, 2016) et finalement la croissance de l'épiderme. Mais attention, rien n'est moins sûr, car des embryons déchorionés, selon des pratiques récentes et largement adoptées, peuvent cependant élaborer une queue, mais dépourvue de tunique, laquelle dépend très clairement des cellules testales elles-mêmes. (Notons que l'élimination ménagée du « chorion », c'est-à-dire des cellules folliculeuses, du chorion *sensu-stricto* voire même des cellules testales, n'est pas sans impact selon CLONEY & CAVEY (1982) et THOMPSON & SHIMELD (2015) – ce qui est logique).

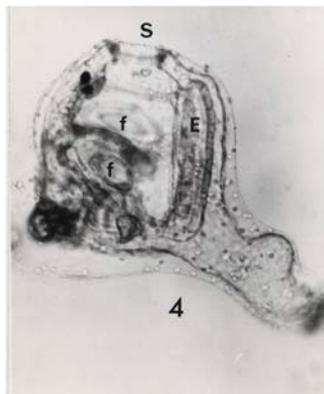
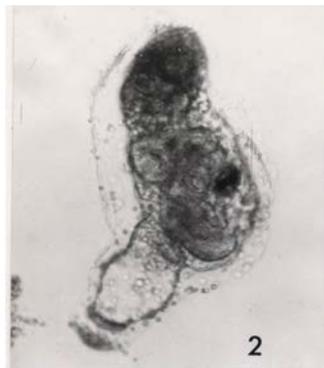
Nous soulignons un point qui concerne les cellules testales ; cela résume de façon claire et directe le fond de notre réflexion. On peut se baser sur un article de LAMBERT (2009), qui regroupe les observations d'auteurs récents conduisant à mieux « visualiser » la situation. Il montre en particulier des photographies en microscopie à balayage qui lui ont été aimablement fournies par HONNEGER et KOYANAGI ainsi que par KOCH et JOHNSON et qui éclaircissent sans équivoque la disposition et l'aspect des cellules accessoires de *Phallusia mammilata* et d'*Ascidia ceratodes*.

L'ensemble de nos observations en microscopie photonique et électronique, ainsi que de notre film image par image sont les bases de notre réflexion. Ce film, document essentiel, augmenté par les nombreux tests de compensation des effets toxiques du tabac, nous conduit logiquement à penser que l'apport de diverses substances exogènes, agissant directement ou transitant par les cellules testales, peut modifier la sensibilité aux agents toxiques ordinaires de l'environnement pollué. La détoxification est possible et se double probablement d'un effet de suralimentation.

Planches I à VI

Pour les planches, indiquées en chiffres romains, les numéros des figures sont en chiffres arabes ; et les légendes en anglais sont données à la suite immédiate des légendes françaises.

PLANCHE I



Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué

PLANCHE I (SUITE)

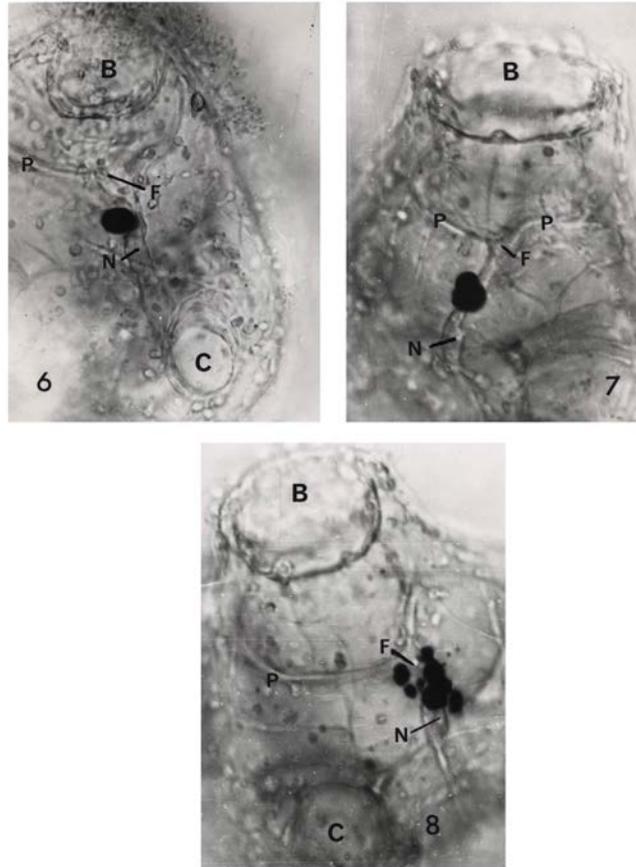


Planche I (Plate I)

Rappels morphologiques correspondant à la larve et à la métamorphose.

(Les animaux ont été photographiés vivants).

Typical morphological aspect of larva and stages of metamorphosis. (living animals).

Figure 1

Larves de *Phallusia mammilata* ; la plupart des organes sont à l'état d'ébauches groupées dans la partie antérieure du corps, alors que la chorde et la musculature caudale assurent les mouvements de la queue contrôlés par le système nerveux.

Larvae of Phallusia mammilata; most organs rough sketches are rudimentary and concentrated in the anterior part of the body, where brain sensory vesicle appears strongly pigmented; the notochord and caudal musculature assure the movement of the tail controlled by the nervous system.

Figures 2-3

Premières étapes de la métamorphose de *Ciona* et de *Phallusia*. La queue de la larve s'est complètement rétractée, réduite à une masse dense en cours de lente histolyse qui servira de réserve alimentaire à l'individu pendant plusieurs semaines ; au pôle antérieur, se forme une papille de fixation chez *Ciona* ; *Phallusia* possède trois papilles comme on le voit bien sur cette vue dorsale. Les ébauches des organes de la nouvelle ascidie sont aisément repérables.

Bulletin de la Société zoologique de France 143 (1)

First steps of metamorphosis in Ciona and Phallusia. The tail is completely retracted, and reduced to a dense mass which constitutes a source of nutriment for several weeks. The stud adhesive papilla is growing at the anterior pole of the young Ciona. Those papillae in Phallusia are three as can readily be seen in this dorsal view. Organ rudiments are clearly visible.

Figure 4

Ciona de 72 heures. La forme de l'ascidie devient facile à interpréter. **S** : siphon buccal ; **f** : dans la cavité atriale, deux fentes branchiales fonctionnelles ; **E** : endostyle. Nette résorption du matériel caudal larvaire. *Ciona, aged 72 hours. The shape of the ascidian is easy to interpret. Larval tail clearly being reabsorbed S: buccal siphon; f: two functional branchial splits appear in the atrial cavity; E: endostyle.*

Figure 5

Ciona 140-150 heures. Forte élévation du pédoncule de fixation. Tube digestif complexe, à segments distincts. Les fonctions ciliaires des branchies et les contractions cardiaques sont frappantes à ce stade. Notons que la tunique et les cellules testales sont repérables depuis le début de la métamorphose.

Ciona aged 140-150 hours. Strong elongation of fixation peduncle. Digestive tract appears complex with distinct segments. Beating of the branchial cilia and cardiac contractions are obvious at this stage. The tunica and the test cells are recognizable since the beginning of metamorphosis.

Figure 6

Phallusia 10^e jour. Vue polaire. On voit les deux siphons, buccal (**B**) et cloacal (**C**), et les restes de pigmentation cérébrale larvaire. Le complexe neural **N** est repérable ; il aboutit au niveau de la fossette vibratile **F**, au cercle péricoronal du pharynx (**P**).

Phallusia aged 10 days. Polar view, the buccal siphon (B) the cloacal siphon (C), and remains of larval cerebral pigmentation are visible. The neural complex (N) is visible and ends at the Anterior ciliated funnel (F) at the pericoronal circle of the pharynx (P).

Figure 7

Phallusia 18^e jour. Détail montrant la localisation de la fossette vibratile (**F**) et l'apparition de papilles sensorielles buccales. Autres repères cf. Fig. 6.

Phallusia aged 18 days. Location of the ciliated funnel (F) and formation of buccal sensory papillae.

Figure 8

Phallusia 18^e jour. Fragmentation de la pigmentation larvaire. Autres repères cf. Fig. 6.

Phallusia aged 18 days. Destruction of larval pigmentation. Same abbreviations as for Fig. 6.

Planche II (Plate II)

Exemples d'aberrations de développement induits par les goudrons.

Illustration du graphique n° 1.

Some examples of developmental disturbances induced by tobacco tar. Cf graph n°1.

Figure 1

Œuf vivant normal de *Phallusia* ; environ 100 μm . Il est entouré d'une couche régulière de cellules testales de 5 μm (**T**), séparées des cellules folliculeuses – 8 à 10 μm (**F**) – par un chorion anhiste fibreux.

Normal living egg of Phallusia; size about 100 μm . Test cells (T) (5 μm) form a regular layer round it (5 μm). The anhist fibrous chorion separates them from follicle cells (F) (8-10 μm).

Figure 2

Œuf traité par les goudrons de tabac en concentration relativement forte. Embryon fixé. Clivage très aberrant, "perlage" informe.

Egg treated with a relatively strong concentration of tobacco tar. Photograph after fixation. Abnormal cleavage with 'beading'. Blastomeres cannot be recognized.

Figure 3

Autre exemple où la couche de cellules testales survit en partie.

Another example in which the layer of test cells has partially survived.

Figure 4

Coupe d'un embryon traité de la même façon. Coloration trichromique. Grands désordres de cellules polynucléées ; quelques cellules testales (**T**) et chorion détruit (**Ch**). Aucune cellule folliculeuse.

Section of an embryo treated with tobacco tar. Trichromic staining. Important disorganisation of multinucleated cells; some test cells still survive (T) but the chorion (Ch) is destroyed. No follicular cell.

Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué

PLANCHE II

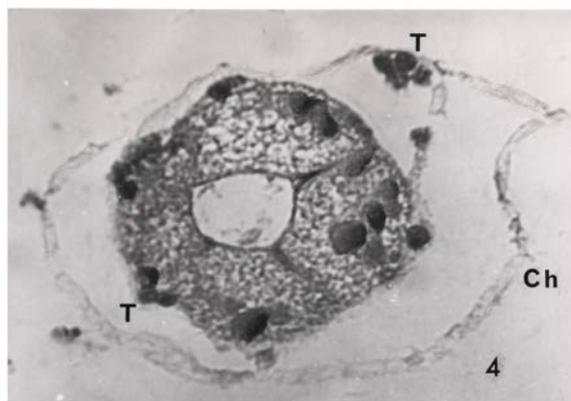
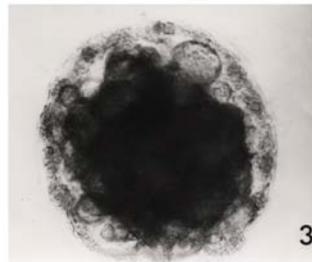
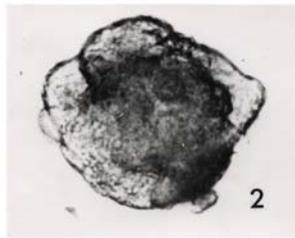
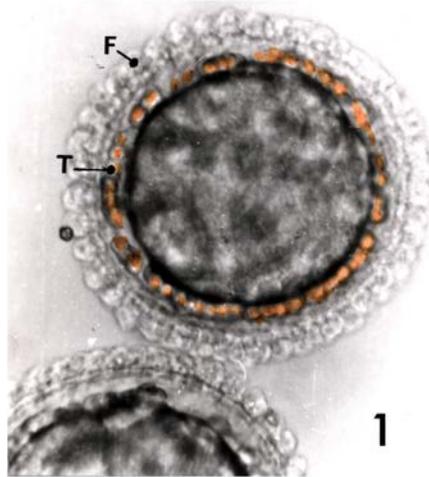


PLANCHE II (SUITE)

**Figure 5**

Embryons fixés entre 24 et 26 h après traitement par une solution moyennement concentrée de goudrons de tabac (sol. 3 de notre échelle – tabac). Quelques larves plus ou moins déformées ; la plupart des embryons sont très atrophiés, même si la vésicule cérébrale peut être mélanisée.

Fixed embryos 24-26 h after treatment with a weak concentration of tobacco tar (concentration 3 of our scale). Only a few larvae are strongly deformed, most other embryos are strongly atrophied, even though the cerebral vesicle may be melanized.

Figure 6

Larves vivantes de *Phallusia* traitées pendant 24 heures par une solution très faible de goudrons de tabac (sol. 2). Deux embryons morts depuis le début. La plupart des larves sont tordues. Un ou deux cas d'ébauche de métamorphose.

Living Phallusia larvae treated with a very low concentration of tobacco tar (concentration 2) for 24 hours. Most larvae show a twisted tail. Two embryos dead since start of the treatment. We note that metamorphosis has begun in one or two cases.

Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué

PLANCHE III

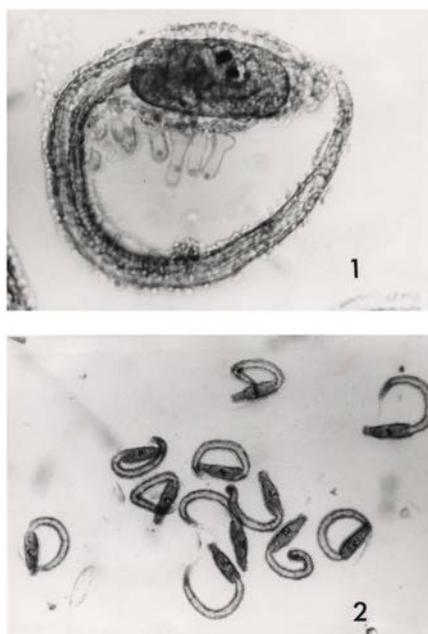


Planche III (Plate III)

Essais de compensation des effets du tabac *Attempts to compensate tobacco tar effects*

Acides aminés, AA, qui tendent à augmenter des effets du goudron de tabac. Exemples chez *Ciona* du tryptophane et de la cystéine. Cf. graph. 2-3.

Amino-acids, AA, which reinforce tobacco tar effects. Examples in Ciona: tryptophan and cystein. Cf. graph. 2-3.

Figure 1

Tabac + tryptophane : exemple après 48 heures. Tabac en concentration très faible (base 0 de nos graphiques) et tryptophane faible (niveau 2 de l'échelle de référence). Dans ce cas il y a 40 % de larves anormales contre 30 % avec le tabac seul. La photo montre une larve bloquée, à peine éclosue, encore tordue et immobile. Des cellules folliculeuses digitiformes – caractéristiques de l'œuf de *Ciona* – sont encore attachées à un reste de chorion.

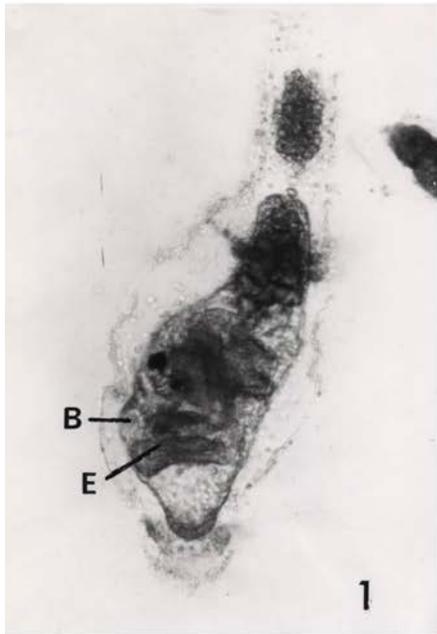
Tobacco + tryptophan: example after 48 h. Very low concentration of tobacco (base 0 of our graphs) and weak tryptophan concentrations (level 2 of our scale of reference). In this case, 40% of larva were abnormal, instead of 30% for tobacco alone. The photograph shows an arrested larva, just hatched, still curved and motionless. Finger-like follicular cells, typical of Ciona are still attached to chorial remains of the egg.

Figure 2

Tabac + cystéine : exemple après 48 heures. Même si les faibles concentrations de cystéine (niveau 1 ou 2 de notre échelle de référence) peuvent réduire quelque peu les anomalies larvaires, dès le niveau 3 de la concentration de cystéine, on voit sur cette image que l'intoxication augmente brutalement, induisant 95 % de troubles de l'éclosion avec larves tordues et immobiles. Au-delà, l'éclosion est bloquée et une métamorphose abortive se produit dans l'œuf.

Tobacco + cysteine: example after 48 h. Although low concentrations of cystein (level 1 or 2 of our scale) can reduce larval anomalies, level 3 of cysteine concentration shown here induces an abrupt increase of intoxication affecting 95% of larvae, which are clearly twisted and motionless. At stronger AA concentrations, eclosion is prevented and the metamorphosis in the eggs is aborted.

PLANCHE IV



Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué

Planche IV (Plate IV)

Principaux aspects de la métamorphose provoqués après action des goudrons de tabac seuls ou avec d'autres substances chez *Ciona*. *Remarkable aspects of metamorphosis induced in Ciona* *with tobacco tar with or without other substances.*

Acides aminés, AA, qui tendent à augmenter des effets du goudron de tabac. Exemples chez *Ciona* du tryptophane et de la cystéine. Cf. graph. 2-3.

Amino-acids, AA, which reinforce tobacco tar effects. Examples in Ciona: tryptophan and cystein. Cf. graph. 2-3.

Figure 1

Métamorphose équilibrée, observée 48 heures après la fécondation. Animal traité par le tabac et la glycine; aspect proche de celui des témoins. Cependant, perte d'une faible partie du matériel rétracté de la queue. Si les ébauches postérieures des différents organes ne sont pas encore interprétables, on distingue clairement le début de croissance du pédoncule, ou crampon de fixation, l'endostyle (E) et le siphon buccal (B).

Well-balanced metamorphosis observed 48h after fertilization and treatment with tobacco tar and glycine; the appearance is close to normal. However, there is loss of a little part of retracted caudal material. Although rudiments of hinf organs are not yet visible, the start of growth is clearly visible for the attachment papilla, as the endostyle (E) and buccal siphon (B).

Figure 2

Métamorphose crâniale obtenue 48h après fécondation. Animal traité par les goudrons et conjointement par la cystéine. Métamorphose caudale nulle, ébauchée au niveau du corps et très avancée au niveau du crampon. L'évolution antérieure et moyenne va se poursuivre sans atrophie caudale. Les ébauches d'organes sont bien repérables mais la jeune ascidie sera attardée et de petite taille.

Cranial metamorphosis observed 48 h after fertilization and treatment with tobacco tar and cystine. No caudal metamorphosis; the middle part of the body is already modified and the anterior attachment papilla is well developed. The development of the anterior and median regions continues without caudal atrophy, but the young ascidian will grow slowly and remain small.

Figure 3

Métamorphose caudale très avancée 48 heures après fécondation et traitement tabac plus cystéine (concentration 5 de notre échelle ; voir graphique 3 cystéine). En fait, on peut considérer que nous avons ici deux cas de métamorphose accélérée et non évolutive. Nota : la concentration 6 de cystéine provoquerait la mort des larves anormales sans ébauche de métamorphose.

Caudal metamorphosis is almost complete 48 h after fertilization and treatment with tobacco tar and cysteine (concentration 5 of our scale; cf. graphic 3: cysteine). It can be considered that these represent two examples of accelerated but not progressive metamorphosis. NB: concentration 6 of our scale, moreover, results in death of abnormal larvae before metamorphosis.

Figure 4

Début de métamorphose chez une larve traitée 48 heures par le tabac et l'asparagine ; la métamorphose de cet animal est lente et rendue difficile par l'existence d'une bulle œdémateuse à la base de la queue ; la rétraction de cette queue est amorcée, la corde est déjà en zig-zag. Seules les fortes concentrations (6) produisent cet œdème. Toutes les autres favorisent la métamorphose. Il n'y a jamais d'œdème chez des *Phallusia* ainsi traitées.

*Beginning of metamorphosis of a larva treated during 48 h with tobacco tar and asparagine. The metamorphosis is slow and partly hampered by an oedema localized at the base of the tail; the retraction of the tail has begun and we can see a strong torsion of cord and caudal muscle is zigzagged. Only strong asparagine concentrations (6) induce such aberrations; all others favor metamorphosis. No oedema has been observed with *Phallusia* treated in the same way.*

PLANCHE V

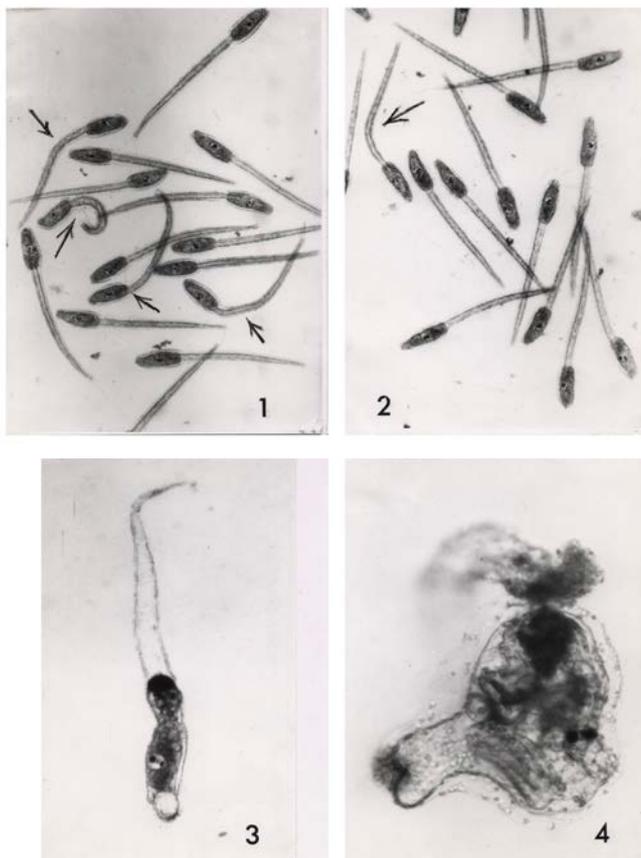


Planche V (Plate V)

Effets du Glucose / goudrons de tabac. Exemple de *Ciona*. Cf. graph. 6.*Effects of Glucose/tobacco tar on Ciona. Cf. graph. 6.*

Acides aminés, AA, qui tendent à augmenter des effets du goudron de tabac. Exemples chez *Ciona* du tryptophane et de la cystéine. Cf. graph. 2-3.

Amino-acids, AA, which reinforce tobacco tar effects. Examples in Ciona: tryptophan and cystein. Cf. graph. 2-3.

Figures 1 & 2

Larves observées vivantes 24 heures après fécondation et traitement des œufs. Le tabac seul, employé à la concentration de base, la plus faible, a provoqué, en moyenne, la torsion de la queue de 40 à 50 % des larves au bout de 24 heures. Le glucose, employé conjointement avec la solution de tabac, permet la formation de 70 à 100 % de larves normales (selon les concentrations de glucose employées).

Larvae observed alive 24 hours after fertilization and treatment of the eggs. Fig. 1: tobacco alone (initial, very low concentration) which, on average, induced twisting of 40 to 50% of larvae. Fig. 2: combined treatment with this same concentration of tobacco and glucose allows normal development in 70%-100% normal larvae (depending on glucose concentrations).

Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué

Figures 3 & 4 (p. 260)

Ciona de 72 heures. Dans le premier cas, employé seul, le goudron de tabac permet souvent une tentative de métamorphose avec rétraction de la queue assez avancée. Mais elle ne correspond même pas à un stade 48 heures normal. L'autre individu, qui a subi les effets du goudron mais aussi du glucose, rappelle un stade normal de 55-60 heures. Ainsi, le pédoncule de fixation est déjà long et le cœur, entre l'endostyle et l'estomac, battait nettement. Quelques restes du matériel caudal ont été cependant perdus.

Young Ciona at 72 h. Fig. 3: low concentration of tobacco tar which frequently allows the first steps of metamorphosis. Here, tail is retracted, but the animal has the appearance of a normal individual at 48h. As for the second animal (Fig. 4), treated with tar and glucose, it looks like an untreated larva at 55-60 h. So, the peduncle is rather elongated, and heart, between the endostyle and stomach was clearly functional. However, a little part of caudal material has been lost.

PLANCHE VI

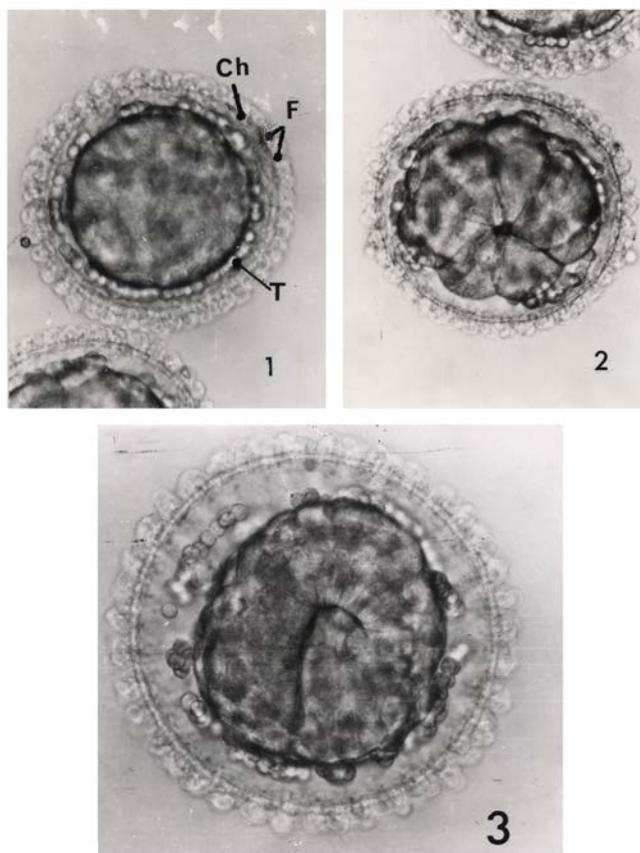


Planche VI (Plate VI)

Pour la discussion écologique centrée sur les cellules testales.

Trois photos d'œuf et d'embryons vivants de *Phallusia*. Les cellules testales. Fig. 1 à 3.

For ecological discussion where test cells are our base of reflection.

Three examples of egg and living embryos of *Phallusia*. Test cells. Fig. 1 to 3.

Bulletin de la Société zoologique de France 143 (1)

Figure 1

Œuf indivis (rappel). Entouré par les cellules testales (T), qui tapissent étroitement et très régulièrement l'œuf ; le chorion (Ch) et les cellules folliculeuses (F) forment un revêtement pavimenteux sans relief notable, contrairement à celui de *Ciona*, franchement échinulé.

*Egg just before cleavage. Test cells (T) cover the egg very tightly and regularly; the chorion membrane (Ch) and follicular cells (F) constitute a pavementous surface without relief, contrary to that of *Ciona*, which resembles a sea urchin.*

Figure 2

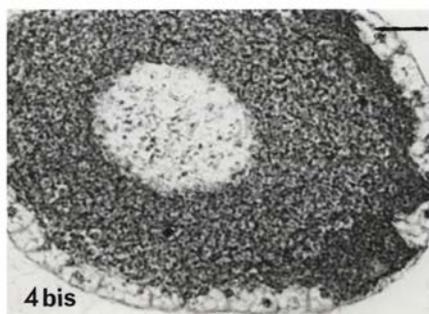
Morula ; cellules testales réparties par paquets.

Morula; test cells divided into packets.

Figure 3

Fin de gastrulation ; les paquets de cellules testales sont de plus en plus distincts.

End of gastrulation; test-cells packets are increasingly distinct.

**Figures 4 et 4 bis****Apparition des cellules testales avant fécondation**

Coupes histologiques dans l'ovaire de *Ciona*. La barre correspond à 12 μ m. Coloration trichromique pour observation optique. **Fig. 4** : très riche en matériel basophile, influencé par le nucléole, le cytoplasme de l'ovocyte jeune s'éclaircit lors de la vitellogenèse. En même temps les couronnes testales et folliculeuses s'individualisent. Les cellules testales grossissent et paraissent s'incruster dans l'ovocyte, alors que les folliculeuses, très claires deviennent volumineuses ; elles n'ont pas encore leur aspect digitiforme typique de *Ciona*. À plus fort grandissement (**Fig. 4bis**), les testales paraissent effectivement soudées à l'ovocyte et leur cytoplasme, très clair, aux limites imprécises, comporte d'énormes vacuoles.

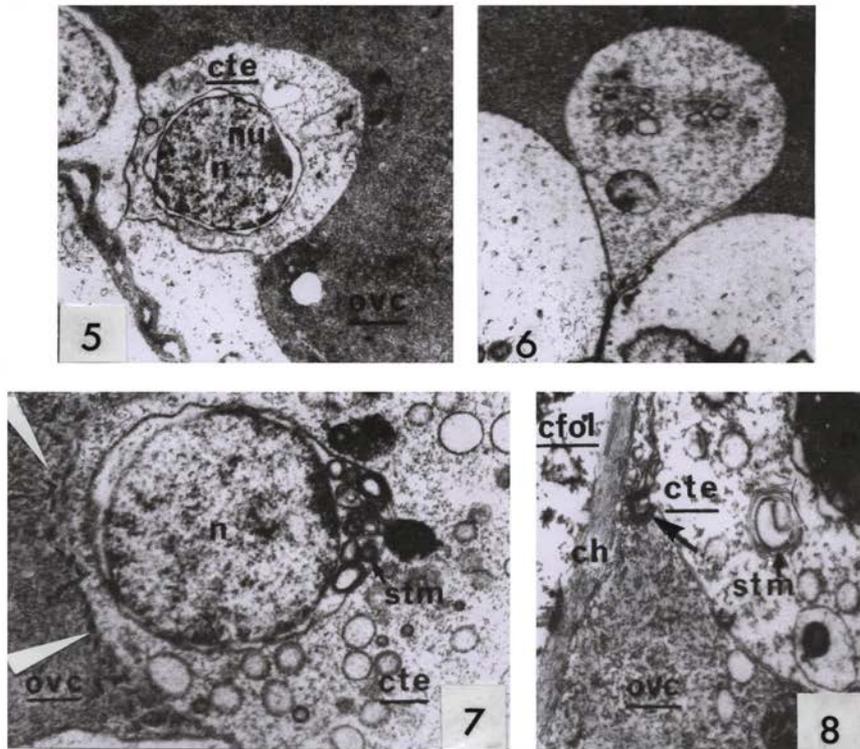
Appearance and aspect of test cells before fertilization

*The ovary of *Ciona*. Light microscopy of histology sections with trichromic staining. Scale bar 12 μ m.*

Fig. 4: the cytoplasm of the young oocyte is very rich in basophilic material. It becomes more clear during vitellogenesis. At the same time, two crowns of test cells and follicular cells are constituted. Test cells grow and seem to become incrustated into the oocyte; the clear follicular cells become very bulky, they do not yet have their digitiform appearance, as around which is typical of the egg of *Ciona*. **Fig. 4bis**: Test cells appear to be weld fused to the oocyte; their cytoplasm, formerly very clear with imprecise limits, contains enormous vacuoles.

Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué

PLANCHE VI (SUITE)

**Figures 5 et 6**

Histologie électronique comme toutes les vues suivantes. Suivant le plan de coupe, deux aspects de cellules testales (**cte**) incrustées dans l'ovocyte (**ovc**) et le noyau (**n**) n'apparaît en entier que dans la figure 5. *ME TEM views images like following ones. Dependent of section plan, two aspects of test cells (cte) incorporated into the cytoplasm of an oocyte (ovc); n: nucleus.*

Figure 7

Les cytoplasmes de l'ovocyte et d'une cellule testale paraissent être mêlés. Des restes de leurs membranes propres peuvent être grossièrement indiqués par des pointes de flèches blanches. Accumulation de corps denses et de vacuoles claires dans le cytoplasme et au sein de la double membrane nucléaire.

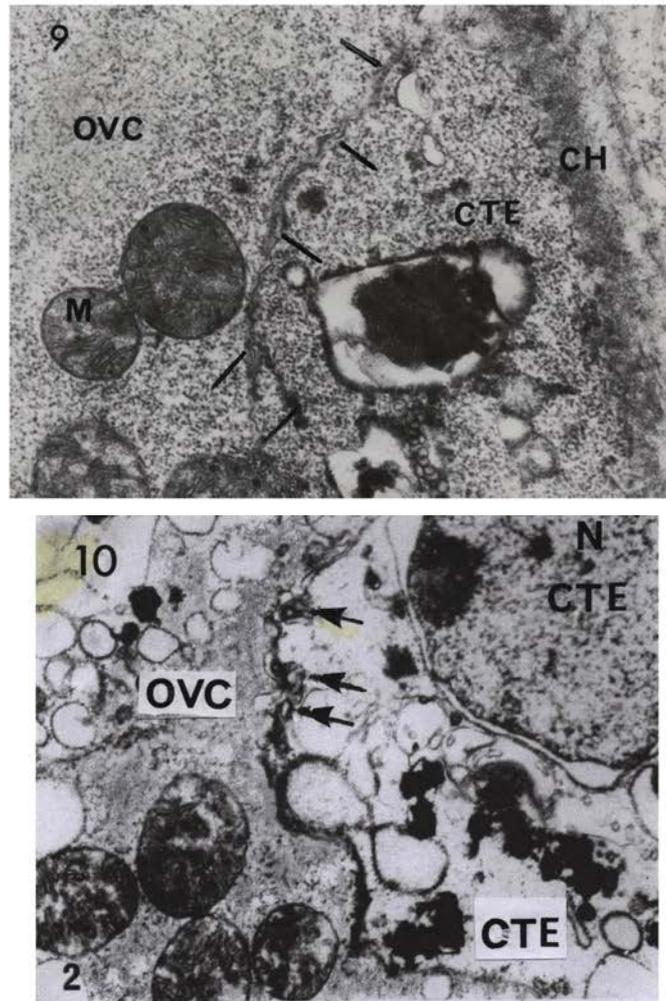
The TEM showing cytoplasm of the oocyte and of the test cell apparently mixed together. Remnants of their own membranes are indicated with white arrow-heads. Dense bodies and clear vacuoles have accumulated in the cytoplasm of test cell as even between the two layers of the nuclear membrane.

Figure 8

Image évoquant exocytose entre l'ovocyte et une cellule testale, **cte** (voir aussi fig. 10). **Ch** : chorion ; **cfol** : cellule folliculeuse ; **stm** : structures myéliniques.

*TEM image of exocytosis observed between oocyte cytoplasm and test cell (see also fig. 10). **ch**: chorion; **cfol**: follicular cell; **stm**: myelinic structures.*

PLANCHE VI (SUITE)

**Figure 9**

Autre aspect des contacts cellulaires. Les membranes ovocytaire et testale peuvent se détruire partiellement. Mais on souligne ici l'importance des vacuoles complexes, claires ou hétérogènes dans une cellule testale CTE. **M** : mitochondrie.

*Another TEM aspect of cell contacts between oocyte and test cells. Cell membranes can be partly destroyed. Note the diversity of complex vacuoles observed in a test cell CTE. **M**: mitochondrion.*

Figure 10

Très grande complexité du système vacuolaire et abondance des corps denses, informes, dans le cytoplasme d'une cellule testale incrustée dans un ovocyte mûr ; **N** : noyau de cette cellule. Des échanges trophiques sont évidents (fleches).

*TEM showing great complexity of vacuoles and abundance of dense bodies in the cytoplasm of a test cell (CTE); **N**: nucleus and a ripe oocyte bound together. Trophic relations and exchanges are highly probable (arrowed).*

Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué

PLANCHE VI (SUITE)

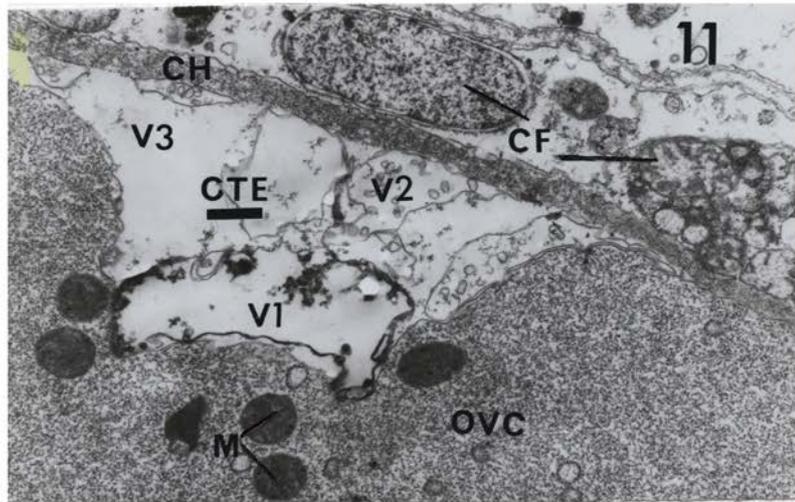


Figure 11

Dans le cytoplasme d'une cellule testale CTE, V1, V2 et V3 : vacuoles polymorphes lors de la reconstitution de sa membrane cytoplasmique et de celle de l'ovocyte. Après la fécondation toutes les cellules testales libèrent le contenu de leurs vacuoles sous le chorion. Elles pourront alors parcourir la surface de l'œuf (cf. photos des embryons vivants, fig. 1, 2 et 3), comme nous l'avons constaté en filmant image par image.

TEM showing polymorphic vacuoles (V1, V2 and V3) in the cytoplasm of a test cell (CTE), after reconstruction of its cytoplasmic membrane and that of the oocyte. After fertilization, all test cells release their vacuole contents under the chorion. This allows the test cells to travel round egg surface (cf. photos 1, 2 and 3), as we observed in our film.

Bulletin de la Société zoologique de France 143 (1)

Remerciements

C'est ici l'occasion pour les auteurs, MC honoraires UPS Paris-Sud Orsay, de remercier plus particulièrement le Professeur P. BOUGIS qui les a chaleureusement accueillis dans son laboratoire de Villefranche-sur-mer, où ils ont aussi bénéficié des conseils très éclairés de R. LALLIER, Dir. de Rech., attaché à la Station et spécialiste du développement de l'œuf d'oursin. Montrant clairement notre intérêt pour la Biologie marine, nous avons toujours été aidés avec beaucoup d'aménité par tous les chercheurs et techniciens.

À la Station marine de Villefranche, P. BOUGIS a mis à notre disposition un laboratoire permettant d'effectuer nombre de prises de vue photo-cinéma et, par ailleurs, une vaste salle évoquant une situation « en cave » dont la température ambiante, naturellement thermostatée, a toujours été comprise entre 17 et 20°C ; salle extrêmement pratique pour installer nos batteries expérimentales envahissantes. Qui plus est, le Professeur CACHON et son épouse, Dir. de Rech. à Nice, nous ont confié, dans leur propre stalle, leur microscope à fluorescence sur lequel nous avons très librement travaillé. Qu'ils en soient une fois encore remerciés.

RÉFÉRENCES

- BACQ, Z.M. & ALEXANDER, P. (1960).- *The initial effects of ionizing radiations on cells*. R.J.C. Harris, N.Y. Acad. Press, 654 p.
- BIEBER, S., DIETRICH, L.S., ELION, G.B., HITCHINGS, G.H. & MARTIN, D.S. (1961).- The incorporation of 6-mercaptapurine-S³⁵ into the nucleic acids of sensitive and non-sensitive transplantable mouse tumors. *Cancer Res.*, **21**, 228-231.
- BOUCHARD, J. (1959).- *Modifications histologiques, lors de la greffe bréphoplastique sous la capsule du rein de souris, de tissu pulmonaire imprégné de goudrons de tabac*. DES, Fac. Sc. de Paris, Labo. Anatomie Comparée, Orsay. 51 p. Présenté 10^e Congrès Biol. Cell., Paris 1961, par MAY, R.M. & BOUCHARD, J. Édité. Pathologie et Biologie (1961), 9, n° 5-6.
- BOUCHARD, J. (1965).- Action différentielle sur l'œuf d'ascidie du 3,4- ou du 1,2-benzopyrène, préalablement irradié ou non. *C. Rend. Soc. Biol.*, **159** (3), 540-544.
- BOUCHARD, J. (1966).- Influence du solvant sur l'activité, dans l'œuf d'ascidie, d'un hydrocarbure fluorescent, le benzopyrène. *C. Rend. Soc. Biol.*, **160** (3), 457-460.
- BOUCHARD, J. (1970).- Influence de la 6-mercaptapurine sur la mélanisation des taches sensorielles de larves d'ascidies. Antagonisme de bases pures. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, **111** (1), 23-30.
- BOUCHARD, J. (1971).- Sensibilité individuelle de tumeurs épidermiques traitées in vitro par un antimittotique : la colchicine. *Bull. Cancer*, **58** (4), 495-510.
- BOUCHARD, J. & BOUCHARD-MADRELLE, C. (1962).- Action des goudrons de tabac sur la segmentation des œufs d'*Ascidia* (Tuniciers). *Arch. Zool. Exp. Gén.*, **101** (2), 97-109.
- BOUCHARD, J. & BOUCHARD-MADRELLE, C. (1964).- Action comparée des goudrons de tabac et de diverses substances antimittotiques sur le développement des œufs de Tuniciers. 2. *Ciona intestinalis*. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, **104** (1), 23-37.
- BOUCHARD, J., BOUCHARD-MADRELLE, C. & MAY, R.M. (1964).- L'œuf d'ascidie : réactif biologique vis-à-vis d'antimitotiques et de cancérogènes. In : Volume jubilaire de Georges PETIT. *Vie et Milieu, Suppl.* n° 17, 419-430.
- BOUCHARD-MADRELLE, C. (1982).- *Étude de la structure, de la régénération du complexe neural et de l'ovaire de Ciona intestinalis L. (Tunicier Ascidiacé). Relations entre le complexe neural et la gonade*. Thèse d'État, UPS Orsay, fasc. I : 190 p + fasc. II : iconographie.
- CHABRY, L. (1887).- Contribution à l'embryologie normale et tératologique des ascidies simples. *Anat. Physiol.* (Paris), **23**, 167- 319.

Possibilità d'adattamento de la larve d'ascidie en milieu pollué

- CLONEY, R.A. (1961).- Observations on the mechanism of tail resorption in the Ascidiaceans. *Amer. Zool.*, **1**, 67-87.
- CLONEY, R.A. & CAVEY, M.J. (1982).- Ascidian larval tunic: extraembryonic structures influence morphogenesis. *Cell Tissue Res.*, **222** (3), 547-562.
- CONKLIN, E.G. (1905).- Mosaic development in ascidian egg. *J. Exp. Zool.*, **2**, 145-223.
- CUZIN, J. (1958).- Les machines à fumer des Laboratoires SEITA. 2° Congrès Sc. Internat., *Tabac*, **2**, 513-520.
- DAVIDSON, J.N. (1960).- Studies on the mechanism of action of 6-Mercaptopurine in sensitive and resistant L1210 leukemia *in vitro*. *Cancer Res.*, **20**, 225-232.
- DE LUCA, A., PIERNO, S. & CAMERINO, D.C. (2015).- Taurine: the appeal of a safe amino acid for muscle disorders. *J. Transl. Med.*, **13**, art. 243.
- DOLCEMASCOLO, G., DI BELLA, M.A. & GIANGUZZA, M. (2012).- *The hydrophilia of the larval test of Ascidiaceae: functional role played by test cells*. In "Current microscopy Contributions to Advances in Science and Technology". A. MENIEZ-VILAS ed., 439-444.
- FERRINI, U., MARCANTE, M.L., CAPUTO, A., MINAFRA, S. & REVERBERI, G. (1964).- Amino acids in the ovary of *Ciona intestinalis*. *Acta Embryol. Morphol. Exper.*, **6**, 283-288.
- FIASCONARO, A.M. (1965).- L'azione di analoghi della fenilalanina sullo sviluppo embrionale di ascidie. *Ricerca Scientif.*, **6**, n° 4, 387-397. (Consiglio Nazionale delle Ricerche).
- FLORKIN, M. & SCHOFFENIELS, E. (1969).- *Molecular approaches to ecology*. Academic Press, N.Y., I, 465 p.
- GRASSÉ, P.P. (1948).- *Les Ascidiacés*. In *Traité de Zoologie*, II, Masson et C^o éd.
- HONEGGER, T.G. & KOYANAGI, R. (2008).- The ascidian egg envelope in fertilization: structural and molecular features. *Int. J. Dev. Biol.*, **52**, 527-533.
- KENNAWAY, E. & LINDSEY, A.J. (1958).- Some possible exogenous factors in the causation of lung cancer. *Brit. Med. Bull.*, **14** (2), 124-131.
- LAMBERT, C.C. (2009).- Ascidian follicle cells multifunctional adjuncts to maturation and development. *Develop. Growth Differ.*, **51**, 677-686.
- LAMY, C. (2006).- *Détermination antéro-postérieure de l'ectoderme chez l'ascidie Ciona intestinalis*. Thèse Doctorat d'Université, Aix-Marseille, 166 p.
- LIU, L.P., XIANG-HAI, DONG BO, NATRAJAN PAVANASAM, YU KUI-JIE & CAI NAN-ER. (2006).- *Ciona intestinalis* as an emerging model organism: its regeneration under controlled conditions and methodology for egg dechoriation. *J. Zhejiang Univ.*, **7**, 467- 474.
- LUNETTA, G. (1960).- L'azione del 2,4-dinitrofenolo nello sviluppo dell'uovo di ascidia. *Rendiconti degli Istituti Scientifici della Università di Camerino*, **1** (3), 238-247.
- LUNETTA, G. (1961).- On the action of some uncoupling agents on the embryonic development of Ascidiaceans. *Acta Embryol. Morphol. Exper.*, **4**, 313-319.
- LYNCH, W.F. (1961).- Extrinsic factors influencing metamorphosis in bryozoan and ascidian larvae. *Amer. Zool.*, **1**, 59-66.
- MALLET, L. (1964).- *Pollutions par les hydrocarbures, en particulier du type 3-4 pyrène des rivages méditerranéens français*. Commiss. Internat. Exploration Scient. Mer Méditerranée. Symposium Poll. Mar. par Microorgan. 325 p.
- MANCUSO, V. (1956).- Faintly positive reaction of *Ciona intestinalis* egg studied with periodic acid Schiff. *Acta Embryol. Morphol. Exper.*, **2**, 151-162.
- MANCUSO, V. (1962).- L'uovo di *Ciona intestinalis* (Ascidia), allo stadio di 8 blastomeri osservato al microscopio elettronico. *Acta Embryol. Morphol. Exper.*, **5**, 32-50.
- MANCUSO, V. (1965).- An electron microscope study of the test cells of *Ciona intestinalis* during oogenesis. *Acta Embryol. Morphol. Exper.*, **8**, 239-266.

Bulletin de la Société zoologique de France 143 (1)

- MANSUETO, C. (1964).- Ricerche citologiche e citochimiche concernenti la oogenesis di *Ciona intestinalis* L. *Consiglio Nazionale delle Ricerche. Roma. Rendiconti B*, 4, n° 4, série 2, 529-542.
- MAY, R.M. & BOUCHARD, J. (1961).- Anomalies de mitoses consécutives à l'imprégnation de poumon de souriceau par des goudrons de tabac. *Pathol. Biol.*, 9 (5-6), 495-499.
- MICHIBATA, H., TERADATA, T., ANADA, N., YAMAKAWA, K. & NOMAKUNAI, T. (1986).- The accumulation and distribution of vanadium, iron and manganese in some solitary Ascidiens. *Biol. Bull.*, 171, 672-681.
- MORGAN, H.E. & PARMEGGIANI, A. (1964).- Regulation of glycogenolysis in muscle. III Control of muscle glycogen phosphorylase activity. *J. Biol. Chem.*, 239, 2435-2439 et 2440-2445.
- PATRICOLO, E. (1961).- The effects of fluoroacetate on the development of the ascidian egg. *Acta Embryol. Morphol. Exper.*, 4, 161-171.
- REVERBERI, G. (1965). – On the effects of some amino acids and their analogues on the embryonic development of the Ascidiens. *Acta Embryol. Morphol. Exper.*, 8, 132-140.
- REVERBERI, G. (1978).- Observations on the ultrastructure of the “test cells” of *Molgula impura*. *Acta Embryol. Morphol. Exper.*, 2, 229-245.
- REVERBERI, G. & MANCUSO, V. (1960).- The constituents of the egg of *Ciona intestinalis* (Ascidiens), as seen at the electron microscope. *Acta Embryol. Morphol. Exper.*, 3, 221-235.
- REVERBERI, U., MARCANTE, M.L., CAPUTO, A. MINAFRA, S. & REVERBERI, G. (1964).- Free amino acids in the egg of *Ciona intestinalis* during some development stages. *Consiglio Nazionale delle Ricerche – Roma ; extrait de : la Ricerca Scientifica*, 34, série 2, II B, 5, n°3, 213-220.
- ROCHE, J., VAN THOAI, N. & ROBIN, Y. (1957).- Sur la présence de créatine chez les invertébrés et sa signification. *Biochim. Biophys. Acta*, 24, 514-519.
- RUPPERT, E., FOX, R. & BARNES, R.D. (2004).- *Invertebrate Zoology. A functional evolutionary approach*. Brookes Cole Thomson ed., Belmont, C.A., 7th ed., 963 p.
- SATO, Y., TERAKADO, K. & MORISAWA, M. (1997).- Test cell migration and tunic formation during post-hatching development of the larva of the Ascidian *Ciona intestinalis*. *Develop. Growth Differ.*, 39, 117-126.
- SEGADO, F., COTA, C. AMBER, F. CHA, A. & DAVIDSON, B. (2016).- Fibronectin contributes to notochord interaction in the invertebrate chordate *Ciona intestinalis*. *Evo Devo*, 7, 25, (Bio Med Centr.).
- SELLIER, M., POITEVIN, P, GORAGUER, H., FAURE, J.M. & GOULLETGUER, P. (2014).- Suivi des espèces envahissantes marines à St Pierre et Miquelon – année 2013. *Assoc. de Recherche et Dévelop. Aquaculture (ARDA et IFREMER) et Directive de Territoires et de l’Alimentation de la Mer (DTAM)*.
- Squirt Conference. (october 29-31 2014).- The biology, biogeography, ecology and impact of invasive Ascidiens. Doc. Photos DAVIDSON, J. (UPEI), *Ciona intestinalis*. Prince Edward Island.
- TERROINE, E.F. (1960).- *Le métabolisme nucléaire*. Paris, CNRS Éd., 755 p.
- THOMPSON, A. & SHIMELD, S.M. (2015).- Transmission and scanning electron microscopy of the accessory cells of chorion during development of *Ciona intestinalis* type B embryos and the impact of their removal on cell morphology. *Zool. Sci.*, 32 (3), 217-222.
- UEKI, T., FUKUI, K. & MICHIBATA, H. (2003).- Analysis of metal binding activity of vanadium-linking proteins (vanabins) from an Ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*. 75th annual meeting of the Zoological Society of Japan. Sept. 17-19, Hakodate, Japan.
- WHITTAKER, J.R. (1966).- Anomalous differentiation of melanin granules caused by thiouracil. *Exp. Cell Res.*, 44, 351-351.

Possibilité d'adaptation de la larve d'ascidie en milieu pollué

- WHITTAKER, J.R. (1973).- Tyrosinase in the presumptive pigment cells of ascidian embryos : tyrosinase accessibility may initiate melanin synthesis. *Dev. Biol.*, **30**, 441-454.
- WHITTAKER, J.R. (1979).- Development of tail muscle acetylcholinesterase in ascidia embryos lacking mitochondrial localization and segregation. *Biol. Bull.*, **157**, 344-355.
- ZHINKIN, L. (1939).- Experimental studies on the larvae of Ascidia. *Acta Zool.*, **20**, 211-238.

(reçu le 25/03/2017 ; accepté le 17/12/2017)

mis en ligne le 29/03/2018