

**BULLETIN**

DU

**Musée royal d'Histoire  
naturelle de Belgique**

Tome XXI, n° 17.

Bruxelles, août 1945.

**MEDEDEELINGEN**

VAN HET

**Koninklijk Natuurhistorisch  
Museum van België**

Deel XXI, n° 17.

Brussel, Augustus 1945.

**ÉTUDE HISTOCHIMIQUE  
DES COQUES D'HYSTRICHOSPHERES,**

par André PASTIELS (Bruxelles).

**INTRODUCTION.**

I. — Le gisement des microfossiles examinés dans cette étude appartient au niveau de « l'Argile des Flandres », de l'étage yprésien de l'éocène inférieur. Les échantillons de sédiments ont été prélevés dans le revêtement argileux, yprésien, de la carrière du Blorquiau des exploitations de porphyre de Quenast, en Brabant. L'argile, compacte, plastique, de teinte gris-bleu, brune par altération présente les compositions moyennes suivantes :

a) Analyse générale (1) :

SiO <sub>2</sub> . . . . .	72,2 %
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> . . . . .	15,5
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> . . . . .	7,3
CaO . . . . .	0,5
MgO . . . . .	2,2
Alcalis et pertes. . . . .	2,3

---

 100,0 %

(1) Analyse obligeamment communiquée par la Soc. An. des Carrières de Quenast.

## b) Composition des minéraux lourds (2) :

Zircon . . . . .	31 %
Grenat. . . . .	23
Rutile . . . . .	18
Epidote . . . . .	14
Tourmaline . . . . .	7
Disthène . . . . .	3
Amphibole . . . . .	2
Andalousite . . . . .	1
Anatase . . . . .	1
Staurotide et Pyroxène . . .	

---

 100 %

## c) Teneur en sable obtenue par lévigation :

0,2 à 0,7 %

Ce sédiment, qui est un dépôt marin, s'est révélé très riche en microfossiles divers, à test en matière organique conservée, principalement en Hystriciosphères, et dont la description a été faite dans un mémoire du Musée, en cours de publication.

Ces microorganismes ont été isolés par une analyse mécanique, une sédimentation, qui a permis d'obtenir une fraction argileuse homogène, aux éléments de même dimension. Cette fraction fut traitée ensuite par l'acide fluorhydrique concentré (40 % H F.) additionné d'un peu d'eau dans un creuset de paraffine ou dans une capsule de platine.

La matière organique, séparée ainsi des particules minérales, s'accumula au fond du creuset. L'acide restant fut neutralisé aux alcalis, puis décanté, et les particules organiques concentrées en suspension liquide furent prélevées en vue des essais histochimiques réalisés sous le microscope.

II. — Différents chercheurs ont essayé de déterminer la nature chimique de la membrane constituant les coques d'Hystrichosphères et de retrouver par là leurs affinités animales ou végétales. Le seul résultat positif incontestable qu'ils aient obtenu fut d'établir son caractère organique.

W. WETZEL (3) a signalé et étudié, par des méthodes bien empiriques, la *nature organique* des débris inclus dans les silex.

(2) Analyse que je dois à l'amabilité de M. A. KONING.

(3) WETZEL, W., 1922, p. 54 et suiv.

O. WETZEL (4) le premier, isola les coques d'Hystrichosphères de leur gangue siliceuse des silex par l'acide fluorhydrique et reconnut par là qu'elles ne sont pas silicifiées. Il soumit également ces microfossiles à différents réactifs (acide sulfurique, nitrique et formique; chlorure de zinc iodé, naphтол) qui lui *prouvèrent* leur nature chimique (?) sans toutefois indiquer celle-ci.

A. EISENACK (5) a isolé les Hystrichosphères par l'acide fluorhydrique et essayé sur leurs coques, sans succès, les réactifs usuels de la chitine et de la cellulose. En 1938, cet auteur (6) a rapporté le comportement de la membrane de ces microorganismes à celui de la cutine ou à celui d'un corps voisin, sans que les réactions caractéristiques de cette substance se soient vérifiées.

G. DEFLANDRE (7), (8), (9) a effectué des recherches qui confirment les travaux de ses prédécesseurs et affirme que ces organismes ne sont pas silicifiés. Les essais auxquels il a procédé comportent principalement des colorations qui sont les premières effectuées sur de la matière organique conservée dans ces conditions. En conclusion d'une série d'essais, il écrit : « Ces résultats, nettement contradictoires sur certains points, me conduisent à conclure que les notions actuelles sur la microchimie des membranes celluloses, chitineuses ou de composition plus ou moins voisine, basées sur l'étude des corps existant chez les êtres vivants, ne peuvent pas être appliquées aux microfossiles planctoniques envisagés dans cette note (Hystrichosphères et Dinoflagellates des marnes jurassiques). D'une manière plus générale, l'état sous lequel se présentent les membranes des Dinoflagellés et des Hystrichosphères ne me semble correspondre exactement à aucun des constituants fondamentaux ou accessoires des parois cellulaires végétales telles que nous les connaissons aujourd'hui. Il serait donc absolument vain, dans ces conjectures, de se baser sur les résultats des réactions microchimiques et surtout des colorations, pour décider de l'attribution d'un microorganisme énigmatique à un

(4) WETZEL, O., 1933, p. 144.

(5) EISENACK, A., 1931, pp. 106-108.

(6) EISENACK, A., 1938, pp. 5-10.

(7) DEFLANDRE, G., 1934, pp. 966-968.

(8) DEFLANDRE, G., 1935, p. 217 et suiv.

(9) DEFLANDRE, G., 1938', pp. 854-856.

groupe donné plutôt qu'à un autre. Ces colorations démontrent seulement qu'on doit se garder de les interpréter comme s'il s'agissait de matériaux actuels. La signification des résultats, en apparence divergents, doit être recherchée en présupposant l'existence de composés devenus, par fossilisation, bien différents des celluloses et chitines actuellement connues; l'analyse microchimiques de ces matières organiques fossiles s'avère ainsi toute entière à créer » (10).

Plus récemment, M. LEJEUNE (11) a également utilisé l'acide fluorhydrique pour isoler les Hystrichosphères des silex et vérifier par là leur nature organique, sans toutefois procéder à des recherches systématiques.

La conclusion formelle de DEFLANDRE appelle une remarque importante. En paléobotanique, l'étude microchimique des substances organiques fossiles des charbons, des lignites et des tourbes (12), (13), montre qu'on peut leur appliquer *avec succès* certains réactifs histologiques usuels; *les mêmes* que ceux qui sont utilisés pour déceler ces substances sur des matériaux actuels.

Sans doute, ces réactions sont-elles irrégulières et liées alors à bien des facteurs que nous ignorons, mais il n'y a probablement, pour beaucoup d'entre elles, à trouver que des modalités de traitements. C'est peut-être le cas des Hystrichosphères.

Avec l'aide des données de la technique paléobotanique, j'ai entrepris, pour les raisons suivantes, de rechercher la nature des coques d'Hystrichosphères :

1° les différences d'âge et de conditions de fossilisation entre nos sédiments (argile éocène) et ceux étudiés par DEFLANDRE (marnes jurassiques et silex crétacés) pouvaient faire présumer de quelques variations dans le mode de conservation de la matière;

2° l'abondance des matériaux dont je disposais;

3° la présence, à côté de nombreuses coques d'Hystrichosphères, de Dinoflagellés et de grains de pollen, dont la nature chimique et le règne (végétal) sont connus, m'ont incité à faire l'analyse comparative de ces éléments conservés dans les mêmes conditions.

(10) DEFLANDRE, G., 1938, pp. 157-162.

(11) LEJEUNE, M., 1936, pp. 435-437.

(12) KRÆUSEL, R., 1929, pp. 75-78.

(13) POTONIE, R., 1924, pp. 212-219; 187-192; 162-166; 201.

## ÉTUDE HISTOCHIMIQUE.

Les réactions microchimiques effectuées sur les organismes provenant de l'argile de Quenast ont comporté principalement des essais aux acides, alcalis et oxydants, et des colorations histochimiques réputées électives des principales substances organiques des règnes animal et végétal. Ces colorations très nombreuses et répétées pour chaque colorant dans différentes conditions, ont porté sur une série de substances, constituants des membranes cellulaires.

Parmi les constituants chimiques des parois squelettiques cellulaires, on distingue des substances fondamentales et des substances accessoires bien connues des cytologistes (14), (15), (16).

Les premières sont répandues, soit dans tous les groupes végétaux, soit dans les groupes animaux, et apparaissent dès le début de la formation cellulaire; ce sont : les celluloses, les composés pectiques, la chitine et la callose, toutes substances du groupe des holosides qui se rencontrent seules ou le plus souvent associées entre elles ou à des constituants accessoires. Les secondes, plus ou moins répandues dans les tissus, n'apparaissent qu'ultérieurement, ce sont : les hémicelluloses, la cutine, la lignine et la subérine.

L'ordre des essais effectués est le suivant :

- 1) Recherche du caractère organique ou inorganique de la membrane.
- 2) Essais aux acides, bases et oxydants usuels.
- 3) Recherche de la chitine.
- 4) Recherche de la cellulose.
- 5) Recherche des composés pectiques.
- 6) Recherche de la callose.
- 7) Recherche de la lignine.
- 8) Recherche de la cutine et de la subérine.

D'une façon générale, les tests examinés ont demandé un traitement préalable, une fois isolés, pour devenir réceptifs aux colorants histochimiques. Outre la nécessité de « désincrus-

(14) GUILLIERMOND, A., MANGENOT, G., PLANTEFOL, L., 1933, pp. 358-363.

(15) LISON, L., 1923, pp. 233-236.

(16) MOLISH, H., 1923, pp. 335-358.

ter » (17) leur substance pour rendre à celle-ci sa susceptibilité maximum, l'emploi d'éclaircissants énergiques s'est révélé indispensable dans beaucoup de cas pour nettoyer les coques des corps étrangers qui y adhéraient, ou, quelquefois, pour les dépigmenter. Les meilleurs éclaircissants utilisés ont été l'acide nitrique, l'eau régale diluée, l'hypochlorite de soude, l'acide perchlorique et le diaphanol (acide chlordioxyacétique).

Une excellente méthode consiste à traiter les spécimens pendant un ou deux jours dans l'acide nitrique concentré ; après un lavage à l'eau, puis à un alcali dilué (20 %), les coques d'Hystrichosphères gonflent en expulsant tous leurs incrustats. Elles reprennent leurs dimensions et leur aspect normal dans une solution alcoolique ou saline. Les coques, débarrassées ainsi de toutes leurs impuretés, montrent une transparence parfaite.

#### 1) RECHERCHE DU CARACTÈRE ORGANIQUE OU INORGANIQUE DE LA MEMBRANE.

Par traitement au moyen d'une solution concentrée d'acide fluorhydrique, à froid ou à chaud, j'ai pu isoler les coques d'Hystrichosphères de l'argile et vérifier ainsi *qu'elles ne sont pas silicifiées* ni constituées d'une substance minérale courante.

Les fractions argileuses de l'opération de sédimentation traitées directement par l'acide, à froid, montrent après quelques jours la disparition des particules phylliteuses, et après plusieurs semaines, au cours desquelles l'acide est renouvelé deux ou trois fois la disparition des grains de quartz et d'autres minéraux. A chaud, l'opération effectuée dans une capsule d'argent ou de platine, au bain-marie, à la température de 60-70° C., demande trois ou quatre jours. Le résidu de cette dissolution consiste en coques d'Hystrichosphères, thèques de Dinoflagellés, grains de pollen et moules internes de Foraminifères accompagnés de débris végétaux.

La conservation des coques d'Hystrichosphères après ce traitement, le phénomène de gonflement qu'elles présentent après le traitement aux oxydants et bases, leur élasticité, la grande facilité avec laquelle elles se plissent ou se déchirent au cours des manipulations font présumer avec une quasi certitude du *caractère organique de leur membrane*.

#### 2) ESSAIS AUX ACIDES, BASES ET OXYDANTS USUELS.

L'action directe de bases concentrées ou diluées (soude, potasse caustique, ammoniaque) ne montre aucune transfor-

(17) Au sens chimique.

mation directement visible. L'emploi de la potasse caustique concentrée rend les membranes plus fragiles et facilement déchirables.

Les acides chlorhydrique, sulfurique et nitrique, employés soit concentrés soit dilués, et, après une durée d'action variable, n'ont montré aucune transformation ou attaque chimique directement visible. L'acide nitrique, à différentes concentrations, pur ou mélangé à d'autres oxydants (liqueur de SCHULZE) exerce une action latente qui se révèle après traitement par une solution alcaline suivie d'un lavage à l'eau. Les membranes gonflent uniformément (en moyenne, d'un tiers à un septième de leur rayon) par l'action de l'hypochlorite de sodium ou de la soude caustique (20 %) ; le phénomène est moins marqué avec l'ammoniaque. Après traitement par l'acide sulfurique, quelques spécimens de *H. articulatum* lavés, puis imprégnés au lugol ou au chlorure de zinc iodé ont montré un dessin superficiel réticulé, polygonal, assez grossier. Cet aspect se maintient après lavage alors que la teinte brune temporaire, due à l'iode, a disparu. L'irrégularité du phénomène peut faire penser qu'il s'agit là d'un artéfact mais rien ne le prouve.

### 3) RECHERCHE DE LA CHITINE.

SCHMIDT, dans l'étude des membranes cellulaires végétales, et SCHULZE dans celle des membranes animales, ont posé comme hypothèse qu'elles seraient constituées les unes et les autres d'une substance fondamentale, cellulose ou chitine, principalement, en liaison avec d'autres substances « incrustantes » qui masquent les premières. D'où la nécessité pour mettre en évidence la substance principale de la démasquer, de la débarrasser de ses incrustes par l'action d'agents éclaircissants énergiques, tels que les oxydants (Traitement standard : acide nitrique — soude caustique, acide perchlorique, diaphanol). Ces agents d'éclaircissement et de dépigmentation ont été employés systématiquement dans la recherche de la chitine, de la cellulose et de la callose. La chitine, substance cuticulaire des invertébrés, se rencontre également chez certains Protistes et Champignons. C'est un polysaccharide azoté dont la recherche sur des petits corps est difficile de par le caractère brutal des méthodes proposées,

Propriétés de la chitine qui ont été recherchées	Résultats obtenus
Insolubilité dans : les <i>acides minéraux dilués</i> . . . . .	(+)
les <i>alcalis concentrés</i> . . . . .	(+)
le <i>réactif de SCHWEIZER</i> . . . . .	(+)
Solubilité dans : les <i>acides minéraux concentrés</i> . . . . .	(—)
l' <i>hypochlorite de sodium concentré</i> . . . . .	(—)
<i>Réaction de BRUNSWICK</i> . . . . .	(—)
<i>Coloration de la chitosane</i> . . . . .	(—)
<i>Réaction de SCHULZE au diaphanol-chlorure de zinc-iodé</i> :	

La réaction de SCHULZE caractérise la chitine et la cellulose par la teinte violette qu'elle confère à ces deux substances. L'essai au lugol et à l'acide sulfurique (réact. DE RUSSOW) permet ensuite de différencier ces deux substances en colorant la cellulose en bleu et la chitine en brun plus ou moins foncé. Essais de cette double coloration . . . . . (—)

D'après R. POTONIE (18) les chitines fossiles du Tertiaire sont en général bien conservées, et, après traitement au diaphanol, elles répondent positivement à la réaction de SCHULZE. Pour ce chercheur, il reste encore à trouver une bonne réaction différentielle chitine-cellulose. D'après cet auteur, la chitine du jais se colore par le vert lumière ; or, dans l'essai que j'ai entrepris sur mon matériel, le résultat obtenu a été négatif.

#### 4) RECHERCHE DE LA CELLULOSE.

« D'une manière générale, les réactions de la cellulose ne se manifestent clairement qu'après transformation de cette substance sous l'influence des chlorures métalliques, des acides minéraux et surtout des alcalis caustiques » (19). Ces agents transforment la cellulose en hydrocelluloses sensibles aux solutions iodées. Il est également nécessaire, lorsqu'on la suppose imprégnée de substances incrustantes, lignine, etc., de la « démasquer » par l'action d'éclaircissants. Les réactions colorées de la cellulose ont été effectuées après le traitement standard et par le diaphanol quand le résultat des premiers essais fut négatif.

(18) POTONIE, R., 1924, p. 201.

(19) LANGERON, M., 1942, p. 1275.



Propriétés de la cellulose qui ont été recherchées	Résultats obtenus
Résistance aux <i>alcalis dilués</i> . . . . .	(+)
aux <i>acides dilués</i> . . . . .	(+)
à la <i>macération de SCHULZE</i> . . . . .	(+)
Les agents oxydants transforment la cellulose en alcalis-celluloses solubles dans les alcalis:	
Phénomène du gonflement . . . . .	(?)
Solubilité dans: le <i>chlorure de zinc</i> . . . . .	(—)
<i>l'acide chlorhydrique concentré</i> . . . . .	(—)
la <i>liqueur de SCHWEIZER</i> . . . . .	(—)
Essais des colorants iodés:	
Coloration de la cellulose par: le <i>chlorure de zinc iodé</i> . . . . .	(—)
<i>l'acide phosphorique iodé</i> . . . . .	(—)
la <i>réaction de RUSSOW</i> . . . . .	(—)
Essais des colorants non iodés pour lesquels la cellulose est reconnue ne présenter qu'une faible affinité:	
En bain acide faible, coloration par: <i>l'orseilline</i> . . . . .	(+)
le <i>noir naphтол</i> . . . . .	(—)
En bain alcalin, coloration par:	
le <i>rouge congo ammoniacal</i> . . . . .	(+,—)
le <i>sel sodique de l'acide rosolique</i> . . . . .	(—)
<i>l'azurine potassique</i> . . . . .	(—)
le <i>bleu de toluidine</i> . . . . .	(+)
La cellulose est reconnue présenter une affinité forte pour ces colorants.	
Non coloration par <i>l'éosine alcoolique</i> . . . . .	(—)
<i>l'érythrosine</i> . . . . .	(+)
la <i>fuchsine ammoniacale</i> . . . . .	(—)
la <i>safranine alcoolique</i> . . . . .	(—)
le <i>rouge neutre</i> . . . . .	(—)
le <i>bleu de méthylène</i> . . . . .	(—)
colorants habituellement refusés par la cellulose.	
Coloration par actions successives de solutions saturées d' <i>acétate de plomb</i> et de <i>bichromate de potassium</i> . . . . .	(+)

La cellulose pure ne se rencontre qu'exceptionnellement à l'état fossile. En liaison avec la lignine, la cutine et la subérine, elle se rencontre fréquemment dans les lignites et charbons où elle est généralement décelable par le réactif de SCHWEIZER et les solutions iodées. La solution de chlorure de zinc iodé colore la cellulose en bleu, violet ou rouge, d'une façon très variable, mais l'emploi de l'acide sulfurique et de l'iode (réact. DE RUSROW) lui confère régulièrement une coloration bleue. Ces réactions ne se manifestent clairement qu'après l'action des agents oxydants et particulièrement de la potasse caustique.

La lignine et la subérine associées à la cellulose fossile sont facilement détruites par oxydation et permettent les réactions de celle-ci.

La cutine, dans la plupart des cas, empêche les colorations par les solutions iodées. Chitine et celluloses fossiles se distinguent très difficilement.

#### 5) RECHERCHE DES COMPOSÉS PECTIQUES.

Propriétés des composés pectiques qui ont été <u>recherchés.</u>	Résultats <u>obtenus</u>
Colorations en milieu neutre ou très faiblement acide.	
Colorations par la <i>safranine</i> . . . . .	(—)
le <i>bleu de méthylène</i> . . . . .	(—)
le <i>rouge de ruthénium</i> . . . . .	(+)
le <i>rouge neutre</i> . . . . .	(+)
Les composés pectiques ne sont pas colorés par :	
les <i>mélanges iodés</i> . . . . .	(+)
le <i>rouge congo ammoniacal</i> . . . . .	(+)

Les composés pectiques, pectose des tissus jeunes et pectates des tissus adultes et vieux, n'ont jamais été signalés à l'état fossile.

#### 6) RECHERCHE DE LA CALLOSE.

La callose est essentiellement caractérisée par ses propriétés microchimiques. Comme la cellulose, elle ne manifeste pas toujours directement les réactions colorantes, mais demande souvent à subir un traitement préalable par les agents oxydants ou par les alcalis caustiques pour la ramener à un état d'agrégation plus faible où sa réceptivité est optimum.

Propriétés de la callose qui ont été recherchées	Résultats obtenus
Insolubilité dans l'eau . . . . .	(+)
l'alcool . . . . .	(+)
la liqueur de SCHWEIZER . . . . .	(+)
Insolubilité dans l'ammoniaque, qui la gonfle et lui communique une consistance gélatineuse:	
Phénomène du « gonflement » . . . . .	(?)
Solubilité forte dans: la soude caustique . . . . .	(—)
la potasse caustique . . . . .	(—)
l'acide sulfurique . . . . .	(—)
le chlorure de calcium . . . . .	(—)
le bichlorure d'étain concentré . . . . .	(—)
Essais des colorants iodés:	
Coloration par:	
le chlorure de zinc iodé . . . . .	(—)
la réaction de RUSROW . . . . .	(—)
l'acide phosphorique iodé . . . . .	(—)
Après action du diaphanol, coloration par:	
le chlorure de zinc iodé . . . . .	(—)
la réaction de RUSROW . . . . .	(—)
l'acide phosphorique iodé . . . . .	(—)
Les coques internes des <i>Ceratium</i> enkystés et d' <i>H. articulatum</i> prennent faiblement l'iode sous cette forme et montrent une coloration jaune d'or pâle.	
Essais des colorants non iodés:	
Coloration par:	
le bleu coton . . . . .	(+)
le picro bleu coton . . . . .	(+)
le bleu à l'eau . . . . .	(+)
le sel sodique de l'acide rosolique	
après action du diaphanol . . . . .	(—)

La callose n'a jamais été signalée à ma connaissance à l'état fossile.

#### 7) RECHERCHE DE LA LIGNINE.

Parmi les réactions de colorations des membranes lignifiées, les unes sont spécifiques de cette substance, d'autres communes aussi à la cutine et à la subérine (=).

Propriétés de la lignine qui ont été recherchées	Résultats obtenus
Réactions caractéristiques de la lignification.	
Coloration par :	
le vert lumière . . . . .	(—)
la phloroglucine chlorhydrique . . . . .	(—)
le sulfate d'aniline . . . . .	(—)
la fuchsine ammoniacale (=) . . . . .	(+)
la réaction de MAUL . . . . .	(—)
le 4' amino-benzol sulfone acétamide (20) . . . . .	(—)

#### Réactions non électives de la lignification.

##### Coloration par :

le vert d'iode (+) . . . . .	(+)
le vert de méthyle . . . . .	(+)
le vert malachite . . . . .	(+)
le bleu de méthylène (+) . . . . .	(+)
la safranine (+) . . . . .	(+)
le réactif genevois . . . . .	(+)
le violet de gentiane . . . . .	(+)

Suivant leur mode d'action les réactifs de la lignine se répartissent comme suit (21) :

Réactifs agissant sur la lignine : phloroglucine chlorhydrique et sulfate d'aniline.

Réactifs agissant sur les composés azotés qui accompagnent la lignine : iode, fuchsine ammoniacale, vert d'iode, réactif genevois.

Réactifs agissant sur les produits d'oxydation de la lignine : réactif de MAUL.

Les membranes lignifiées fossiles se prêtent dans certains cas à l'examen microchimique. D'après R. POTONIE (22), seuls les matériaux récents, tourbes et lignites quaternaires permettent la recherche de la lignine. Ce n'est pas le cas pour les tissus lignifiés des houilles carbonifères. Ces examens doivent être entrepris sans macérations préalables par les oxydants. Alors, les réactions classiques, phloroglucine chlorhydrique,

(20) CORTESI, R., 1940, pp. 270-272.

(21) COUPIN, H., 1909, pp. 71-74.

(22) POTONIE, R., 1924, pp. 187-192.

sulfate d'aniline et résorcine sont généralement positives. La réaction de MAUL, au permanganate-acide chlorhydrique, est souvent difficile à cause de la superposition d'une teinte rouge aux membranes lignifiées souvent brunâtres. On peut alors remplacer la solution de permanganate par le réactif de HOFFMEISTER (acide chlorhydrique-chlorate de potasse) ou un autre oxydant. Cette réaction est positive pour les lignines; toutefois les épidermes et les spores (cutine) prennent aussi parfois la coloration. Le rhodanate de cobalt, d'après R. KRÆUSEL (23) colore la lignine en bleu d'une façon sûre et régulière; par suite de la teinte brune des tissus lignifiés, ceux-ci paraissent violacés.

#### 8) RECHERCHE DE LA SUBÉRINE ET DE LA CUTINE.

Pour isoler des membranes les tissus subérifiés et cutinisés, il est nécessaire de les traiter au préalable par des oxydants forts. J'ai utilisé dans ce but l'acide nitrique (traitement standard) et le mélange chromique (acide sulfurique — acide chromique).

Propriétés de la subérine qui ont été recherchées.	Résultats obtenus
Insolubilité dans le réactif de SCHWEIZER. . . . .	(+)
Résistance à l'acide chromique concentré . . . . .	(+)
l'acide sulfurique . . . . .	(+)
Réaction de HOHNEL . . . . .	(—)
Réaction de GILSON . . . . .	(—)
Réaction de VAN WISSELINGH . . . . .	(—)
Coloration par: le vert d'iode . . . . .	(+)
la fuchsine ammoniacale . . . . .	(+)
le soudan III . . . . .	(—)
Coloration élective par le violet de gentiane ammoniacal	(—)

Le violet de gentiane, le vert acide, la chlorophylle et le soudan III conviennent pour la coloration des parois cellulaires conservées à l'état fossile.

Propriétés de la cutine qui ont été recherchées	Résultats obtenus
La cutine présente à peu près les mêmes réactions que la subérine:	
Coloration par: le vert d'iode . . . . .	(+)
la fuchsine ammoniacale . . . . .	(+)

(23) KRÆUSEL, R., 1929, p. 76.

(24) JENTYS-SZAFER, 1928, p. 81.

le chlorure de zinc iodé. . . . . (—)  
 la réaction de Russow . . . . . (—)

Les membranes cutinisées et, particulièrement, celles constituant l'exine des grains de pollen (24) se colorent également par :

le bleu de méthylène . . . . . (+)  
 la safranine . . . . . (+)  
 la chlorophylle . . . . . (—)

Seul le traitement à la glycérine-acide chromique permet de distinguer la cutine de la subérine. Recherche de la cutine . . . . . (+)

Liège et cutine fossiles récentes se comportent assez semblablement. Parmi les colorants, les solutions iodées, le violet de gentiane, le vert acide, la chlorophylle et le soudan III sont employés avec succès pour colorer ces tissus. L'essai glycérine-acide chromique reste une bonne réaction différentielle. D'une façon générale, la cutine est plus résistante que le liège et peut même être déceiée dans les charbons peu évolués (25).

#### RECHERCHE DE L'INDICE DE RÉFRACTION DES COQUES D'HYSTRICHOSPHERES.

J'ai mesuré l'indice de réfraction d'une coque d'*Hystrichosphaeridium salpingophorum* par l'examen du déplacement de la frange de Beck dans une série de liqueurs d'indice différent.

Le milieu liquide utilisé, dont l'indice était le plus voisin de celui de la coque examinée, était un mélange de nitro-benzène et d'ester qui nous a permis de fixer l'indice de réfraction d'*Hystrichosphaeridium salpingophorum* à  $1,56 \pm 0,005$ . Ce chiffre est inférieur à la première estimation faite par G. DEFLANDRE (26) pour les coques d'Hystrichosphaeridées. D'après ATSUKI et OKAJIMA (27), l'indice de différentes celluloses examinées par eux varie de 1,515 à 1,595. L'écart de ces valeurs est trop grand pour utiliser ces données comme cadre de détermination. D'autre part, l'indice de la lignine, qui est de 1,61 paraît trop élevé pour correspondre à celui des coques étudiées.

Pour employer utilement la méthode de mesure de l'indice de réfraction, on manque de données exactes se rapportant à des substances animales ou végétales pures et bien précisées.

(25) LEGRAYE, M., 1932, pp. 49-53.

(26) DEFLANDRE, G., 1938, p. 161.

(27) ATSUKI et OKJIMA, 1937, p. 360 in DEFLANDRE, G., 1938.

## CONCLUSIONS.

Les conclusions à tirer de l'étude histochimique des coques d'Hystrichosphères sont délicates; les résultats des essais effectués n'autorisent aucune déduction formelle.

La nature organique de ces tests admise, la recherche des constituants des membranes cellulaires, telles que nous les connaissons actuellement, n'a montré pour aucune de celles-ci un ensemble de caractères positifs. Les essais de colorations, réputées électives, présentent même des caractères contradictoires.

Toutefois, un certain nombre de constatations importantes, qui demandent un examen critique, ont été faites:

1. La résistance aux réactifs d'attaque chimique, oxydants et solvants alcalins, s'est montrée très grande pour les trois groupes d'objets étudiés: pollens, Dinoflagellés, Hystrichosphères.

2. Les colorants acceptés par les coques d'Hystrichosphères ont coloré celles-ci d'une façon uniforme et régulière. Rien ne me permet de supposer qu'elles soient constituées de régions différentes par leur nature ou que les membranes des coques soient formées de l'association d'une substance fondamentale et d'une substance accessoire.

3. Le phénomène de « gonflement » est très caractéristique des microorganisme étudiés et se produit également, à des nuances d'intensité près, pour les trois groupes examinés.

4. L'observation la plus importante, et qui complète en quelque sorte les constatations précitées, est le *comportement identique* vis-à-vis des réactifs essayés des grains de pollen, thèques de Dinoflagellés et coques d'Hystrichosphères.

Comme interpréter ces faits ?

La grande résistance des tests vis-à-vis des réactifs essayés ne trouve pas d'explication immédiate. Il se pourrait que le vieillissement des coques, après enfouissement, se soit fait dans des conditions très bonnes pour la protection de celles-ci, et dues à la compacité et à l'imperméabilité de l'argile. La matière organique aurait évolué à l'abri des agents extérieurs et des altérations presque en vase clos, et aurait atteint ainsi un degré d'agrégation élevé (Polymérisation).

La grande résistance de ces tests semble exclure, à priori, pour leur composition un certain nombre de constituants cellulaires fragiles peu ou pas connus à l'état fossile: la callose, les hémicelluloses et les composés pectiques. La chitine, les cellu-

loses, la cutine et la subérine, qui présentent une bonne résistance aux altérations, sont connues dans des sédiments anciens d'âge varié.

La callose, qui existe d'après MANGIN sous différents aspects, serait une substance assez voisine des celluloses. Connue dans les tissus épidermiques de Phanérogames, dans les pollens de Conifères et de Cypéracées, elle est également abondante chez les Thallophytes. Les filaments mycéliens et les organes de fructification des champignons, particulièrement des Péronosporées, en recèlent assez bien. Elle est présente aussi dans les membranes de Lichens et de Mucorinées. La callose n'a pas été signalée à l'état fossile. Sa très faible résistance vis-à-vis des alcalis semble exclure sa présence dans les tests étudiés.

Les hémicelluloses sont des holosides peu condensés, peu résistants à l'hydrolyse et aux lessives caustiques. On peut les considérer comme des celluloses à l'état naissant (28). Ces substances sont connues dans les membranes de nombreuses graines, dans les tubes criblés et le liber des Phanérogames, chez les algues, dans les parois des spores de champignons et de Mucorinées. Ce sont souvent des substances de réserve, fragiles, qui ne doivent pas se conserver à l'état fossile.

Les composés pectiques (pectose des tissus jeunes unis à la cellulose et aux pectates intercellulaires des tissus vieux) sont des substances colloïdales, plus ou moins solubles dans l'eau et facilement altérables, non susceptibles, semble-t-il, de fossilisation.

La subérine offre une assez bonne résistance aux réactifs d'attaque et est connue comme liège dans les sédiments anciens. Cette substance joue un rôle protecteur dans les tissus vieux des branches et racines; elle ne semble pas devoir trouver place dans les membranes des organes ou organismes étudiés.

Chitine, celluloses et cutine offrent une assez grande résistance aux attaques chimiques et se fossilisent bien. Par là leurs chances sont égales, de ce seul point de vue, pour avoir participé à la constitution des coques d'Hystriosphères.

Les celluloses, caractérisées par l'état de condensation de leur molécule et subséquentement par leur résistance aux agents chimiques, présentent le groupe des oxycelluloses (29) comme répondant le mieux aux caractères des celluloses fossiles. La cu-

(28) DUPARQUE, A., 1927, p. 408.

(29) DUPARQUE, A., 1927, p. 410.



tine, par son rôle essentiellement protecteur, est la mieux adaptée des substances membraneuses à la conservation fossile. La grande résistance des coques d'Hystrichosphères rappelle celle de la cutine.

Les colorations effectuées se sont montrées uniformes et régulières sur toutes les parties du test. Les coques d'Hystrichosphères semblent donc bien composées d'une seule couche. Jamais je n'ai observé la séparation physique de couches lamelleuses différentes ou des colorations différentes suivant les régions du test. La coloration des substances diverses d'une même pièce est obtenue habituellement par des mélanges de colorants, suivis de différenciations et de lavages appropriés. Ces nombreuses opérations sont pratiquement irréalisables sur des microfossiles, mais elles vérifieraient ou non la valeur de notre observation.

Une interprétation du phénomène de « gonflement » qui me paraît plausible est la suivante. Dans l'hypothèse d'une composition cellulosique des coques d'Hystrichosphères, leur test comme ceux des Péridiniens, serait composé d'oxy- ou d'hydro-cellulose (30). En ce cas l'action d'un agent oxydant dégrade la molécule à un état d'agrégation plus faible. L'action d'une solution alcaline aqueuse, puis aqueuse seule forme une combinaison hydratée de la cellulose (hydracellulose) avec gonflement de cette substance. Il me semble pas qu'il y ait au cours de cette transformation, chez les Hystrichosphères, formation d'alcalis-celluloses, c'est-à-dire formation de celluloses solubles dans les alcalis. Le gonfiement et le dégonfiement des coques peut être répétés de nombreuses fois sans qu'il y ait, apparemment, perte de substance par dissolution dans l'alcali. Il faut noter toutefois que le gonflement est d'autant plus prononcé que la solution alcaline est plus concentrée et son action plus prolongée. Le gonflement des grains de pollen est moins prononcé.

D'après E. STRASBURGER (31), l'exine des grains de pollen est une membrane cutinisée; l'intine étant composée, d'après L. MANGIN (32), de substances pectiques et de cellulose. Ce schéma de structure serait variable pour J. JENTYS-SZAFER (33). Cet auteur a vérifié avec soin l'assimilation de l'exine à la

(30) DUPARQUE, A., 1927, pp. 405-410.

(31) STRASBURGER, E., 1897, pp. 525-527.

(32) MANGIN, L., 1889, p. 283.

(33) JENTYS-SZAFER, 1923, p. 73.

cutine et l'a confirmée; par contre, il n'a jamais pu déceler la présence de cellulose dans les espèces qu'il a étudiées. Nos connaissances sur l'état des membranes de pollens fossiles et leurs réactions chimiques sont trop peu développées pour qu'il soit possible d'interpréter leur gonflement après le traitement auquel ils ont été soumis.

Le comportement identique des pollens, Hystrichosphères et Dinoflagellés, comparées à celles des réactifs essayés est, dans l'état actuel de nos connaissances tout aussi difficile à expliquer. Indépendamment de la valeur spécifique des colorants essayés, leurs réactions vis-à-vis de membranes originellement très différentes, comme celles des Dinoflagellés et des pollens, montrent que leurs substances, cellulose et cutine, sont arrivées par fossilisation à un état très voisin les uns des autres. Cette transformation leur a communiqué des susceptibilités identiques vis-à-vis des réactifs essayés et, en particulier, des colorants. Qu'il s'agisse, en fait, d'une substance pure ou d'une association (parois squelettiques plus incrustats) les colorations obtenues ne permettent aucune conclusion sur la nature exacte des membranes d'Hystrichosphères.

Au terme de cette étude, je ne puis que faire miennes les conclusions de DEFLANDRE (10) et les élargir même, car il y a trois possibilités d'interpréter l'insuccès de l'application des méthodes histologiques au plancton fossile :

1. Les méthodes usuelles de détermination des membranes cellulaires demandent des modalités d'application ou des procédés nouveaux pour déceler les constituants du plancton fossile.

2. Ces substances fossilisées ont subi un état de transformation (agrégation, polymérisation) qui ne rend plus reconnaissables les formes originelles.

3. Des substances nouvelles ou peu connues des cytologistes, constituent les membranes de ces Dinoflagellés et Hystrichosphères.

Quoi qu'il en soit, l'application systématique des recherches histo-chimiques aux innombrables formes du plancton actuel réservera, sans doute, bien des surprises et bien des découvertes. Ce n'est qu'ensuite que les recherches pourront être étendues avec fruit aux microfossiles.

## INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

- CORTESI, H., 1940, *Un nouveau réactif de la Lignine*. (C. R. séance Soc. Phys. Hist. Nat. Genève, Genève, vol. 57, fasc. 4, pp. 270-272.)
- COUPIN, H., 1909, *Technique microscopique appliquée à l'étude des végétaux*. (Paris, Doin, 250 p., 159 figs.)
- DEFLANDRE, G., 1934, *Sur les microfossiles d'origine planctonique conservés à l'état de matière organique dans les silex de la craie*. (C. R. Acad. Sciences Paris, T. 199, pp. 966-968, 11 figs.)
- DEFLANDRE, G., 1935, *Considérations biologiques sur les microorganismes d'origine planctonique conservés dans les silex de la craie*. (Bull. Biol. de la France et de la Belgique, Paris, T. 69, fasc. 2, pp. 1-32, pls. V-IX.)
- DEFLANDRE, G., 1938, *Microplancton des mers jurassiques conservé dans les marnes de Villers-sur-Mer (Calvados). Etude liminaire et considérations générales*. (Trav. Stat. Zool., Wimeux, T. 13, vol. jubilé. M. CAULLERY, pp. 147-198, pls. V à XI, 10 figs.)
- DEFLANDRE, G., 1938', *Etat des matières organiques constituant certains microorganismes planctoniques fossiles. Essais d'analyse microchimique*. (C. R. Acad. Sci., Paris, T. 206, pp. 854-856.)
- DUPARQUE, A., 1926, *La composition chimique des substances végétales et des houilles*. (Ann. Soc. Géol. Nord, Lille, T. 51, pp. 405-456.)
- EISENACK, A., 1931, *Neues mikrofossilien des Baltischen Silurs*. I. (Palaeont. Zeitschr., Berlin, vol. 13, pp. 74-118, pls. I-V.)
- GUILLEMEROND, A., MANGENOT, G., PLANTEFOL, L., 1933, *Traité de cytologie végétale*. (Paris, Ed. LE FRANÇOIS, 1033 p., 464 figs.)
- JENTY-SZAFFER, J., 1928, *La structure des membranes du pollen de Corylus, de Myrica et des espèces européennes de Betula et leurs déterminations à l'état fossile*. (Bull. Inst. Acad. Pol. Scienc., série B, bot., pp. 75-125, pls. VIII à XI.)
- KRÆUSEL, R., 1929, *Die paläobotanischen Untersuchungsmethoden*. (Iena, G. FISCHER, 80 p., 56 figs.)
- LANGERON, M., 1942, *Précis de microscopie*. (Paris, MASSON, 6<sup>e</sup> édit., 1306 p., 386 figs.)
- LEGRAYE, M., 1932, *Les constituants des charbons. Leur influence sur quelques propriétés industrielles*. (Bibl. Scient. belge, Liège, THONE, 152 p., 11 pls.)
- LEJEUNE, M., 1936, *Sur un moyen d'isoler les microfossiles inclus dans les silex*. (C. R. Acad. Sci., Paris, T. 203, fasc. 2, pp. 435-437.)
- LISON, L., 1923, *Histochimie animale*. (Coll. Act. Biolog., Paris, Ed. GAUTHIER-VILLARS.)

- MANGIN, L., 1889, *Observations sur la membrane du grain de pollen mûr*. (Bull. Soc. bot. France, Paris, T. 36, 2<sup>e</sup> série, pp. 274-284.)
- MOLISH, H., 1923, *Mikrochemie der Pflanze*. (Iena, G. FISHER, 3<sup>e</sup> édit., 407 p., 135 figs.)
- POTONIÉ, R., 1924, *Einführung in die allgemeine Kohlenpetrographie*. (Berlin, 285 p., 80 figs.)
- STRASBURGER, E., 1897, *Das Botanische Practicum*. (Iena, G. FISHER, 620 p., 221 figs.)
- WETZEL, O., 1933, *Die inorganischer Substanz erhaltenen Mikrofossilien des Baltische Kreide-Feuersteins, mit einem Sedimentpetrographischen und stratigraphischen Anhang*. (Palaeontographica, Stuttgart, T. 77, pp. 141-186, 10 figs., et T. 78, pp. 1-110, pls. I à VII.)
- WETZEL, W., 1922, *Sedimentpetrographische Studien. I. Feuerstein*. (*Neues Jahrb. f. Min. Geol. Pal.*, Stuttgart, Beil. Bd., n<sup>o</sup> 47, pp. 39-92, pls. I à III.)
-