

**BIODEGRADATION DE LA TRAME ORGANIQUE DES COQUILLES DE
MOLLUSQUES EN MILIEU MARIN : ACTION DES MICROORGANISMES
ENDOLITHES (1)**

M. POULICEK * et M.F. JASPAR-VERSALI **

SUMMARY

The organic matrix of dead Mollusk shells do not accumulate on a large scale in marine sediments from 0 to 5000 meter deep (at least in "normal" sedimentary conditions). All organic components of extracrystalline sheaths are quickly weathered, at first, presumably by extracellularly secreted hydrolytic enzymes of microorganisms living in the upper layers of sediments, then by microborers and chasmolithic organisms living in close contact with those organic sheaths. We verified that these organisms are able to secrete the enzymes needed to hydrolyse the organic complexes screened within calcified crystallites of Mollusk shells, and that the enzymes (chitinase and preteolytic enzymes) are actually secreted within weathering shells.

So we can conclude that there is little probability that shelly sands and gravels constitute huge "biogenic polymers" traps. All these polymers are generally hydrolysed during the first diagenetic events and thus are used as energy source by many detritus feeders, limivorous organisms and indirectly by suspension feeders living at sediment-water interface.

* Chargé de recherches du Fonds National de la Recherche Scientifique.

** Aspirant du Fonds National de la Recherche Scientifique.

Présenté par Ch. Jeuniaux, le 15 mars 1984.

INTRODUCTION

Des bactéries, des champignons, des cyanophycées, des algues, des animaux sont capables de perforer, de dégrader les structures calcifiées. Toutefois, jusqu'il y a une quinzaine d'années, les connaissances concernant les organismes intervenant dans la biodégradation des substrats carbonatés étaient fragmentaires, basées essentiellement sur des observations anecdotiques ou des notes systématiques. Depuis, de nombreux travaux ont été publiés. Ces travaux, surtout à orientation géologique, se limitent presque exclusivement à l'étude de la phase minérale, en particulier de sa dégradation et de ses transformations dans des conditions très variées.

Si l'hypothèse a souvent été émise que les microorganismes hétérotrophes endogés dégradent les matrices organiques des substrats squelettiques qu'ils envahissent, ce fait n'a jamais été démontré, et rien n'est connu, semble-t-il au sujet de leurs potentialités hydrolytiques. Ainsi que le dit LUKAS : "Most recent work on endoliths has been done by taxonomists and geologists - the biochemists seem not to have discovered them yet". (1).

Dans le présent travail, nous tenterons de préciser certains aspects des interactions entre microorganismes endolithes et trame organique des coquilles, en nous attachant notamment à la mise en évidence des potentialités hydrolytiques de ces microorganismes.

MATERIEL ET METHODES

1) Description morphologique des altérations induites par les microorganismes endobiontes.

L'étude morphologique de la biodégradation des coquilles de Mollusques a porté sur des échantillons de coquilles et de strates microstructurales isolées de coquilles fixées au niveau d'un dispositif expérimental immergé en baie de Calvi, par -37 mètres de profondeur, sur une tache de sable intermatte de l'herbier à Posidonies, à 500 mètres environ de la côte est de la pointe Revellata (2-3).

Le degré d'altération du matériel expérimental a ensuite été comparé à celui de coquilles récoltées à diverses profondeurs en Méditerranée et en Mer du Nord (4), ainsi qu'à celui d'échantillons récoltés en Mer des Caraïbes, en Mer Rouge et dans l'Océan Indien (Maldives, Golfe du Bengale) (fig. 1). Enfin, du matériel abyssal provenant des campagnes océanographiques "GALATHEA", "THOR", "INGOLF", "FRAM", "EASTWARD", "J. CHARCOT", "BIOGAS"... nous a été aimablement fourni par le Prof. KNUDSEN (Zoologisk Museum, Copenhague), et les Drs. Ph. BOUCHET et B. METIVIER (Museum d'Histoire Naturelle, Paris), R. Le PENNEC (CNEXO, Université de Brest) et C. FALCONETTI (Université de Nice). (fig. 1).

Les microorganismes endogés ont été observés in-situ en microscopie photomicroscopie classique, à contraste de phase ou en polarisation, au niveau de lames minces de coquilles rendues translucides par montage dans l'huile à immersion (Zeiss, N 1.52). Les relations de ces microorganismes avec la trame organique peuvent être visualisées après fixation-décalcification des coquilles par le mélange Ac. chlorhydrique 0.25 % - Ac. trichloracétique 10 % - Formaldéhyde 10 %, postfixation par le liquide de Gendre, déshydratation butylique, inclusion et coupe. Les microorganismes ont été révélés par les procédés de LILLIE (5), de BAKER-SMITH et de KLINGMAN (6) ou par la réaction allochrome (7). Cette technique permet encore de préciser histochimiquement l'état des matrices organiques associées aux endolithes. (Argentaffinité, réactions des mucopolysaccharides, PAS, réactions de SALAZAR, de BEHRENBaum, de SAKAGUCHI, ...) (7, 8).

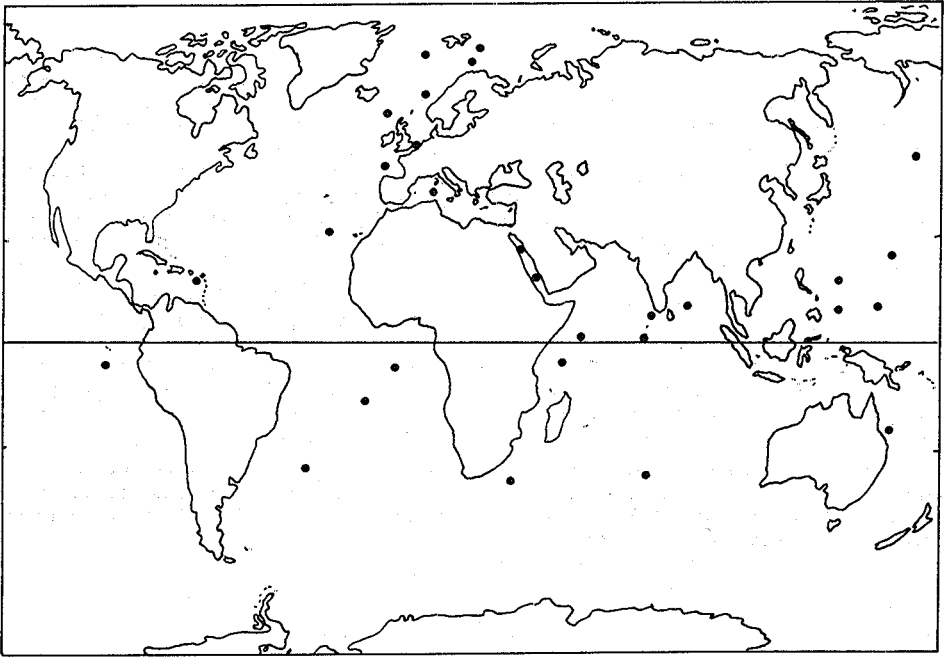


Fig. 1. Localisation des points de prélèvements de coquilles de Mollusques détritiques.

Pour l'étude au microscope électronique à balayage, les microorganismes ont été fixés in-situ par la glutaraldehyde-EM à 2.5 % et pH 7.4 avant postfixation par OsO_4 (2 %) dans du tampon cacodylate à pH 7.4, déshydratation via l'éthanol et l'amy₄lacétate et passage au point critique (9). Les échantillons, métallisés à l'or-palladium par "sputtering" (Technics Sputtering, 11 V, 10 mA, 3 fois 15" sous une pression 10⁻² Torr), ont été observés à l'aide d'un microscope électronique Siemens ETEC Autoscan (Acc.: 20 KV).

2) Mise en évidence des activités enzymatiques des microorganismes endobiontes.

Les matrices organiques des restes coquilliers sont essentiellement de nature chitinoprotéique (3). Nous avons cherché à mettre en évidence les enzymes hydrolytiques susceptibles d'intervenir dans leur dégradation : protéases et chitinase.

Les microorganismes endogés ont préalablement été cultivés sur milieu Agar-EM (1.8 %) "riche". Le milieu, stérilisé à l'autoclave, a étéensemencé au moyen de suspensions de nacre de *Pinna nobilis* immergée depuis 18 mois sur notre site expérimental. Après incubation à 20°C, nous nous sommes intéressés aux colonies de microorganismes les plus abondantes : Bactéries (3 souches), Cyanophycées et Oomycètes. Les Oomycètes et les Cyanophycées n'ont pu être obtenus en cultures pures totalement exemptes de Bactéries.

Les activités hydrolytiques des microorganismes isolés et cultivés in-vitro, ont été mises en évidence par des techniques histoenzymologiques dérivées de la méthode d'empreinte imaginée par DAOUST (10, 11). Ces techniques ont également été appliquées à des éléments de nacre en cours de dégradation. Les activités chitinolytique et protéolytique ont été recherchées respectivement sur films de carboxymethylchitine (12) et sur films de gélatine (13). Les films recouverts du matériel à étudier ont été incubés en chambre humide à 37°C. Après incubation, le film de substrat est coloré selon la méthode d'ARNOULD (12). Le témoin est constitué de matériel inactivé par un séjour à l'autoclave (120°C) durant 2 heures.

Parallèlement à cette technique histoenzymologique, nous avons également utilisé une technique de dosage enzymatique afin de mesurer l'activité chitinolytique liée à la nacre en cours de dégradation (libération de N-acetyl-glucosamine (NAG) à partir d'une suspension de chitine "native" préparée à partir de sépiens de seiches, en présence d'un tampon ac. citrique 0.6 M - Na₂HPO₄ 1.2 à pH 5.2) (14). Des témoins sans enzyme et sans substrat sont menés parallèlement à chaque test enzymatique. L'activité enzymatique est exprimée en µg NAG libéré h⁻¹ g⁻¹ de coquilles (PF).

RESULTATS

1) Mode d'infestation des coquilles détritiques

Les microorganismes concourant à la dégradation des coquilles de Mollusques, se succèdent suivant une séquence bien définie.

BACTERIES et DIATOMEES font partie du biotecton colonisant "normalement" la surface externe des coquilles de Mollusques, pourvues ou non de périostracum. Lors du dépôt de coquilles expérimentales, ces microorganismes sont les premiers à se fixer sur les échantillons (fig. 2A). On les retrouve toujours à la surface du matériel examiné, quelles qu'en soient la provenance et la profondeur de récolte (depuis l'étage médiolittoral jusqu'à environ 5000 mètres de profondeur, fig. 1).

Certaines souches de bactéries (bacilles sporulés et coques) sont à même de pénétrer activement dans l'épaisseur du périostracum, conduisant progressivement à son élimination (fig. 2B). Le périostracum des coquilles de Mollusques, constitué de sclérotines tannées par ponts quinoniques, peut être considéré comme un élément important de protection des strates minéralisées vis-à-vis des agressions du milieu extérieur (3, 15, 16). Son élimination "prépare" les strates minérales à la colonisation par d'autres formes d'organismes endolithes (cyanophycées notamment), ou encore, les soumet à l'attaque chimique du milieu. Dans cette optique, l'action bactérienne apparaît prépondérante en milieu à hydrodynamisme peu important, où l'abrasion est négligeable.

La pénétration des substrats calcifiés par des bactéries est encore sujette à controverse, bien que l'on sache que certaines souches solubilisent les sels minéraux (17, 18). Nous avons attribué à l'action de bactéries filamenteuses, des perforations de 1 à 2 µm de diamètre, fortement contournées, correspondant aux dessins et descriptions de FREMY (19). Ce type de perforation, occasionnel à faible profondeur (3) est très fréquemment observé dans les coquilles de Mollusques participant à la constitution des sédiments de l'étage bathyal en Méditerranée (15) et dans la mer des Caraïbes (20) et de l'étage abyssal (Golfe de Gascogne, Oc. Indien et Mer de Norvège (15).

En outre, des chaînes de bacilles sporulés et des diatomées peuvent être observées associées à la trame organique externe des cristallites, au sein de régions profondes de certaines coquilles non perforées par d'autres microorganismes. Dans ce cas, les fourreaux organiques péricristallins constituent vraisemblablement la voie d'accès et de pénétration des coquilles. La trame organique au contact de ces microorganismes examinée en microscopie électronique, apparaît

altérée par rapport à la trame organique "saine" de la même coquille (modifications de la texture superficielle et désagrégation des voiles organiques).

Enfin, de nombreux types de bactéries et des diatomées constituent la majorité des organismes chasmolithes (organismes occupant des cavités "naturelles" ou abandonnées par les endolithes, fig. 2 D-E), dont une part importante apparaît associée à la matière organique particulaire et aux débris planctoniques (coccolithes....) (3).

Les CYANOPHYCEES interviennent de manière très précoce dans les phénomènes de dégradation des substrats carbonatés. Elles constituent le plus souvent les premiers organismes perforants à infester les coquilles, dès leur dépôt en surface des sédiments (du moins aux profondeurs compatibles avec leur existence. (21). Elles semblent disparaître vers 80 à 140 m. de profondeur et manquent dans les assemblages endolithes de l'étage bathyal et de l'étage abyssal (15,22).

Les perforations dues aux Cyanophycées ont des morphologies très variées. De 4 à plus de 80 μm de diamètre, leurs perforations traversent les unités microstructurales élémentaires sans déviation apparente. Elles s'infléchissent fréquemment en profondeur, de façon à devenir parallèles à la surface de la coquille. Dans les microstructures prismatiques, les Cyanophycées se développent souvent au sein d'un seul prisme, sans relation avec le prisme voisin. La morphologie des galeries attribuées aux Cyanophycées semble indépendante de la présence et de la disposition de la matière organique extracristalline (fig. 2-C). Au contraire, les plans de clivage des cristaux de CaCO_3 au sein des coquilliers déterminent de façon stricte la vitesse de pénétration et l'orientation de ces endolithes (3, 21, 23).

D'autres types d'algues perforent fréquemment les coquilles de Mollusques. Il s'agit essentiellement de Chloro- et de Rhodophycées.

Les CHLOROPHYCEES sont fréquemment observées, mais rarement en abondance, excepté en milieu tropical (-20 à -60 m. de profondeur (3,24) et dans l'étage circalittoral en Méditerranée (25). La forme la plus commune, *Oestrobium* sp., creuse des galeries de 2 à 10 μm de diamètre, rayonnant dans un plan parallèle à la surface externe, au départ d'un tronc commun de 20 à 30 μm de diamètre.

Les RHODOPHYCEES endolithes sont généralement moins fréquentes que les autres microorganismes (3). Elles correspondent au stade conchocelis d'algues macroscopiques du groupe des Bangiales. Leurs filaments forment des réseaux denses, anastomosés (2 à 8 μm de diamètre).

Comme celle des Cyanophycées, l'activité de perforation des Chloro- et des Rhodophycées apparaît indépendante de la présence de matière organique gainant les cristallites minéraux.

De manière générale, le nombre de perforations réellement occupées par un endobionte est faible en regard du nombre total de perforations. Après deux années d'immersion d'un matériel expérimental, environ 2 à 5 % des galeries creusées dans les prismes de *Pinna nobilis* sont effectivement occupées par l'organisme qui les a percées. KOBLUK et RISK (24) estiment que 5 à 10 % des perforations effectuées par des Chlorophycées sont encore occupées par l'algue après 95 jours d'expérience en milieu tropical. Le nombre de galeries taraudant certains substrats peut-être très élevé : de l'ordre de 700.000 perforations par cm^2 dues à *Hyella caespitosa* et plus de 500.000 perforations par cm^2 dues à *Mastigocoleus testarum* (Cyanophycées) dans des restes carbonatés relevés en région marseillaise (21) ou encore plus de 30.000 perforations/ cm^2 dans un échantillon de Pectinidae abyssal provenant de l'Atlantique Nord (15, 22). En milieu tropical on peut compter jusqu'à 500.000 filaments algaires par mm^3 de substrat coquillier (1).

Ces perforations abandonnées par les algues et les cyanophycées endolithes constituent une voie d'accès, mise à profit par des champignons perforants pour s'établir au sein même des strates minéralisées (fig. 2E). Ceux-ci constituent, après la phase pionnière, l'essentiel de la biomasse d'endobiontes. Ils appartiennent aux OOMYCETES (Saprogéniales), abondants à toutes profondeurs, et aux

ASCOMYCETES (Schizo-levures et formes typiques), surtout abondants en milieu bathyal et abyssal.

Leur morphologie est très diversifiée : plus de 30 formes ont été reconnues sur base de différences morphologiques au niveau de leur appareil reproducteur (v. travaux de KOHLMEYER, PERKINS,.... in 3, 15, 22). Ils creusent des galeries de 2 à 10 µm de diamètre (Oomycètes) jusqu'à près de 100 µm de diamètre (Ascomycètes). Au sein du carbonate de calcium, les galeries attribuées aux champignons perforants sont généralement rectilignes. Elles se ramifient très fortement en un réseau dense, intimement associé à la matière organique gainant les cristallites minéraux. Quand on les extrait des coquilles, les champignons endogés sont fréquemment fixés à des voiles ou à des filaments de la trame organique des coquilles. Les hyphes mycéliens s'insinuent au sein même de la matrice dont ils modifient la texture et l'aspect ultrastructural dans la même mesure que les bactéries.

Des organismes de la méiofaune des couches superficielles des sédiments sont certainement impliqués dans les phénomènes de dégradation de la trame organique des coquilles détritiques dans une mesure qui reste difficile à préciser. Des Nématodes ont parfois été observés au sein même des coquilles, pénétrant par les perforations de plus large diamètre. Ceci intervient fréquemment en milieu abyssal.

2.- Mise en évidence des activités enzymatiques des microorganismes endolithes.

Les résultats des tests histoenzymologiques appliqués à des colonies de microorganismes endobiontes cultivés in-vitro figurent dans le tableau I.

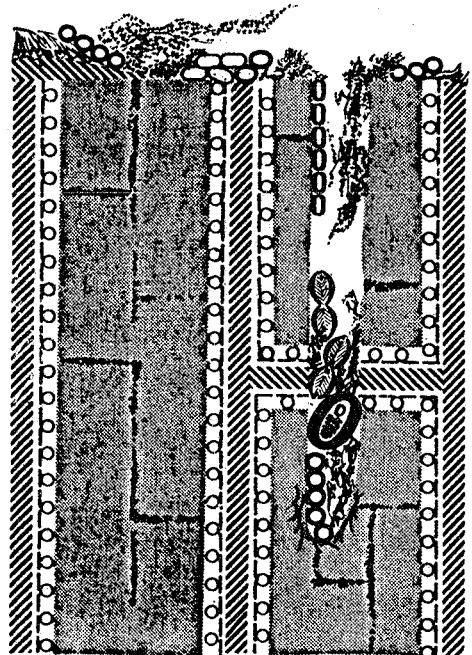
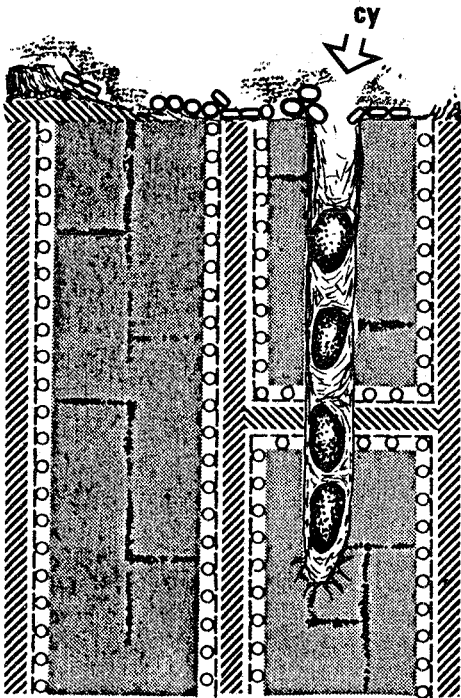
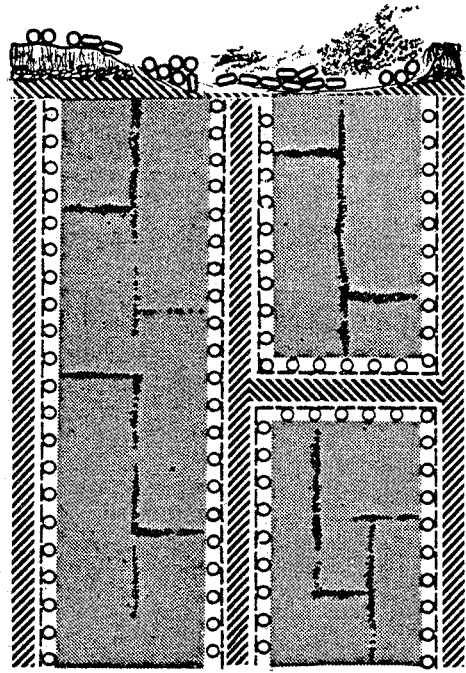
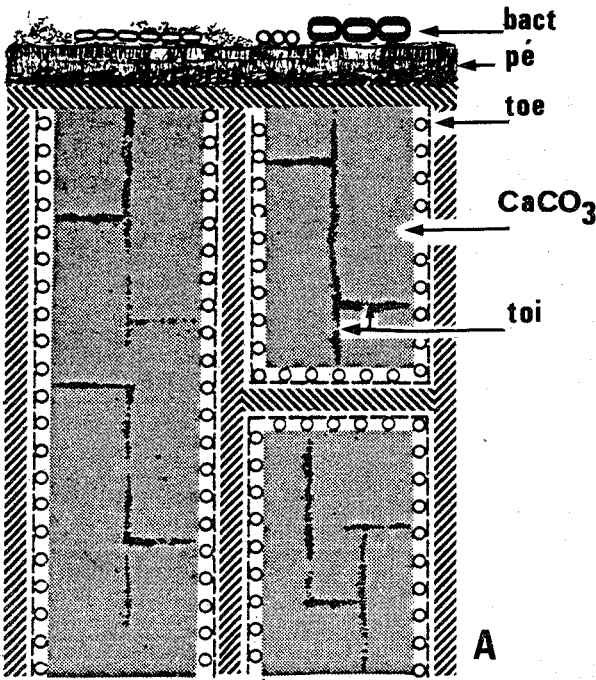
Tableau I

Mise en évidence par voie histoenzymologique de protéase et de chitinase dans des colonies d'organismes endobiontes de *Pinna nobilis* cultivés in-vitro. (- : non effectué; o : activité nulle; + : activité décelable mais faible; ++ : activité intense).

Organisme	Chitinase	Protéase
Cyanophycées	o	o ?
Oomycètes	++	++
Bactéries souche 1	+	++
souche 2	+	++
souche 3	+	++

L'activité protéolytique des champignons et des trois souches de bactéries (*) isolées de la nacre en cours de dégradation est très intense. Le test n'est pas concluant quant aux cultures de Cyanophycées.

(*) Les trois souches se différencient par l'aspect de leurs colonies sur milieu Agar EM : la souche 1 forme des colonies bien circulaires, d'un jaune d'or luisant (bacilles), la souche 2 forme des colonies irrégulières, rosées et un peu iridescentes (bacilles sporulés) et la souche 3 (coques) forme des colonies blanchâtres, bordées d'un exsudat incolore, cette dernière souche est capable de lyser l'agar.



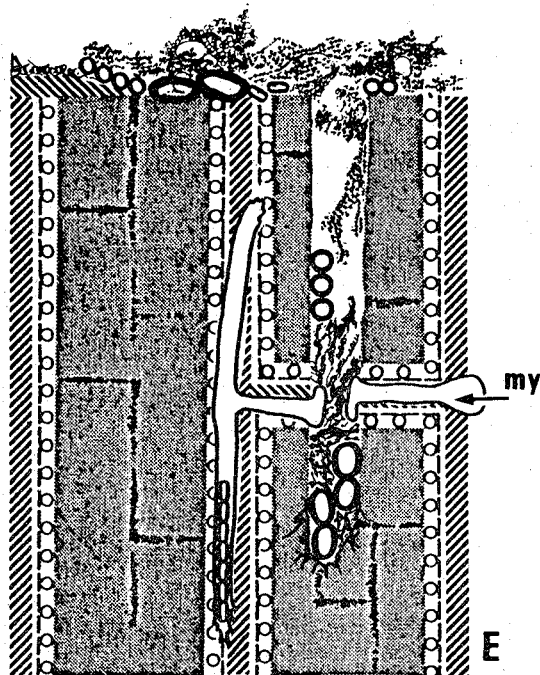


Fig. 2 : Succession schématique des étapes de la biodégradation d'un élément coquillier théorique.

- A.- Avant dégradation, Bactéries épilithes (Bact.) et matière organique particulière sédimentée.
 CaCO_3 : cristaux de carbonate de calcium, Pc : Periostracum;
 Toe_3 : trame organique externe aux cristallites; Ioi : Trame organique interne aux cristallites.
- B.- Dégradation du périostracum.
- C.- Premières perforations par Cyanophycées (Cy)
- D.- Après disparition de la Cyanophycée, infestation par divers organismes chasmolithes (Bactéries, Levures, Diatomées,...).
- E.- Infestation par Oomycètes (My).

L'activité chitinolytique des trois souches bactériennes est assez faible (elle ne se révèle qu'après 2 à 3 heures d'incubation). L'activité chitinolytique des champignons est, par contre, très intense et se manifeste déjà après moins d'une heure d'incubation.

Les activités chitinolytiques et protéolytiques peuvent être mises en évidence, par voie histoenzymologique, au sein même de la nacre en cours de dégradation. Les résultats du dosage de l'activité chitinolytique dans la nacre en cours de dégradation, confirment ces résultats : la région corticale de la nacre, où siège une importante biomasse d'endolithes, présente une activité chitinolytique importante, 81.82 µg NAG libéré par heure et par gramme de nacre. Cette activité paraît, de toute évidence, liée à la présence des Champignons et Bactéries endo- et chasmolithes.

Complémentairement, les tests histo-chimiques pratiqués sur la nacre en cours de dégradation, montrent une diminution indiscutable des teneurs en polysaccharides (méthode du PAS - MAC MANUS, méthode de HOROBIN-KEVILL), en mucopolysaccharides (carboxyliques, sulfatés et neutres : réaction de HALE, de LISON, alcianophilie, réaction de STEMPIEN), en protéines (réactions de SALAZAR, de SAKAGUCHI....) en lipides masqués (réactions de BEHRENBAUM) indiquant que d'autres enzymes non recherchés sont vraisemblablement actifs à ce niveau (amylase, carboxylase, lipase).

DISCUSSION

Nous avons montré (3, 4) que les coquilles de Mollusques interviennent de manière importante dans la constitution des sédiments marins. Elles y amènent une masse considérable de CaCO_3 (de l'ordre de 1.9 à 2,3 10^{15} g.année⁻¹ (26)). La matrice organique de ces débris coquilliers peut soit s'accumuler dans les sédiments, qui constitueront alors un véritable "piège" pour de nombreux biopolymères (27), soit subir divers phénomènes de biodégradation qui conduiraient en réintroduire les éléments constitutifs dans les cycles écologiques.

Puisqu'il apparaît que la matrice organique des coquilles de Mollusques subit des phénomènes de dégradation rapide durant les premiers mois qui suivent son dépôt à la surface des sédiments marins (fig. 3, (22)), il apparaît logique de rechercher par quels mécanismes cette diagenèse s'effectue.

Simultanément à la dégradation de cette trame organique, on assiste à l'installation puis à la prolifération de microorganismes perforants appartenant aux Bactéries, Cyanophycées et Oomycètes essentiellement. Parmi ces microorganismes, les hétérotrophes (Bactéries et Champignons) se fixent préférentiellement au niveau précis de la matrice organique extracristalline et en altèrent la texture submicroscopique. Les résultats exposés dans cet article révèlent que les microorganismes endogés, du moins les hétérotrophes, possèdent la faculté d'excréter les enzymes nécessaires (chitinase et protéase) à la dégradation de la trame chitinoprotéique des coquilles. De plus, ces enzymes sont effectivement sécrétés dans les strates corticales, au sein des coquilles, là où l'endobiose est maximale. Ceci pourrait indiquer que les microorganismes endolithes consomment la trame organique des coquilles de Mollusques qu'ils infestent.

Toutefois, on peut constater (fig. 3) que la dégradation de la trame organique commence pratiquement dès le début de l'immersion (3 A), alors que la masse d'organismes endolithes est encore très faible. On ne peut expliquer ces phénomènes d'hydrolyse initiale qu'en postulant que les composants organiques des coquilles puissent être dégradés "de l'extérieur", sans décalcification préalable. Ceci s'est avéré possible en condition de laboratoire (VOSS-FOUCART in (3)). Dans ce cas, les bactéries et la méiofaune des couches superficielles du sédiment joueraient un grand rôle dans cette dégradation. L'hypothèse d'une production d'hydrolases "libres" dans l'eau interstitielle mériterait encore

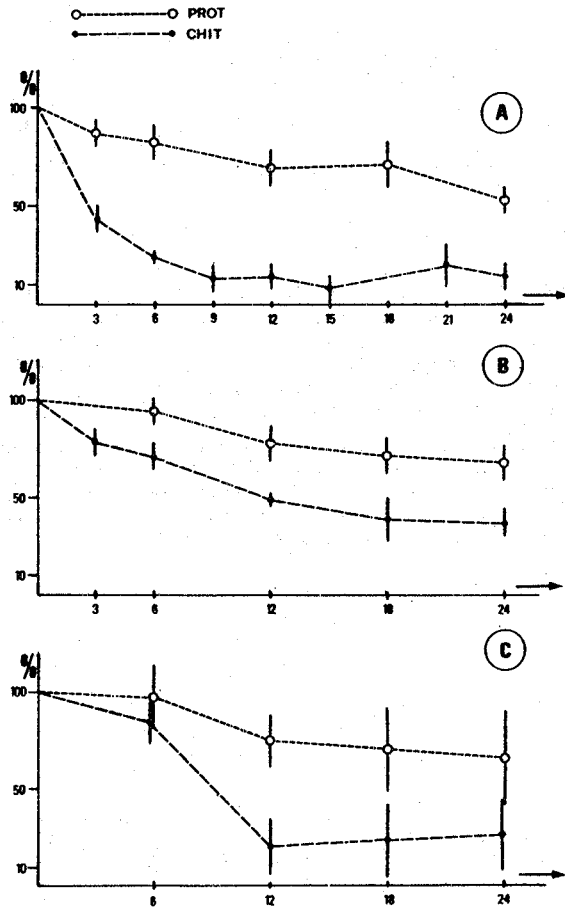


Fig. 3. Dégradation de la trame organique des coquilles de Mollusques durant les premiers mois qui suivent leur sédimentation.
 - En ordonnée, la teneur en chitine ou en protéines exprimée en % des teneurs initiales.
 - En abscisse, le temps (exprimé en mois).
 A : nacre isolée; B : microstructure prismatique isolée; C : microstructure lamellaire entrecroisée isolée.
 (extrait de [22]).

confirmation. Cette hypothèse est toutefois vraisemblable quand on connaît la densité des populations bactériennes et leurs potentialités hydrolytiques (28) et l'importance des organismes de la méiofaune pour la décomposition de la matière organique particulaire (29, 30).

De telles activités enzymatiques n'ont été démontrées que dans le cas des régions infra- et corcalittorales. Toutefois, puisque les assemblages endolithes sont comparables dans les sédiments abyssaux et circalittoraux (du moins en ce qui concerne les organismes hétérotrophes) et puisque KIM et ZOBELL (31) ont montré que les enzymes hydrolytiques conservaient leur activité dans les conditions régnant en milieu abyssal (4° C et 1000 atmosphères de pression), il apparaît que les phénomènes de dégradation des trames organiques de coquilles peuvent être généralisés à l'ensemble des régions océaniques.

RESUME ET CONCLUSIONS

La matrice organique des coquilles de Mollusques ne s'accumule pas dans les sédiments, du moins dans les conditions "normales" de sédimentation. Les composants organiques des trames extracristallines sont rapidement dégradés, d'abord probablement par des enzymes élaborés par des microorganismes du sédiment, puis par des microorganismes endo- et chasmolithes qui possèdent l'arsenal enzymatique nécessaire à cette dégradation.

Nous pouvons ainsi conclure qu'il semble peu probable que les sédiments coquilliers constituent de vastes "pièges" à biopolymères. Ces substances organiques sont généralement hydrolysées lors des premières phases de la diagenèse, constituant ainsi une source d'aliments énergétiques pour les organismes consommateurs ou décomposeurs vivant à la surface des sédiments.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) LUKAS, K.J. (1979) - The effects of marine microphytes on carbonate substrata. *Scanning Electron Microscopy, II, Sem. Inc., AMF O'Hare, IL 60666 (USA)*, 447-455.
- (2) POULICEK, M., JASPAR-VERSALI, M.F. et GOFFINET, G. (1981) - Etude expérimentale de la dégradation des coquilles de Mollusques au niveau des sédiments marins. *Bull. Soc. r. Sci. Liège*, 11-12, 513-518.
- (3) POULICEK, M. (1982) - Coquilles et autres structures squelettiques des Mollusques : composition chimique, biomasse et biodégradation en milieu marin. *Dissertation pour le Doctorat en Sc. Zoologiques*, 180 pp.
- (4) POULICEK, M. et JEUNIAUX, Ch. (1982) - Biomass and biodegradation of Mollusk shell chitin in some marine sediments. *Proc. IId. Int. Congr. Chitin Chitosan (Sapporo, Japan)*, 196-199.
- (5) GABE, M. (1968) - Techniques histologiques. *Masson et Cie, éd., Paris*, 1113 p.
- (6) LILLIE, R.D. (1965) - Histopathologic technic and practical histochemistry. *McGraw-Hill Inc. Ed. New-York*, 887 p.
- (7) GANTER, P. et JOLLES, G. (1970) - Histochimie normale et pathologique. *Gauthier-Villars ed., Paris*, 1902 p.
- (8) CHEVREAU, J., BELLOT, J. et CABANIER, M.J. (1977) - Formulaire de techniques histologiques. *Maloine S.A. ed., Paris*, 326 p.

- (9) HUMPHREYS, W.J. et HENK, W.G. (1979) - Critical point drying of biological specimens. *Scanning Electron Microscopy, II, Sem. Inc., AMF O'Hare, IL. 60666 (USA)*, 235-240.
- (10) DAOUST, R. (1957) - Localisation of desoxyribonuclease in tissue section. A new approach to the histochemistry of enzymes. *Exp. Cell. Res.*, 12, 203-211.
- (11) DAOUST, R. (1959) - The substrate-film method in enzyme histochemistry. *Exp. Cell. Res.*, suppl. 7, 40-49.
- (12) ARNOULD, Ch. et BOUCHEZ-DECLoux, N. (1978) - Méthodes histoenzymologiques pour la détection de cellulase, de chitinase et de laminarinase. Application au bouclier gastrique du Mollusque Bivalve *Serobicularia plana*. *Histochemistry*, 56, 45-54.
- (13) MICHEL, C. et CHRETIEN, M. (1975) - Modifications of Cunningham's method for detection of protease in tissue section. *Annls. Histochem.*, 20, 39-46.
- (14) JEUNIAUX, Ch. (1963) - Chitine et chitinolyse, un chapitre de la biologie moléculaire. *Masson et Cie, éd., Paris*, 187 pp.
- (15) POULICEK, M. (1984) - Patterns of Mollusk shell biodegradation in bathyal and abyssal biocenoses. *Journ. Mollusc. Study*, sous presse.
- (16) BOTTJER, D.J. (1981) - Periostracum of the Gastropod *Fusitriton oregonensis* : natural inhibitor of boring and incrusting organisms. *Bull. Mar. Sci.*, 31 (4), 916-921.
- (17) DEVEZE, L., LE PETIT, J. et MATHERON, R. (1966) - Note préliminaire sur la présence dans les eaux et les sédiments marins de bactéries solubilisant certains sels minéraux insolubles (carbonates, phosphates et silicates). *Bull. Inst. Océanogr. Monaco*, 66, n° 1370, 8 p.
- (18) DEVEZE, L., LE PETIT, J., MATHERON, R. et BARTHELEMY, M.H. (1971) - Remarques sur les variations de densités de bactéries capables de solubiliser certains sels minéraux dans les eaux et les sédiments marins au cours d'une année. *Rapp. Comm. Int. Mer Méditer.*, 20 (3), 271.
- (19) FREMY, P. (1945) - Contribution à la physiologie des Thallophytes marines perforant et cariant les roches calcaires et les coquilles. *Ann. Inst. Océanogr.*, 22, 107-144.
- (20) ZEFF, M.L. et PERKINS, R.D. (1979) - Microbial alteration of bahamion deep-sea carbonates. *Sedimentology*, 26, 175-201.
- (21) LE CAMPION, Th. (1979) - Les Cyanophycées endolithes marines. Systématique, ultrastructure, écologie et biodestruction. *Oceanol. Acta*, 2 (2), 143-156.
- (22) POULICEK, M. (1984) - Shell matrix weathering in marine sediments. *Malacologia*, sous presse.
- (23) LE CAMPION, Th. (1975) - Etude expérimentale de la colonisation d'éclats de calcite par les Cyanophycées endolithes marines. *Cah. Biol. Mar.*, 16, 177-185.
- (24) KOBLUK, D.R. et RISK M.J. (1977) - Rate and nature of infestation of a carbonate substratum by a boring alga. *J. exp. Mar. Biol. Ecol.*, 27, 107-115.
- (25) FREDJ, G. et FALCONETTI, C. (1977) - Sur la présence d'algues filamenteuses perforantes dans le test des *Gryphys vitreus* (Born) (Brachiopodes Terebratulides) de la limite inférieure du plateau continental méditerranéen. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 284, 1167-1170.
- (26) MILLIMAN, J.D. (1974) - Marine carbonates. *Springer Verlag, Berlin*, 375 p.
- (27) JEUNIAUX, Ch. (1981) - Faunistique et écologie chimique des peuplements benthiques sur substrats durs et des sédiments en baie de Calvi (Corse). *Bull. Soc. r. Sci. Liège*, 11-12, 446-452.

- (28) BRISOU, J., TYSSET, C., de RAULIN de la ROY, Y., CURCIER, R. et MOREAU, R. (1964) - Etude sur la chitinolyse en milieu marin. *Ann. Inst. Pasteur*, 106 (3), 469-478.
- (29) FAUBEL, A. et MEYER-REIL, L.A. (1981) - Enzymatic decomposition of particular organic matter by meiofauna. *Kielser Meeresforsch.*, 5, 429-430.
- (30) FAUBEL, A. et MEYER-REIL, L.A. (1983) - Measurement of enzymatic activity of meiobenthic organisms : methodology and ecological application. *Cah. Biol. Mar.*, 24, 35-49.
- (31) KIM, J. et ZOBELL, C.E. (1972) - Agarase, amylase, cellulase and chitinase activity at deep-sea pressure. *J. Oceanog. Soc. Japan*, 28, 131-137.

Laboratoire de Morphologie, Systématique et Ecologie animales, Université de Liège, 22, Quai Van Beneden, B-4020 Liège (Belgique).