

Bioaccumulation naturelle du calcium chez *Sabella pavonina* S. (Annélide Polychète). Étude histochimique, cytochimique et microanalytique

El Mahjoub Ouaghi

Université Pierre et Marie Curie,
Laboratoire d'Histologie et Cytologie des Invertébrés Marins,
12, rue Cuvier, 75230 Paris cedex 05, France.

Résumé : Chez la Sabelle, Annélide marine sans tube calcaire, une notable bioaccumulation naturelle de calcium a été localisée aussi bien dans les épithéliums néphridien et intestinal que dans la matrice conjonctive sous-jacente aux lames basales et dans les espaces vasculaire, coelomique et urinaire.

Deux techniques ultrastructurales de mise en évidence du calcium ont été utilisées : au pyroantimonate de potassium et à la N, N-Naphthaloylhydroxylamine de sodium (NHA). Les microanalyses effectuées en spectrométrie X indiquent que le calcium accumulé est associé avec du phosphore.

La répartition du calcium dans les cellules néphridiennes, coïncidant avec celle des pigments, montre des images d'une évolution progressive des vésicules pigmentaires et calciques dont l'enrichissement en calcium est probablement en parallèle avec le processus de maturation cellulaire.

Abstract : In *Sabella* -marine Annelida without calcareous tube- a considerable natural bioaccumulation of calcium was localized in epithelial cells of the nephridia and the digestive tract as well as in the conjunctive matrix and vascular, coelomic and urinary spaces.

Two ultrastructural methods of calcium revelation by potassium pyroantimonate and by sodium N, N-Naphthaloylhydroxylamine (NHA) were used. Wave-length dispersive and energy selective X-ray microanalysis indicate that accumulated calcium is associated with phosphorus.

The repartition of calcium, located together with pigments within vesicles, shows a progressive evolution. The enrichment in calcium of these pigmentary and calcic vesicles is probably related to the cellular maturation process.

INTRODUCTION

Les sites d'accumulation naturelle, temporaires ou définitifs, d'éléments minéraux chez les Invertébrés ont fait l'objet de plus d'études chez les Arthropodes et les Mollusques que chez les Annélides. Si nous écartons les dépôts squelettogènes, souvent externes, les organes cibles concernent surtout les appareils digestif et excréteur. Les tissus décrits présentent souvent des concrétions intracellulaires qu'on a pu mettre en rapport, parfois abusivement, avec des problèmes d'écotoxicologie dans la mesure où ils pourraient présenter des surcharges de métaux polluants ou être induits par leur présence. Chez les Polychètes marines on a décrit de telles formations, par exemple dans l'épithélium intestinal de *Syllis* (Boilly, 1967), *Mage-lona* (Boilly, 1978), *Terebellides* (Michel *et al.*, 1984), *Nereis* (Dhainaut *et al.*, 1986) et on les a identifiées souvent comme des sphérocristaux, quelquefois ferriques en rapport supposé avec une pollution par le métal, mais plutôt calciques et associés au phosphore ; leur abondance étant signalée en corrélation avec une intoxication aux métaux lourds (Cd, Hg). Chez *Nephtys*, *Sabellaria* et *Pomatoceros*, la présence

de fer, calcium et phosphore en bioaccumulation de l'épithélium intestinal a été signalée, sans rapport avec des pollutions (Vovelle *et al.*, sous presse). Chez *Pomatoceros*, une étude histochimique ancienne (Vovelle, 1956) décrit des granulations calciques dans l'intestin et la néphridie : sont-elles en rapport avec le métabolisme exceptionnel du ver à tube calcaire ?

Notre étude de *Sabella pavonina*, qui appartient comme *Pomatoceros* à l'ensemble des Sabelliformes mais dont le tube est organique, répond à cette interrogation et permet surtout d'établir un bilan des bioaccumulations naturelles de cette Polychète sédentaire, par ailleurs favorable à l'expérimentation écotoxicologique (Koechlin, communication personnelle). Les résultats exposés se limitent aux organes et tissus enrichis en calcium ; une autre publication devant concerner les sites d'accumulation du fer en rapport probable avec le métabolisme des pigments respiratoires. L'étude cytologique au niveau ultrastructural de la néphridie, principal organe cible envisagé, s'est référée aux descriptions de Koechlin (1972, 1981). Des méthodes cytochimiques concurrentes permettent non seulement de confirmer et préciser dans leur structure les dépôts minéraux identifiés par la microanalyse, mais aussi de reconnaître certaines voies métaboliques du calcium ionique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Animaux. Des Sabelles, originaires de la côte de Bretagne Nord (Bréhat), sont maintenues à 15°C dans un aquarium en circuit fermé aéré par air comprimé et nourries une fois par semaine aux algues unicellulaires lyophilisées.

Fixation. La région antérieure du corps de la Sabelle, comprenant le thorax suivi des cinq premiers segments abdominaux, a été fixée (12 h) dans un mélange à volumes égaux d'alcool absolu et de formol neutre selon Mc Gee Russel (1957). Après inclusion à la paraffine, les échantillons ont été coupés à 5 ou 7 μm pour l'histochimie et la microanalyse.

Histochimie du calcium. La méthode de chélation au glyoxal bis (2-hydroxyanil) ou GBHA (Kashiwa, 1966) est pratiquée sur coupes au cryostat de tissu frais (8 μm) ou coupes à la paraffine (5 μm) de tissu fixé. Cette méthode, conçue à l'origine pour l'identification du calcium ionique ou "circulant", apparaît dans la pratique excellente pour la mise en évidence des composés insolubles du calcium, notamment les concrétions calciques minérales, seules présentes dans les coupes à la paraffine.

Témoins : décalcification préalable de coupes voisines par une solution aqueuse d'acide trichloracétique à 5 % (5 mn).

Cytochimie ultrastructurale du calcium.

- *Pyroantimonate de potassium*. La méthode la plus utilisée actuellement, au pyroantimonate de potassium, présente l'avantage d'une réaction chimique associée au temps de fixation, qui la qualifie pour la mise en évidence éventuelle de calcium ionique. Elle est discutée pour sa spécificité. La solution fixateur-réactif a été préparée selon la méthode utilisée par Appleton et Morris (1979) : 5 % de pyroantimonate de potassium ont été dissous par ébullition dans l'eau distillée. Le volume de la solution, refroidie à la température ambiante, est ajusté puis filtré pour éliminer le pyroantimonate qui peut avoir précipité. Le pH du mélange à parties égales de pyroantimonate de potassium 5 % et de tétr oxyde d'osmium 2 % est ajusté à 7,6 par l'acide acétique 0,1 N afin d'obtenir une précipitation efficace tout en maintenant un pH physiologique durant la fixation. Le pH est vérifié extemporanément et la solution est refiltrée pour éliminer les précipitations spontanées qui peuvent être induites par l'addition d'acide acétique (Debbas *et al.* 1975). Les fragments d'organes ainsi que des secteurs d'un ou deux segments thoraciques délimitant des compartiments coelomiques complets et ainsi conservés dans leur intégrité grâce aux membranes disséminaires continues ont été prélevés. Ces pièces ont été immergées dans des solutions, fraîchement préparées, de pyroantimonate de potassium à 2,5 % et de tétr oxyde d'osmium à 1 % pendant 4 heures à 4°C, puis rincées (3 x 10 mn) dans un tampon à l'acétate de potassium à pH 7,4 pour éliminer le réactif en surplus afin d'empêcher la formation de précipitations non spécifiques par la déshydratation alcoolique (Shiina *et al.* 1970).

- *N, N-Naphhaloylhydroxylamine (NHA)*. Pour une meilleure spécificité dans la détection cytochimique du calcium, nous avons utilisé la réaction au NHA (1,8 C₁₀H₆CON (ONa) CO ; Fluka A.G). Le procédé de Zechmeister (1979) pratiqué sous sa forme originale n'a pas donné les résultats attendus à cause d'une décalcification complète due à la préfixation au glutaraldéhyde à 3 %. Nous avons adapté cette réaction à notre matériel en le traitant directement par une solution aqueuse de tétr oxyde d'osmium à 1 % contenant 0,01 mM de NHA pendant 60 à 90 mn.

Après la déshydratation par l'alcool et l'oxyde de propylène, le matériel traité a été incluí dans l'Epon. Les coupes fines, réalisées sur l'ultramicrotome REICHERT OMU 2 et non contrastées, ont été observées au microscope électronique à transmission PHILIPS EM 300 sous la tension de 60 Kv.

Témoins : La réalisation des témoins de contrôle par décalcification préalable sur blocs de tissus a été incomplète et longue à obtenir. Par contre, l'extraction totale des précipités des réactions cytochimiques a été obtenue par flottation des coupes fines sur une solution d'EDTA ou d'EGTA 10 mM à pH 7,8 (60 mn à 60°C) (Coulon *et al.*, 1986) avant récupération sur grilles.

Étude microanalytique. Deux méthodes microanalytiques de principes différents ont été utilisées d'une part pour détecter le calcium à l'échelle des tissus et d'autre

part pour identifier, à l'échelle ultrastructurale, les éléments constitutifs des sites réactifs des deux méthodes cytochimiques et pour rechercher l'anion éventuel du sel calcique.

- *Spectrométrie X à dispersion de longueur d'onde.* Des coupes frontales de thorax fixés (7 µm) et des coupes au cryostat (tissu frais) (8 µm) ont été collées sur un support de terphane carboné et séchées à 60°C pendant 3 jours. Les analyses ont été effectuées à la microsonde électronique CAMECA MS 46 équipée de spectrographes dispersifs en longueur d'onde avec une tension d'accélération de 15 kV, un courant d'échantillon de 40 nA, diamètre de sonde 1 µm environ. Cette analyse, à l'échelle photonique, permet d'établir une estimation semi-quantitative des éléments minéraux (Ca et P avec le cristal PET et Mg avec le cristal KAP) contenus dans les tissus étudiés et d'en évaluer la répartition. Nous avons analysé des sites tissulaires où l'intensité (chocs/seconde) de l'élément recherché atteignait des valeurs maximales. Sur chaque site on a fait une moyenne de dix comptages et les résultats sont donnés en chocs/seconde.

Spectrométrie $\bar{x}$ en dispersion de longueur d'onde				
	Néphridie	Intestin antérieur	Tissu chloragène	Corps phagocytaires
Ca	Tissu fixé	102 $\bar{x} = 40, n = 10$	90 $\bar{x} = 75, n = 10$	40 $\bar{x} = 15, n = 10$
	Tissu frais	300 $\bar{x} = 275, n = 10$	85 $\bar{x} = 80, n = 10$	42 $\bar{x} = 40, n = 10$
P	Tissu fixé	125 $\bar{x} = 20, n = 10$	110 $\bar{x} = 90, n = 10$	55 $\bar{x} = 45, n = 10$
	Tissu frais	120 $\bar{x} = 106, n = 10$	80 $\bar{x} = 75, n = 10$	60 $\bar{x} = 50, n = 10$
				50 $\bar{x} = 45, n = 10$

Intensités des réponses maximales de Ca et P à la microsonde CAMECA MS46, en chocs/seconde. La moyenne ($\bar{x}$) est calculée d'après 10 comptages effectués sur le même point.

- *Spectrométrie X à sélection d'énergie.* L'analyse de la composition élémentaire des précipités des réactions cytochimiques a été faite sur des coupes fines non contrastées (100 nm d'épaisseur environ) voisines de celles utilisées pour l'étude ultrastructurale, à l'aide d'un microscope électronique à transmission JEOL : JEM 100 CX II équipé d'un système de balayage haute résolution (SEM-STEM) JEOL : ASID 4D et d'un détecteur de rayons X à sélection d'énergie (EDS) LINK modèle AN 10 000 à cristal Si (Li). La tension d'accélération est de 100 kV, le diamètre de sonde de 50 nm et le spectre est acquis sur un domaine d'énergie de 0 à 20 kV avec 20 eV/canal. Le temps d'analyse est de 500 secondes et le cliché du champ analysé est obtenu parallèlement au spectre. L'analyse des coupes de pièces traitées par le pyroantimonate pose un problème, car les pics calcium (Ca) et an-

timoine (Sb) se chevauchent : on les a statiquement séparés par soustraction du pic Sb par rapport à la raie $L\alpha$ de Sb (3,6 keV) et seuls les spectres traités (sans Sb) sont présentés dans les résultats. L'intérêt de cette prospection faite à l'échelle ultrastructurale est de permettre l'identification et la localisation de tous les ions constitutifs des précipités des réactions cytochimiques puisqu'il a été possible de focaliser et de balayer partiellement ou entièrement toute la surface d'un seul organe cellulaire ou d'une inclusion extracellulaire denses aux électrons.

RÉSULTATS

Rappels anatomiques et histologiques : Dans le thorax de la Sabelle sont situés la plupart des organes vitaux qui apparaissent comme des organes cibles des dépôts d'éléments minéraux ou métalliques : organe excréteur ou néphridies, la région antérieure du tube digestif, le tissu chloragène et les corps phagocytaires ; ces deux derniers organes étant régulièrement répartis tout au long de l'animal.

L'unique paire de néphridies géantes, maintenue par des dissépinements, s'étend sur toute la longueur du thorax de part et d'autre de l'intestin antérieur (Fig. 1). Chaque néphridie, traversant les 8 ou 9 cavités coelomiques, est constituée d'un tube replié sur lui-même commençant par un segment proximal étroit à cellules ciliées et terminé par un segment distal large et boursoufflé à cellules en massue ; entre les deux segments se trouve une région intermédiaire de transition (Koechlin, 1981). Le tissu chloragène est un épithélium unistratifié, naturellement pigmenté en noir, entourant les vaisseaux ventral et latéraux. Les corps phagocytaires sont des agglomérats de cellules coelomiques phagocytaires dégénérescentes flottant dans le liquide coelomique ou accolés aux organes.

La néphridie

Histochimie et cytochimie.

La réaction au GBHA, signalétique du calcium, est positive au niveau de très nombreux granules qui caractérisent l'épithélium néphridien (Fig. 2) ; leur situation et leur densité varient le long de la néphridie. Dans l'épithélium proximal, ces granules calciques sont peu nombreux et se localisent dans la zone périnucléaire des cellules ciliées, alors que dans l'épithélium distal, ils sont plus abondants et occupent tout le cytoplasme des grandes cellules en massue. Le GBHA est totalement négatif sur des coupes témoins.

Les résultats cytochimiques concordent avec ceux de l'histochimie, puisque le pyroantimonate de potassium a révélé le calcium dans les sites GBHA-positifs. Les images à l'échelle ultrastructurale précisent que les précipités de pyroantimonate de calcium denses aux électrons sont exclusivement et massivement concentrés dans des vésicules dont la membrane présente un éclatement artéfactuel rendu inévitable par la technique. Le nombre et la taille de ces vésicules à calcium va-

rient selon les trois types cellulaires qui composent l'épithélium néphridien. Dans les cellules ciliées de l'épithélium proximal, elles sont situées en majorité dans la région infranucléaire et leur diamètre est de : $342,5 \pm 12,0$ nm, $n=66$ (Fig. 3). Dans la partie intermédiaire aux deux branches néphridiennes, leur diamètre et leur nombre augmentent et elles occupent la zone périnucléaire et apicale cellulaire (Fig. 4). Les vésicules des grandes cellules en massue distales, occupant la majeure partie du cytoplasme apical, ont un diamètre de : $618,1 \pm 21,4$ nm, $n=70$ et présentent la plus forte densité de pyroantimonate de calcium (Fig. 6). Par ailleurs, la disposition des précipités de cette réaction à l'intérieur des vésicules néphridiennes est différente selon qu'elles sont situées dans les cellules proximales ou distales. Dans les vésicules "proximales", le précipité de pyroantimonate central est entouré d'une marge claire (Fig. 3, 14). Dans les vésicules "distales", ces précipités occupent tout l'espace vésiculaire et constituent un anneau périphérique à forte opacité dont l'épaisseur peut dépasser les trois quarts du rayon (Fig. 7, 12) ; parfois elles possèdent en plus un cœur central ou deux anneaux concentriques (Fig. 8). Les vésicules "distales" sont souvent groupées dans de grandes vacuoles (Fig. 7) qui sont caractéristiques des cellules les plus distales de la néphridie. Dans le segment de transition de la néphridie, les vésicules à calcium ont des aspects intermédiaires (Fig. 4). La situation intravésiculaire du calcium a été bien établie par les résultats de la méthode au NHA qui a permis, en plus de la précipitation du calcium, de préserver les membranes des vésicules. La réaction de NHA a été positive aussi bien dans les vésicules isolées (Fig. 10) que dans les amas de vésicules intravacuolaires des cellules distales (Fig. 11). L'extraction totale des précipités des réactions cytochimiques a été obtenue après une heure d'incubation des coupes fines sur une solution d'EDTA ou d'EGTA (Fig. 9, 13).

Planches I, II et III
Histochimie et Cytochimie du calcium

Fig. 1 et 2 - Coupes frontales de thorax de Sabelle. Réaction au GBHA sur tissu frais (coupes au cryostat). 1) disposition des néphridies de part et d'autre du tube digestif (TD). 2) localisation de granules calciques dans les épithéliums néphridiens proximal (NP) et distal (ND) et dans la partie apicale de l'épithélium de l'intestin antérieur (1). C : cavité coelomique. Lu : lumière intestinale. Pa : parapode.

Fig. 3 à 8 - Réaction au pyroantimonate de potassium sans coloration. 3) cellules proximales. 4) cellules intermédiaires. 5) région apicale des cellules digestives. 6) cellules distales de la néphridie. 7) vésicules intravacuolaires des cellules distales. 8) organisation en strates concentriques des dépôts calciques dans les cellules distales de la néphridie.
A : zone apicale. B : zone basale. C : cil. Li : lipide. Lu : lumière. n : noyau. μv : microvillosité.

Fig. 9 - Témoin décalcifié des vésicules pyroantimonate-positives des cellules distales.

Fig. 10 et 11 - Réaction au NHA sans coloration. 10 : vésicules isolées des cellules distales. 11 : vésicules intravacuolaires des grandes cellules en massue de la néphridie. Mb : membrane.

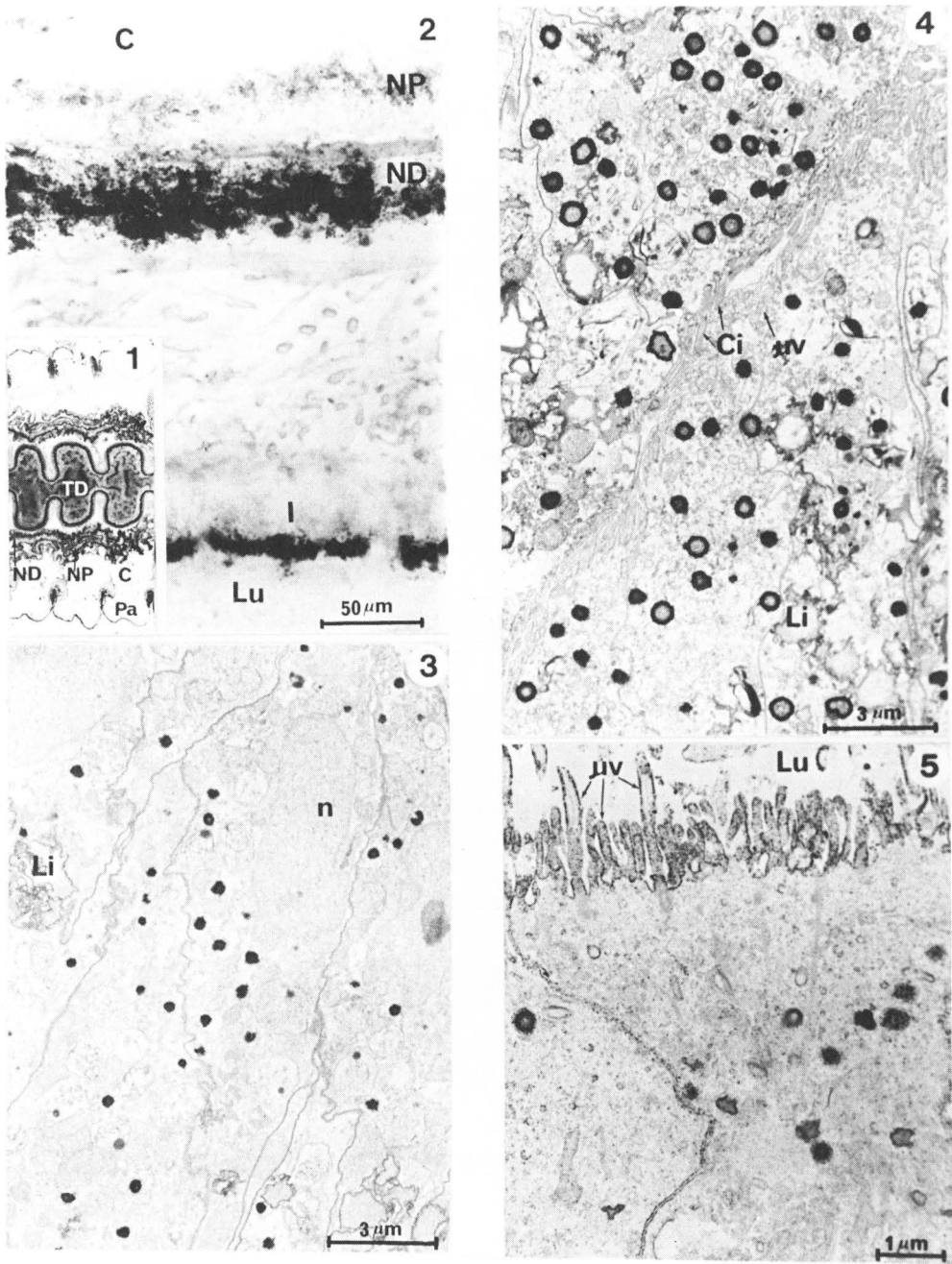


PLANCHE I

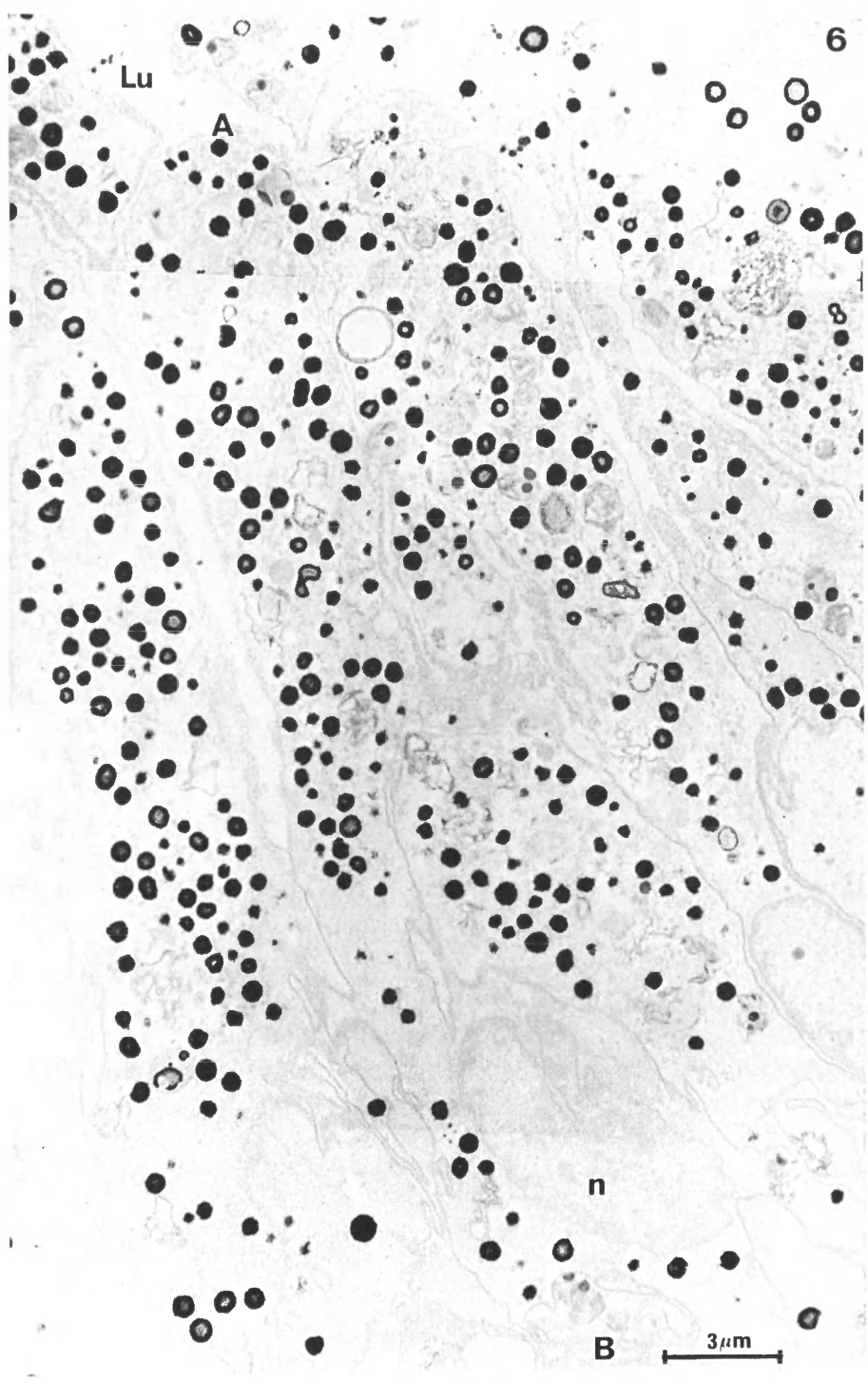


PLANCHE II

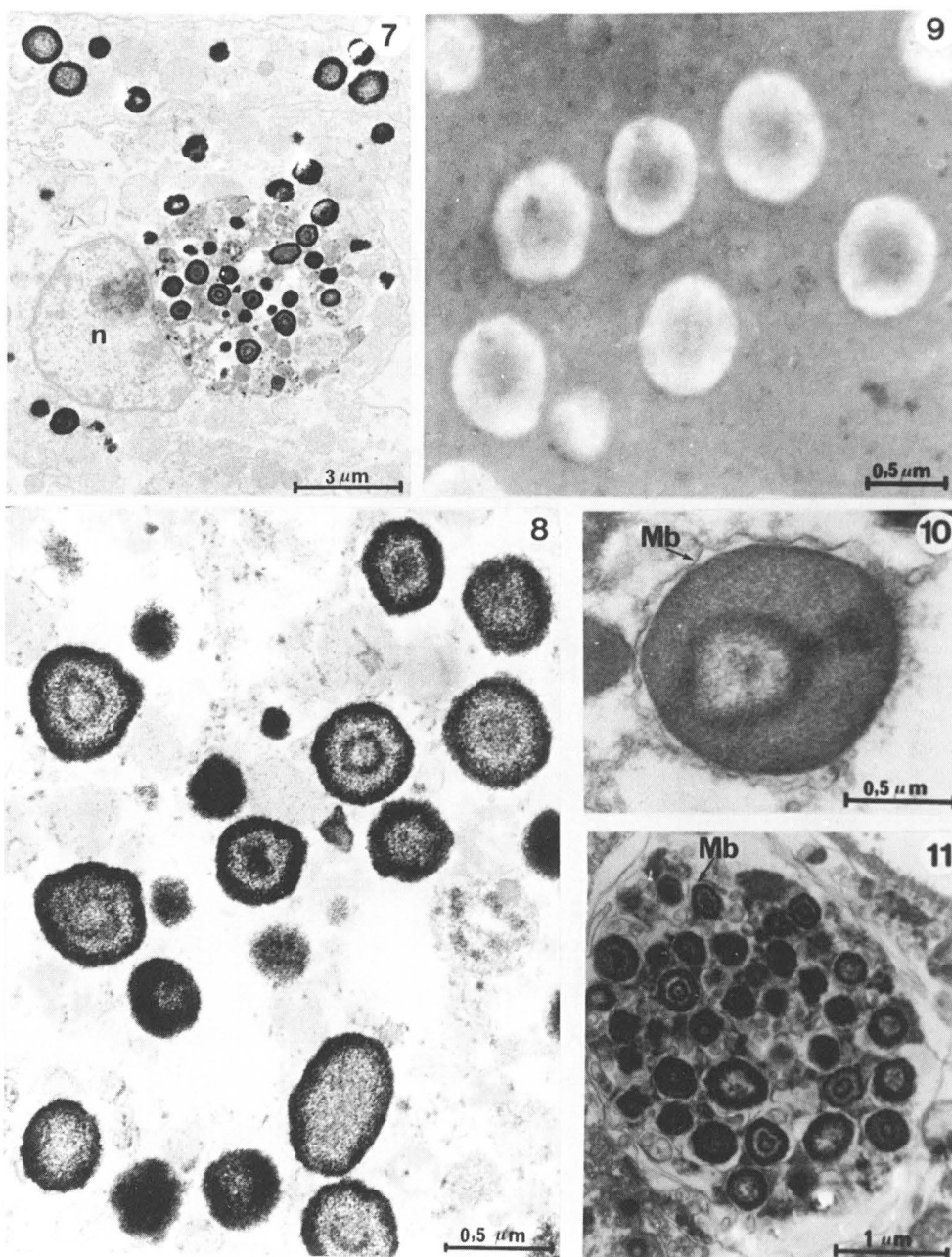


PLANCHE III

Microanalyse X à l'échelle tissulaire et cellulaire.

Le calcium et le phosphore ont été détectés parallèlement et sur les mêmes sites dans le tissu néphridien à l'aide de la microsonde électronique en dispersion de longueur d'onde. Les valeurs moyennes décelées sont plus importantes dans le tissu frais (coupe au cryostat) que dans le tissu fixé. Elles sont respectivement de 275 chocs/s (maximum à 300) et 40 chocs/s (maximum à 102) pour le calcium et de 106 chocs/s (maximum à 120) et 20 chocs/s (maximum à 30) pour le phosphore (cf. tableau). La microanalyse en sélection d'énergie des précipités de pyroantimonate intravésiculaires de la néphridie aussi bien distale (Fig. 12 & 12 bis) que proximale (Fig. 14 et 14 bis) a fourni des spectres d'énergie dans lesquels les éléments identifiables sont le calcium, le phosphore et le soufre. Les pics de l'antimoine (soustrait des spectres présentés), de l'osmium, du chlore et du cuivre sont dus respectivement à la réaction cytochimique, à l'acide osmique de la fixation, à la résine d'inclusion et à la grille support des coupes. Dans le spectre témoin (Fig. 13 & 13 bis), on note la disparition des pics Ca-Sb. Le sodium et le magnésium qui sont susceptibles d'être précipités par le pyroantimonate ne sont pas présents en quantités décelables dans la néphridie. Les mêmes résultats sont obtenus dans les vésicules néphridiennes NHA-positives mais avec une réponse calcium moins intense que celle obtenue avec le pyroantimonate.

L'intestin antérieur.

Des granules calciques GBHA-positifs sont localisés dans la partie apicale de l'épithélium de l'intestin antérieur (Fig. 1, 2). Le pyroantimonate de potassium a donné des précipitations dans des vésicules situées à l'apex des cellules digestives (Fig. 5). L'examen microanalytique par dispersion de longueur d'onde a révélé l'association fréquente de calcium (80 chocs/s) et de phosphore (75 chocs/s) dans le tube digestif (cf. tableau).

Le tissu chloragogène

Le tissu chloragogène qui doit son nom à des granulations pigmentaires et réfringentes, les chloragosomes, est très riche en fer et en phosphore. En effet, les chloragocytes sont connus pour être impliqués dans le cycle du fer lié au métabolisme des pigments respiratoires. La détection histochimique du calcium a donné des résultats incertains et difficiles à interpréter dans le tissu chloragogène car la coloration rouge, signalétique de la présence du calcium (GBHA), est masquée par la forte pigmentation brune des chloragosomes. Cependant, à l'échelle cellulaire, des précipités de pyroantimonate de calcium formant des granules denses aux électrons ont pu être observés sur des coupes fines non colorées (Fig. 15) ; ceux-ci sont répartis dans le cytoplasme et sont distincts des chloragosomes. La microanalyse en dispersion de longueur d'onde a confirmé la présence du calcium (40 chocs/s) associé à du phosphore (55 chocs/s) sur tissu frais. Pour le tissu chloragogène, la minoration de la réponse calcium du tissu frais par rapport au tissu fixé,

discordant avec les autres organes, est due à une variation individuelle. Dans les chloragosomes, la microanalyse en sélection d'énergie a détecté le phosphore et le calcium en faible quantité ; par contre le fer y est très abondant, contrairement aux granules denses pyroantimonate-positifs (Fig. 15 bis).

Les corps phagocytaires.

Les sites calciques GBHA-positifs sont punctiformes, à répartition aléatoire et variable selon les corps phagocytaires. Le pyroantimonate de potassium a donné des résultats positifs au niveau de fins granules à distribution irrégulière, toujours extravésiculaires (Fig. 16). L'étude microanalytique a révélé du calcium (110 chocs/s) et du phosphore (45 chocs/s) (cf. tableau).

Les milieux extracellulaires.

Le traitement au pyroantimonate de potassium réalisé sur des segments complets, bien délimités par des dissépiments continus, nous a permis de préserver les sites calciques extracellulaires de la cavité coelomique, de la lumière néphridienne et du tissu conjonctif. Également, le contenu des vaisseaux sanguins a été bien conservé, ce qui n'était possible que dans ces conditions de prélèvement. Dans le tissu conjonctif sous-jacent aux lames basales néphridienne, vasculaire, digestive et des dissépiments, on observe de nombreuses concrétions pyroantimonate-positives souvent arrangées le long des fibres collagènes. Ces concrétions sont plus abondantes dans le tissu conjonctif de la néphridie distale et ont un diamètre de 100 à 150 nm (Fig. 17). Dans le sang du sinus péri digestif et des autres vaisseaux, des concrétions identiques et de même ordre de grandeur sont positives au pyroantimonate de potassium (Fig. 18). Dans la cavité coelomique, des petites concrétions sphérulitiques pyroantimonate-positives de 100 nm de diamètre environ s'associent en amas ovoïdes de 4 à 5 μ m (Fig. 19). Dans la lumière néphridienne des concrétions denses aux électrons, de 700 nm de diamètre environ, peuvent être groupées (Fig. 20). L'analyse élémentaire en sélection d'énergie de ces concrétions extracellulaires a permis d'identifier le calcium comme élément principal précipité par le pyroantimonate (Fig. 17 bis, 18 bis, 19 bis & 20 bis).

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'application conjointe des techniques histochimiques, cytochimiques et biophysiques a révélé une bioaccumulation naturelle du calcium chez la Sabelle aussi bien dans les cellules que dans les milieux extracellulaires. Les réactions au pyroantimonate de potassium et au NHA ont donné des résultats clairement interprétables et superposables. L'extraction des précipités cytochimiques par les chélateurs a indiqué que le calcium était le principal cation précipité par ces deux

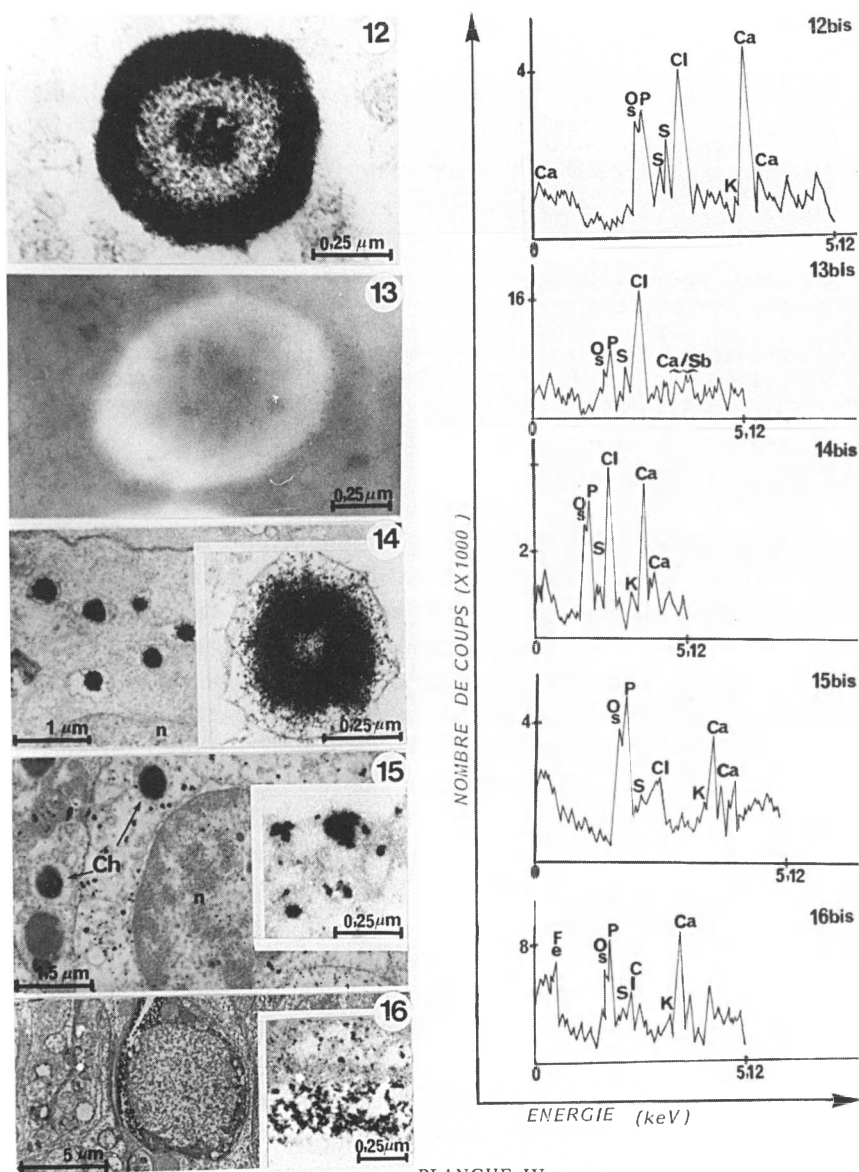


PLANCHE IV

Planches IV et V
Spectrométrie X à sélection d'énergie

La microanalyse des précipités de pyroantimonate a été effectuée sur des coupes fines non colorées. Les pics calcium-antimoine (Ca/Sb) ont été statistiquement séparés par soustraction des pics Sb par rapport à la raie $L\alpha$ de Sb (3,6 Kev).

Dans les vésicules des cellules distales (12, 12 bis) et celles des cellules proximales néphridiennes (14, 14 bis) ainsi que dans les granules des chloragocytes (15, 15 bis) et des corps phagocytaires (6, 16 bis), les principaux éléments identifiés sont le calcium, le phosphore et le soufre. L'osmium (OsO_4) et le chlore (Epon) ont été introduits. Sur le spectre témoin des vésicules "distales" décalcifiées (3, 13 bis), les pics Ca-Sb disparaissent.

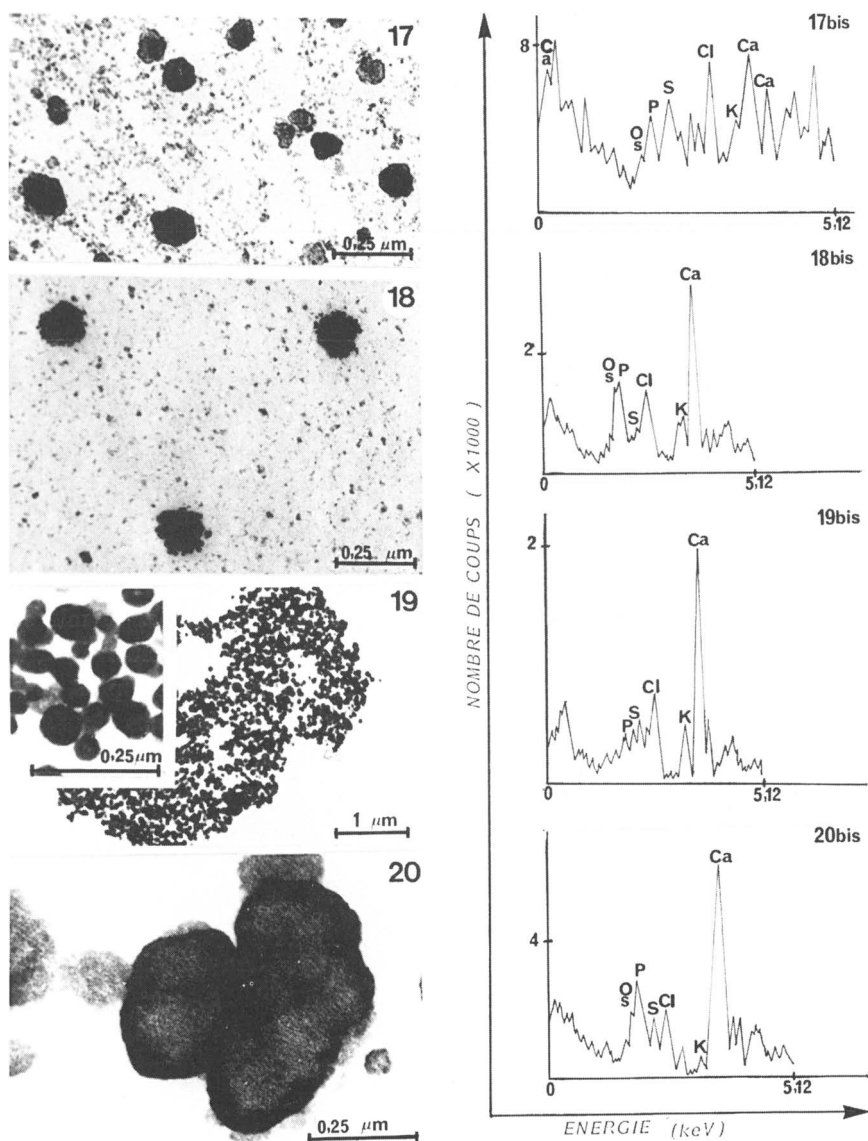


PLANCHE V

Dans les milieux extracellulaires, le calcium a été identifié dans les précipités de pyroantimonate au niveau des concrétions du tissu conjonctif sous-jacent à la néphridie distale (17, 17 bis), du sang (18, 18 bis) de la cavité coelomique (19, 19 bis) et de la lumière néphridienne (20, 20 bis).

Ch : chloragosomes, n : noyau.

réactifs. Chez cet animal, la complexation du calcium par les réactifs cytochimiques sous forme de sels insolubles a permis une excellente mise en évidence et une bonne préservation de l'intégrité des structures cellulaires riches en calcium. Le traitement cytochimique pratiqué sur des segments entiers de la Sabelle nous a donné des résultats de meilleure qualité que ceux fournis sur des fragments d'organes prélevés. Dans ces conditions originales, les réactions cytochimiques et la fixation se font en présence des fluides corporels, ce qui a dû favoriser une diffusion progressive du fixateur et des réactifs en même temps qu'un éventuel ajustement de la pression osmotique et de la force ionique.

Pendant, la spécificité de la réaction au pyroantimonate de potassium a été mise en question par de nombreux auteurs, car ce réactif précipite le sodium, le calcium et le magnésium (Ackerman & Clark, 1972, Clark & Ackerman, 1971, Klein *et al.*, 1972 ; Tandler *et al.*, 1970). Compte tenu de la polyvalence de cette réaction, on a eu recours au NHA pour la révélation ultracytochimique du calcium. Caractérisé par sa sensibilité et sa sélectivité au calcium qui sont supérieures à celles des autres réactifs couramment employés en cytochimie (Zechmeister, 1979 ; Davis *et al.*, 1987), ce produit pourrait aussi précipiter le magnésium et d'autres cations, mais l'intérêt de son utilisation est qu'il ne précipite ni le sodium ni le potassium à des concentrations physiologiques et ne contient pas de métaux lourds (comme l'antimoine) qui peuvent causer des problèmes d'interférence en microanalyse X (Slocum & Wang, 1982). Les données apportées ici par la microanalyse ont permis de lever tous les doutes concernant la présence exclusive du calcium dans les précipités obtenus par les traitements cytochimiques. De plus, la présentation originale des spectres d'analyse avec soustraction des pics de l'antimoine rend plus claire l'expression des résultats obtenus que sur des spectres initiaux.

La superposition constatée du calcium et des pigments localisés dans les vésicules des cellules néphridiennes rappelle le mélange de pigments et de sels minéraux déjà mentionné dans les tubes de Malpighi (Ballan-Dufrançais & Martoja, 1971) et celui du calcium et des pigments (non identifiés) dans la néphridie de *Pomatoseros* (Vovelle *et al.*, sous presse). L'étude histochimique des pigments néphridiens de la Sabelle avait permis d'identifier des caroténoïdes dans les lipides des cellules proximales et des céroïdes dans les nombreux granules des grandes cellules distales (Koechlin, 1972). Chez la Sabelle, la découverte d'un gradient calcium croissant depuis le segment proximal jusqu'au segment distal de la néphridie, parallèle au gradient pigmentaire déjà signalé, évoque un enrichissement progressif en calcium des vésicules néphridiennes. L'association du calcium et du phosphore et la superposition des sites calciques et pigmentaires laissent supposer que le calcium formerait avec les groupements phosphates des pigments des complexes organominéraux. Ainsi l'organisation en strates concentriques commençant à apparaître dans les cellules intermédiaires et se multipliant dans les cellules les plus distales de la néphridie impliquerait un dépôt périodique du composé calcique réalisé au fur et à mesure de la maturation des vésicules en témoignant de leur permanence

intracellulaire au cours de leur évolution. On peut ainsi conforter l'hypothèse (Koechlin, 1972) que les cellules distales sont des formes matures des cellules proximales qui auraient progressivement translaté vers la partie terminale de la néphridie. La présence de vacuoles surchargées de vésicules calciques et pigmentaires dans les cellules distales les plus "mûres" apporte un argument de plus en faveur de cette maturation progressive. Le rejet naturel d'une grande partie du cytoplasme des cellules distales, voire de cellules âgées entières, dans la lumière néphridienne (Koechlin, 1978) montre que la néphridie de la *Sabelle* peut jouer un double rôle dans le stockage et dans l'excrétion du calcium. Ainsi les vésicules pigmentaires et calciques de la néphridie peuvent être considérées comme des compartiments subcellulaires pour une séquestration progressive des ions calcium débutant à partir des premières cellules proximales. Ces vésicules, une fois surchargées en pigments et en calcium, sont excrétées avec une partie de cytoplasme dans la région terminale du segment distal.

L'accumulation du calcium dans les vésicules apicales des cellules de l'intestin antérieur peut correspondre à une immobilisation provisoire du calcium alimentaire absorbé par les cellules digestives.

Le calcium décelé dans le tissu chloragène et dans les corps phacocytaires contraste avec celui de la néphridie et de l'intestin car il n'est ni intravésiculaire, ni associé à des pigments ; il est plus généralement distribué dans les cellules, ce qui le rend peut-être plus facilement mobilisable.

Si le calcium de la matrice conjonctive sous l'épithélium néphridien peut être considéré comme étant piégé et en situation transitoire précédant l'incorporation aux cellules néphridiennes, il n'en est pas de même pour le calcium coelomique et intravasculaire qui est plus mobile. La méthode originale de fixation *in toto* qui nous a permis l'exploration du contenu des liquides corporels apporte un élément nouveau qui est la grande quantité de concrétions calciques circulantes du liquide coelomique et du sang. Leur richesse en calcium pourrait être en relation avec la régulation de l'équilibre cationique et de la pression osmotique du milieu intérieur ; en rapport aussi avec l'adaptation de l'animal aux conditions du milieu extérieur. Par ailleurs, le métabolisme calcique chez les Annélides, pour lequel aucune étude dynamique n'est actuellement disponible, exige peut-être de très grandes quantités de calcium.

Ce travail met en évidence chez la *Sabelle* une abondance du calcium qui semble disproportionnée avec ses besoins apparents puisqu'elle ne possède aucune structure squelettique ni tube calcaire. On pourrait expliquer cela par la nécessité chez ces animaux de maintenir un métabolisme calcique très intense en relation avec le maintien des constantes de leur milieu intérieur.

REMERCIEMENTS

L'auteur tient à remercier M. le Professeur J. Vovelle pour son accueil et ses éminents conseils. Il remercie également M^{me} N. Koechlin et M. Grasset pour leur assistance et leur collaboration.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ACKERMAN, G.A. & M.A. CLARK. 1972. A cytochemical evaluation of pyroantimonate binding to the plasmalemma of blood and bone marrow cells and its relationship to cellular maturation. *J. Histochem. Cytochem.* 20 : 880-895.
- APPLETON, J. & D.C. MORRIS. 1979. The use of the potassium pyroantimonate-osmium method as a mean of identifying and localizing calcium at the ultrastructural level in the cells of calcifying systems. *J. Histochem. Cytochem.* 27 : 676-680.
- BALLAN-DUFRANÇAIS, C. & R. MARTOJA. 1971. Analyse chimique d'inclusions minérales par spectrographie des rayons X et par cytochimie. Application à quelques organes d'Insectes Orthoptères. *J. Microsc.* 11 : 219-248.
- BOILLY, B., 1967. Sur la régénération d'un intestin dans la zone pharyngienne chez *Syllis amica* Quatre-fages (Annelide Polychète). *Cah. Biol. Mar.* 8 : 221-231.
- BOILLY, B. & A. RICHARD. 1978. Accumulation de fer chez une Annélide Polychète : *Magelona papillicornis* F. Müller. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 286 : 1005-1008.
- CLARCK, M.A. & G.A. ACKERMAN. 1971. A histochemical evaluation of the pyroantimonate-osmium reaction. *J. Histochem. Cytochem.* 19 : 727-737.
- COULON, J., J.P. ARSANTO & Y. THOUVENY. 1986. Striated ciliary root-golgi association in branchial crown epithelial cells of *Owenia*. Visualization of Ca²⁺-binding sites and ATPase activities. *Protoplasma*. 130 : 108-119.
- DAVIS, W.L., R.G. JONES, H.K. HAGLER, G.R. FARMER & D.B.P. GOODMAN. 1987. Histochemical and elemental localization of calcium in the granular cell subapical granules of the Amphibian urinary bladder epithelium. *Anat. Rec.*, 218 : 229-236.
- DEBBAS, G., L. HOFFMAN, E.J. LANDON & L. HORWITZ. 1975. Electron microscopic localization of calcium in vascular smooth muscle. *Anat. Rec.*, 182 : 447-472.
- DENNAI, N., N. DHAINAUT-COURTOIS, J.M. BOUQUENEAU & A. NEJMEDDINE. 1986. Effet du cadmium et du mercure sur un ver marin (*Nereis diversicolor* O.F. Müller). Mécanismes de détoxification. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 302 (13) : 489-494.
- KLEIN, R.L., S.S. YEN & A. THURESON-KLEIN. 1972. Critique on the K-pyroantimonate method for semiquantitative estimation of cations in conjunction with electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 20 : 65-78.
- KOECHLIN, N., 1972. Étude histochimique et ultrastructurale des pigments néphridiens et coelomiques d'une Annélide Polychète (Sabellé). *Ann. Histochim.*, 17 : 27-54.
- KOECHLIN, N., 1978. Sécrétion d'éléments figurés dans l'urine d'un Invertébré marin *Sabella pavonina* S. (Annélide Polychète). *Biol. Cell*, 33, 25A, abs.
- KOECHLIN, N., 1981. Structure and function of the nephridia in *Sabella pavonina* S. (Polychaeta Annelida). *Comp. Biochem. Physiol.*, 69 : 349-355.
- MICHEL, C., M. BHAUD, P. BOUMATI & S. HALPERN. 1984. Physiology of the digestive tract of the sedentary polychaete *Terebellides stroemi*. *Mar. Biol.*, 83 : 17-31.
- SHIINA, S.I., V. MIZUHIRA, T. AMAKAWA & Y. FUTAESAKU. 1970. An analysis of the histochemical procedure for sodium ion detection. *J. Histochem. Cytochem.*, 18 : 644.
- SLOCUM, R.D. & K. WANG. 1982. Ultrastructural localization of tissue calcium using N, N-Naphthaloylhydroxylamine (NHA). *J. Cell Biol.*, 95 : 463A.
- TANDLER, C.J., C.M. LIBANATI & C.A. SANCHIS. 1970. The intracellular localization of inorganic cations with potassium pyroantimonate. Electron microscope and microprobe analysis. *J. Cell Biol.*, 45 : 355-366.

- VOVELLE, J., 1956. Processus glandulaires impliqués dans la reconstitution du tube chez *Pomatoceros triqueter* (L.) Annélide Polychète (Serpulidae). *Bull. Lab. mar. Dinard*, 42 : 10-32.
- VOVELLE, J., M. GRASSET & M. TRUCHET. 1987. Sites of biomineralization among Polychaetes, mainly Serpulids (sous presse).
- ZECHMEISTER, A., 1979. A new selective ultrahistochemical method for the demonstration of calcium using N, N-Naphthaloylhydroxylamine. *Histochem.*, 61 : 223-232.