

Données nouvelles sur la formation et la composition du tube larvaire de *Pectinaria* (= *Lagis*) *Koreni* Malmgren (Annélide Polychète)

J. Vovelle et M. Grasset

Université Pierre et Marie Curie

Laboratoire d'Histologie et Cytologie des Invertébrés Marins
12, rue Cuvier, 75230 Paris cedex 05

Résumé : Le tube membraneux qui protège la larve aulophore de *Pectinaria koreni* est sécrété par des glandes qui préfigurent les glandes cémentaires de l'adulte. Des sécrétions sphérolaires d'un seul type, dit "hétérogène à membrane", le constituent ; elles se dilatent en une couche d'éléments creux aplatis qui forment une paroi mince. A la métamorphose, d'autres sécrétions s'ajoutent pour constituer le ciment interstitiel de l'adulte, mais les sphérolites primitives ont déjà une composante minérale proche de ce dernier. Trois méthodes de microanalyse ont permis d'y reconnaître un matériau phosphaté principal, probablement organique, associé à du calcium, un peu de magnésium et des traces d'aluminium. Ces caractères qui permettent de rapprocher la formation, la structure et la nature du fourreau larvaire et du ciment du tube adulte soulignent un trait original du stade aulophore des Amphictenidae.

Abstract : The membranaceous tube which protects the aulophora larva of *Pectinaria koreni* is elaborated by glands announcing the adult cement glands. Sphaerular secretions, belonging to the single type "heterogenous with membrane", form this tube by expanding in a layer of hollow and flat elements, making up a thin wall. When metamorphosing, some other secretions intervene to build up the adult interstitial cement, but the early spherules soon possess a mineral composition comparable to the adult ones. Three microanalysis methods characterised a main phosphated component, in association with calcium and some magnesium, plus traces of aluminium. These characteristics allow us to compare the make up, structure and chemical composition of the larval sheath with the adult cement, and emphasize an original feature of the aulophora stage of Amphictenidae.

INTRODUCTION

Le concept de larve "aulophore" (porteuse de tube) a été proposé par Kessler (1963) pour définir un stade planctonique du développement du Terebellidae *Lanice conchilega*. Le terme a été repris et systématisé depuis, en fonction de ses implications biologiques et écologiques : il permet en raison de la présence d'un système formant flotteur d'admettre une phase pélagique planctotrophe longue, qui intervient dans la dissémination de l'espèce (Cazaux, 1981 ; Bhaud & Cazaux, 1987). Il a aussi été exploité dans une perspective phylogénique, comme un caractère servant au rapprochement des Terebellidae et des Amphictenidae dans l'ensemble des Térébellomorphes (Mileikovsky, 1977). A propos de l'Amphictenidae *Pectinaria koreni*, objet de notre étude, Elkaïm et Irlinger (1987) mentionnent, d'après ces données, son stade "aulophore" doté d'un tube muqueux assurant sa flottaison. En fait on peut discuter cette généralisation car le tube larvaire des Pectinaires n'est pas vraiment muqueux. Nous avons donné (Tiberi & Vovelle, 1975) une interprétation histologique et histochimique de la formation du tube larvaire chez *Lanice*, et proposé (Vovelle, 1973) pour celui de *Pectinaria koreni* une première description à l'échelle photonique. Nous avons retenu pour *Pectinaria* le terme de tube membraneux, communément admis depuis les

descriptions de Watson (1928) et de Thorson (1946) *inter alia*. Il nous apparaît que le tube de la larve aulophore de *Pectinaria* n'est comparable avec celui de *Lanice* ni dans sa consistance ni dans sa matière ; de plus les formations glandulaires qui lui donnent naissance et qui préfigurent celles de l'adulte (en position ventrale et en situation interne) ne sont pas homologues des importantes "glandes dorsales" provisoires à sécrétion surtout polysaccharidique que nous avons reconnues chez la larve aulophore de *Lanice*.

Nos résultats antérieurs portant sur la formation et la nature du ciment du tube de *Pectinaria koreni* et d'autres Amphictenidae comme *Petta pusilla* (Vovelle & Grasset, 1976 ; Truchet & Vovelle, 1977 ; Vovelle, 1979) nous ont permis de décrire les éléments qui le constituent : ce sont des sécrétions sphérolaires de plusieurs types, associant une composante organique et une composante minérale (phosphatée et surtout calco-magnésienne). Nous avons proposé de reconnaître dans la structure bulleuse de ce ciment, déjà remarquée par Fauvel (1903) comme "une structure d'apparence cellulaire", l'association de sphérolites sécrétoires dilatées, et indiqué qu'on pouvait interpréter l'apparence du tube membraneux de la larve aulophore en y identifiant les mêmes sphérolites, disposées en une seule couche.

Le présent travail se propose de confirmer cette dernière hypothèse, en poursuivant à l'échelle ultrastructurale l'examen de la paroi du tube larvaire, comparée aux sécrétions glandulaires, et en utilisant plusieurs méthodes de microanalyse pour détecter une composante minérale dans ce que nous avions prématûrement désigné comme un "fourreau organique" (Vovelle, 1973). Le problème posé est celui de la continuité de structure et de nature entre le tube larvaire et le ciment de l'adulte, et des changements possibles caractérisant la métamorphose.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Récolte.

Elle a été effectuée le 12 juillet 1983 à Hornbaek Bugt, à 9 km au Nord-Ouest de la Station de Biologie Marine d'Helsingør, à une profondeur de 11 m, au moyen d'un "detritus sledge" du modèle décrit par Ockelmann (1964), muni d'un filet récepteur de largeur de maille 450 µm. Les conditions, la date et la place sont à peu près identiques à celles de la récolte de 1971 qui nous avait permis une première description (Vovelle, 1973) du tube larvaire à l'échelle photonique ; on s'y reportera pour la description du contexte écologique. Le tri a fourni 11 post-larves, dont 5 avec leur tube initial intact, comprenant la partie initiale membraneuse prolongée par une section d'une longueur variable renforcée par des grains exogènes (longueur totale 1,5 à 2 mm) et 6 mm plus âgées, à tube essentiellement arénacé (longueur 3 mm).

Fixation, Cytologie.

Un tube membraneux vide a été traité en même temps que 6 spécimens post-larvaires par fixation simple au glutaraldéhyde tamponné (1 h 30 à 4°C), suivie de déshydratation et

inclusion à l'araldite. Cinq autres post-larves ont subi, entre le traitement au glutaraldéhyde et la déshydratation, une post-fixation (2 h) au tétr oxyde d'osmium à 2 % dans le tampon à pH 7,2. Après inclusion, les pièces ont été coupées au rasoir de diamant sur microtome Reichert OMV 2. L'anatomie microscopique a été établie sur coupes semi-fines colorées au bleu de toluidine tamponné, des coupes voisines servant à la micro-analyse. L'étude cytolistique ultrastructurale, à partir de pièces post-osmiées ou non, a été établie sur coupes ultrafines (contrastées, pour les post-osmiées, par la double coloration de Reynolds). L'observation a été faite sur un microscope électronique Philips EM 301 sous tension de 60 à 80 kV.

Microanalyse

Microanalyse par émission ionique secondaire. Des coupes semi-fines de larves fixées au glutaraldéhyde et de tube larvaire ont été étalées sur support en platine et examinées au microanalyseur ionique CAMECA SMI 300 dans des conditions suivantes : bombardement O₂ 7,5 µA, diaphragme de lentille 200 µm, bande passante 15 eV, grandissement 115, résolution sur image 1 µm, résolution en masse $\frac{M}{\Delta M} = 300$, les spectres sont acquis sur tout le champ image (diamètre 250 µm).

Microanalyse X en dispersion de longueur d'onde. Des coupes semi-fines de tube larvaire ont été montées sur terphane carboné et analysées à la microsonde CAMECA MS 46 équipée de spectrographes dispersifs en longueur d'onde à cristaux KAP et PET, dans les conditions suivantes : tension d'accélération 15 kV, courant d'échantillon 40 nA, diamètre de sonde 1 µm environ.

Microanalyse X en sélection d'énergie. L'analyse a été pratiquée avec un microscope électronique TEMSCAN JEOL JEM 100 CXII équipé d'un système de balayage à haute résolution (SEM TEM) JEOL ASID 4D et d'un détecteur de rayons X à sélection d'énergie (EDS) LINK modèle AN 10 000 à cristal Si (Li). Des coupes fines (épaisseur 100 nm) de pièces fixées au glutaraldéhyde seul portées sur grilles de cuivre ont été examinées dans les conditions suivantes : tension d'accélération 60 à 100 kV, diamètre de sonde 50 nm, temps de comptage 150 à 400 s. La surface analysée correspond en général au balayage d'un carré de 250 x 250 nm, complété par quelques analyses ponctuelles.

RÉSULTATS

Histologie et Cytologie

Histologie (Pl. I B). En microscopie photonique, les cinq larves examinées sur coupes semi-fines transversales ou sagittales présentent un diamètre assez comparable de 350 µm au niveau des massifs glandulaires cémentaires très développés, ce qui correspond à un état intermédiaire entre les stades que nous avons désignés comme B et C (Vovelle, 1973). Ce

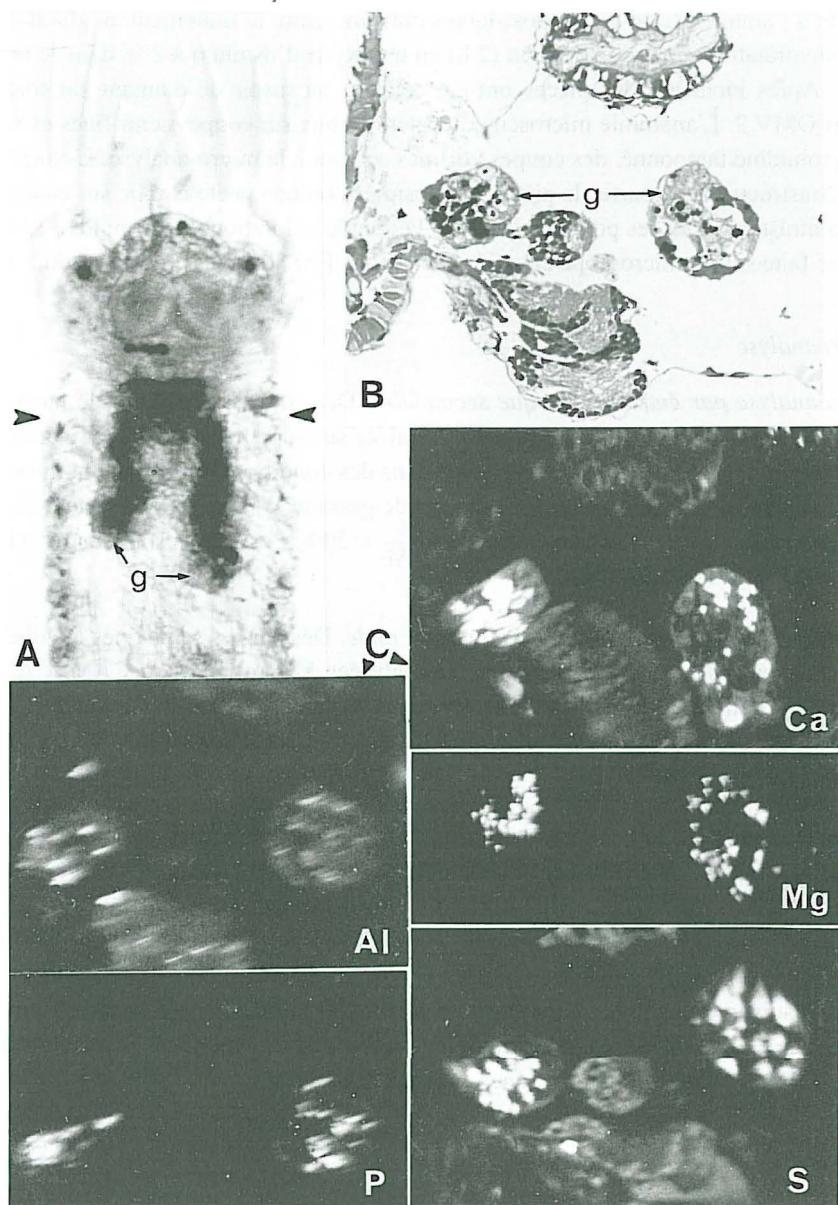


PLANCHE I

L'animal. A: Partie antérieure du ver au stade "C" après la métamorphose. B : Coupe semi-fine transversale (au niveau marqué en A par des flèches) d'un individu de même âge fixé au glutaraldéhyde, coloration au bleu de toluidine tamponné (g : lobes de la glande cémenteuse, ventrale au tube digestif). C : Images d'émission ionique de coupes voisines de la coupe B, au même grossissement ($\times 375$), correspondant aux éléments, intensités et temps de pose suivants, Ca (40^+), $1.10^{-15}A$, 100 s ; Mg (24^+), $8.10^{-17}A$, 3 min ; S (32^+), $6.10^{-17}A$, 15 min ; Al (27^+), $5.10^{-17}A$, 15 min ; P (31^+), $1.10^{-17}A$, 20 min.

diamètre est un peu supérieur à celui de la partie terminale du tube membraneux à sa frontière avec le tube arénacé définitif. La présence sur coupes de 5 paires de soies palées confirme l'identification du stade larvaire.

Les deux massifs glandulaires cylindriques ventraux présentent en section transversale un diamètre d'environ 60 µm. Ils comportent un nombre limité de cellules de grande taille (plus de 20 µm), déjà différenciées et diversifiées, plus ou moins chargées de sécrétions qui occupent une place importante. Ces glandes sont déjà bien fonctionnelles et la zone superficielle évacuatrice des produits est identifiable, épaisse alors que l'épithélium de revêtement larvaire est très mince, mais pas encore déprimée en fossette.

Cytologie à l'échelle ultrastructurale. Même si les cinq larves comparées ne sont pas exactement au même degré de développement, les glandes cémentaires présentent déjà plusieurs types de grains de sécrétion que nous décrivons par référence à ceux déjà reconnus chez l'animal adulte (Vovelle, 1979). On distingue deux catégories principales de sphérule : hétérogènes et homogènes. Ces dernières sont les plus petites (diamètre de 1,2 à 1,75 µm) (Pl. III E). Les hétérogènes ($d : 1,6 \text{ à } 2,2 \mu\text{m}$) sont généralement délimitées par une "membrane" épaisse de 25 nm, plus ou moins plissée, et présentent une partie centrale moins opaque aux électrons que la périphérie ("nucleus" de 0,7 µm de diamètre). La partie corticale sous la membrane est plus ou moins structurée, souvent presque homogène ; elle peut être vermiculée ou organisée en plaquettes généralement parallèles à la surface de la sphérule (Pl. III D & E). Une variante de cette organisation concerne les sphérules feuilletées, qui apparaissent uniquement constituées de plaquettes, avec une région centrale importante, et sans membrane (Pl. III A). Par comparaison avec ce que nous avons décrit chez l'animal adulte, on remarque que les mêmes catégories se maintiennent *grosso modo* mais que les sphérules hétérogènes se diversifient plus nettement chez l'adulte en petites formations à plaquettes et en grosses sans plaquettes (diamètre jusqu'à 4,5 µm). Cette comparaison doit être relativisée par le fait que, pour l'étude des larves, nous avons utilisé de préférence des pièces fixées au glutaraldéhyde seul, et que la post-osmication semble provoquer des changements structuraux, peut-être des altérations, dans la partie corticale des sphérules hétérogènes. L'examen comparatif des animaux fixés au glutaraldéhyde seul ou post-osmiés permet de reconnaître dans le premier cas une apparence des sphérules sans doute plus fidèle à la réalité. L'osmication entraîne des dépôts opaques aux électrons dans une partie de la région centrale des sécrétions hétérogènes, et un renforcement irrégulier de la membrane périphérique de ces dernières, elle entraîne ou révèle une dilatation de la zone immédiatement sous-jacente à la membrane, qui se vacuolise irrégulièrement (Pl. III A). Comme chez l'adulte, des vésicules d'origine golgiennes sont à l'origine du matériel élaboré, en particulier de secteurs de la membrane qui se soudent.

L'examen ultrastructural du tube larvaire en section transversale révèle l'organisation des éléments unitaires qui lui confèrent son aspect "cellulaire" ou bulleux à l'échelle de la microscopie photonique (Pl. II C). Il s'agit d'une juxtaposition de logettes creuses, rectangulaires en section, alors qu'elles doivent être circulaires ou polygonales par pression réciproque dans leurs faces tournées vers l'animal ou vers l'extérieur. Ces cylindres très aplatis

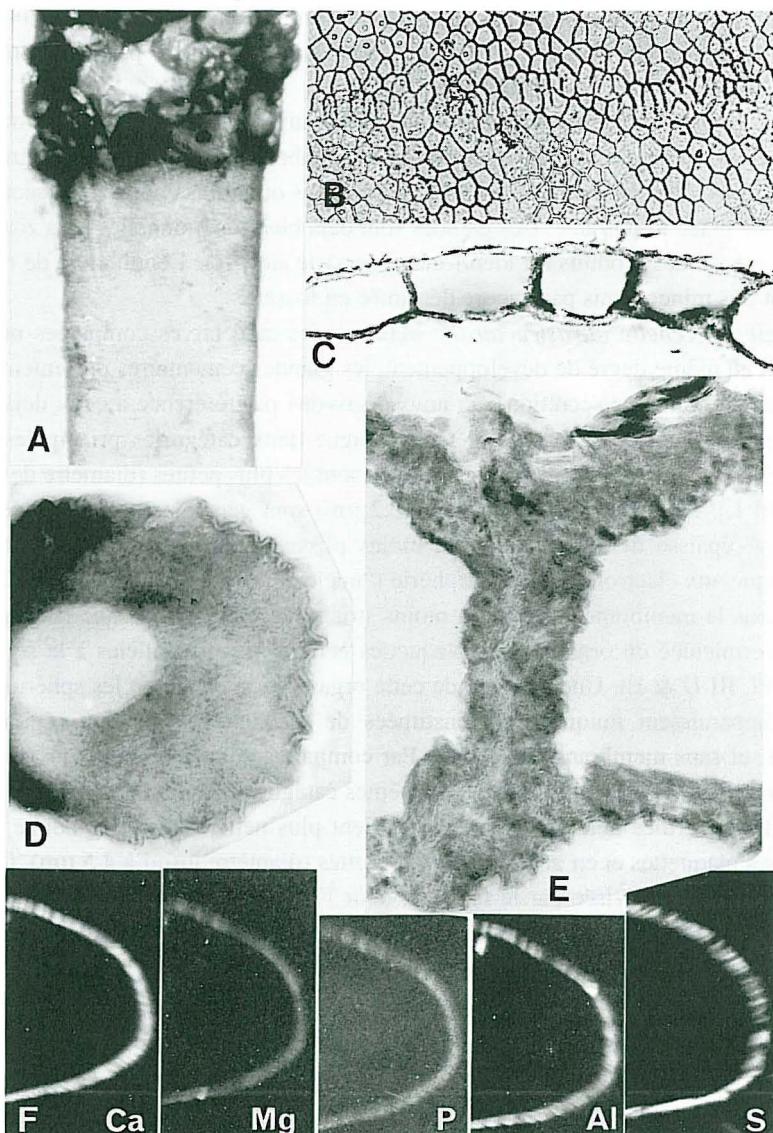


PLANCHE II

Le tube. A : Détail d'un tube récolté après la métamorphose, montrant la frontière entre le tube membraneux du stade aulophore et le tube arénacé définitif ($\times 100$). B : Montage direct d'un fragment de tube membraneux à structure bulleuse. C : Coupe transversale à l'échelle ultrastructurale de la paroi du tube membraneux inclus en résine ($\times 5600$). E : Détail de l'image précédente ; zone d'adhésion entre deux éléments creux de la paroi. La surface externe (vers le haut) présente quelques plaquettes pélitiques, le pourtour des éléments creux est souligné d'une ligne claire ($\times 80\ 000$). D : Sphérule "hétérogène à membrane" avec partie centrale claire et membrane ondulée périphérique, fixation au glutaraldéhyde seul ($\times 38\ 000$). F : Images d'émission ionique d'un secteur d'une coupe transversale semi-fine du tube membraneux, correspondant aux éléments, intensités et temps de pose suivants ; Ca (40^+), $1.10^{-14}A$, 10 s ; Mg (24^+), $1.10^{-16}A$, 100 s ; P (31^+), $1.10^{-17}A$, 20 min ; Al (27^+), $3.10^{-16}A$, 100 s ; S (32^-), $3.10^{-16}A$, 15 min.

ont une hauteur moyenne de 1,6 μm et un diamètre moyen de 4,5 μm . L'épaisseur de leurs parois va de 0,1 à 0,25 μm (en moyenne 0,2 μm). Le matériau constitutif en est relativement opaque aux électrons, homogène ou un peu vermiculé, comme la partie corticale de certaines sphérules hétérogènes. Il est doublé à l'extérieur par une fine "membrane" homogène et peu opaque, épaisse au maximum de 10 nm. Dans la zone d'adhérence entre deux logettes, on reconnaît nettement par endroits la juxtaposition des deux membranes voisines (Pl. II E). Sur la surface tournée vers l'extérieur du tube adhèrent fréquemment des particules feuillettées évoquant des pélites et qui peuvent être d'origine exogène. Quant aux logettes, leur comparaison avec les sécrétions sphérolaires s'impose : nous l'avions proposée chez l'adulte à propos du ciment bulleux, elle est confirmée ici par la présence des "membranes". Il faut admettre que les sécrétions sphérolaires se dilatent et s'aplatissent après extrusion ; leur partie centrale augmentant de volume, leur partie corticale et sa membrane périphérique s'amincissent. En considérant le volume approximatif des logettes aplatis ramenées à une forme sphérique, cette dernière aurait un diamètre d'environ 3,4 μm , soit près du double des sphérules hétérogènes à membrane, dont le volume est multiplié par 5.

On reconnaît donc à la fois un suivi et une évolution entre la sécrétion du tube larvaire et celle du ciment interstitiel du tube adulte. Ce sont les mêmes massifs glandulaires qui élaborent d'abord un seul type de sphérules hétérogènes, ensuite plusieurs types de sphérules hétérogènes et homogènes ; structuralement on passe d'une construction unistratifiée à l'agrégation des éléments du ciment interstitiel. La métamorphose, marquée par la frontière entre le tube larvaire et le tube arénacé définitif, implique donc de façon décisive une diversification des sécrétions et des catégories cellulaires des glandes cémentaires, et sans doute une évolution comportementale en liaison avec la morphogenèse de l'organe constructeur. Il nous manque encore d'avoir pu examiner des stades aulophores planctoniques pour confirmer cette hypothèse, mais en tout cas toutes les larves à peine au-delà de la métamorphose, que nous avons examinées, possèdent déjà une diversité de sécrétions qui annonce celle de l'adulte. L'une d'elles a même fourni une image ultrastructurale présentant l'agrégation pluristratifiée de sphérules hétérogènes, sans composante homogène, à proximité de l'épiderme et de la zone évacuatrice (Pl. III B). On suppose que des cycles sécrétoriaires déterminent l'évacuation de paquets de sphérules ; ceci vaut pour la larve comme pour l'adulte et leur juxtaposition successive déterminerait dans cette hypothèse les éléments plans rhomboïdaux du tube larvaire signalés par divers auteurs (Watson, 1928 ; Thorson, 1946).

Il faut souligner les remarquables propriétés mécaniques de la paroi de ce tube larvaire. Elle est beaucoup moins épaisse (1,6 μm) que celle du tube de la larve aulophore de *Lanice* (20 μm) ou *Loimia* (1,2 μm) décrite par Wilson (1928). D'autre part, les éléments creux et aplatis qui la constituent possèdent une résistance considérable et une adhéritivité immédiate dans leurs zones de soudure. La mise en évidence de leur composante minérale par la microanalyse nous permet d'évaluer le suivi et le progrès qualitatif de ce matériau avant et après la métamorphose.

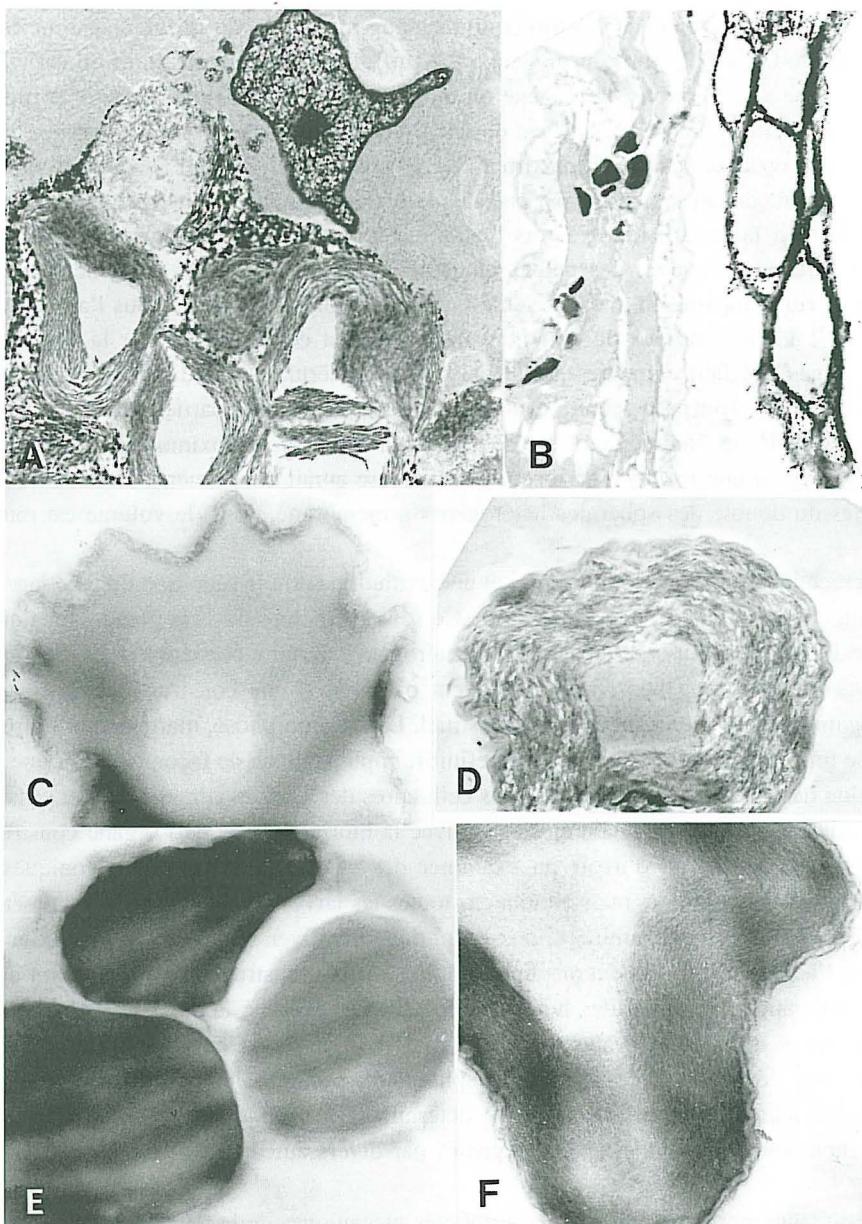


PLANCHE III

Ultrastructure. A : Détail ultrastructural d'une cellule de la glande cémentaire juste après la métamorphose ; coexistence de sphérolites feuilletés sans membrane et de sphérolites hétérogènes à membrane déformée, dans leur apparence après post-osmication (x 12 500). B : Ultrastructure de la zone évacuatrice d'un individu du même âge que A, post-osmié ; à l'extérieur un paquet de sphérolites hétérogènes dilatées, non unistratifiées (x 5600). C, D, E, F : Aspects des sécrétions sphérolaires après fixation au glutaraldéhyde seul (C "hétérogène à membrane", D et F idem à cortex plus ou moins feuilletté, E homogène) ; C, D, E x 33 000, F x 42 000.

Microanalyse

Microanalyse par émission ionique secondaire. Les renseignements obtenus sont fournis par les spectres d'émission d'ions secondaires, positifs et négatifs, et par les images obtenues élément par élément.

En ce qui concerne les glandes sécrétrices du tube, les spectres d'émission d'ions secondaires positifs font apparaître les pics du calcium (40^+), du magnésium (24^+), de l'aluminium (27^+) et du phosphore (31^+) dont l'importance apparaît par ailleurs dans quelques combinaisons remarquables P_2O_2 (63^+), P_2O_3 (79^+), PO Ca (87^+), $\text{P}_2\text{O}_2 \text{Ca}$ (103^+) et $\text{P}_2\text{O}_3 \text{Ca}$ (119^+). On note des traces de baryum (138^+), tandis que la présence du manganèse (55^+), du fer (56^+) et du cuivre (63^+ et 65^+) reste hypothétique. Dans les spectres d'émission d'ions secondaires négatifs, on retrouve les composés du phosphore, P, P_2O_5 , P_2O_3 (31^- , 47^- , 63^- , 79^-) et on note la présence d'oxygène (16^-) et de soufre (32^-). La réponse appréciable du chlore est en partie imputable à la résine.

L'analyse du tube lui-même fait ressortir au niveau des spectres Ca^+ , Mg^+ , P^+ et Al^+ en éléments positifs et S^- et Cl^- en éléments négatifs. La série de pics associant P, O et Ca est discrète mais notable (PO , P Ca , PO Ca , P_2O_5 , Ca). Fer et cuivre sont là encore d'un diagnostic incertain.

Les images obtenues et correspondant aux plus fortes intensités d'émission sont, pour les deux matériaux et en ordre décroissant, celles du calcium (jusqu'à 3.10^{-14}A), du magnésium (jusqu'à 4.10^{-16}A), du soufre (3.10^{-16}A), de l'aluminium (1.10^{-16}A) et du phosphore (5.10^{-17}A). On sait que ce dernier élément, en raison de sa dispersion dans de nombreuses combinaisons moléculaires, se prête mal à l'obtention d'images ioniques.

Les localisations obtenues pour le calcium, le magnésium, le phosphore (et ses composés comme $\text{P}_2\text{O}_5 \text{Ca}$) sont superposables en ce qui concerne les glandes. Il en va de même pour le soufre et l'aluminium sans qu'on puisse assurer que les mêmes grains sont concernés. Pour le tube, la définition des images permet juste d'assurer que les cinq principaux éléments coexistent dans sa paroi (Pl. IC & II F).

Microanalyse X en dispersion de longueur d'onde. On l'a pratiquée uniquement sur coupes du tube et elle a eu pour intérêt principal de lever certaines incertitudes de diagnostic du microanalyseur. Les réponses obtenues font apparaître, en ordre d'intensité décroissante, le calcium, le phosphore, le soufre, le magnésium et l'aluminium. Les valeurs concernant les quatre derniers éléments doivent être relativisées par rapport à celles précédemment rapportées au sujet de l'animal adulte et fournies par le cristal KAP d'un autre instrument (Créteil, d'un rendement quatre fois meilleur, qui désignerait le phosphore comme l'élément le plus important). De la même façon l'épaisseur des coupes, ici semi-fines, intervient dans les résultats : les chiffres concernant les éléments retenus sont minorés par rapport à ceux obtenus chez l'adulte sur coupes à la paraffine, analysées avec l'appareil de Créteil. En tenant compte des corrections nécessaires, on peut apprécier une bonne corrélation entre les valeurs concernant le ciment de l'adulte et le tube de la larve. Seul le magnésium est relativement moins important, ce qui peut être mis en rapport avec son élimination plus rapide et efficace par fixation au glutaraldéhyde et inclusion à la résine (Tabl. I).

TABLEAU I

(Microanalyse X en dispersion de longueur d'onde)

c/s	Ca*	P**	Mg**	S**	Al**
Tube larve	61,0 ± 16,2 ↗ 90 (n = 5)	38,1 ± 9,2 ↗ 52 (n = 5)	3,1 ± 0,9 ↗ 4 (n = 9) BF = 1,5	14,0 ± 0,9 ↗ 15 (n = 7) BF = 2,6	2,6 ± 0,6 ↗ 4 (n = 7) BF = 1,3
ciment tube adulte 1977	360	1100	160	40	€

* cristal PET ** cristal KAP (valeurs minorées d'un facteur 4 par rapport à 1977)

↗ valeurs maximales. n : nombre de points analysés. BF : bruit de fond

En tout cas le manganèse et le cuivre sont absents du tube, de même que le fer.

Microanalyse X en sélection d'énergie. L'analyse sur coupes ultrafines de surfaces limitées des sécrétions sphéruleuses ou de la paroi du tube a permis de comparer les éléments présents dans ce dernier avec ceux des différents types de sécrétions et des parties interne et externe des sphéruleuses hétérogènes, et d'avoir une approximation de leur concentration relative (valeurs exprimées en nombre de coups).

Dans tous les cas, les mêmes éléments sont identifiés : par ordre d'importance le phosphore (jusqu'à 480 coups), l'oxygène, le calcium (jusqu'à 160 coups), le soufre, le magnésium, l'aluminium. Le pic du soufre peut être aussi important que celui du calcium, celui du magnésium n'est appréciable que dans la moitié des cas (Fig. 1C), celui de l'aluminium dans quelques cas seulement. Ni le fer ni le manganèse ne se manifestent.

Le cuivre n'a pu être mis en évidence à cause de sa présence dans la grille support.

Les renseignements apportés par cette méthode concernent la confirmation des éléments déjà reconnus et de leur identité dans les sécrétions et dans le tube, la mise en doute de la présence du fer et du manganèse mais surtout l'absence de différence de composition sinon quantitative, entre les différentes catégories de sécrétion.

Les sphéruleuses homogènes comportent les mêmes éléments minéraux que les hétérogènes, calcium et magnésium associés au phosphore, mais en moindre proportion. Elles sont par contre plus riches en soufre (Fig. 1A). Une sphérule feuilletée sans membrane a pu être analysée, le matériau constitutif est moins dense que dans les autres types de sécrétions mais la composition n'en est pas différente. De même l'analyse ponctuelle d'un secteur de la "membrane" des sphéruleuses hétérogènes ne traduit aucun enrichissement significatif. Entre la partie corticale et la partie centrale des sphéruleuses hétérogènes, la chute d'intensité de la réponse du phosphore peut être évaluée plus ou moins précisément selon que l'on prend en compte la hauteur des pics ou leur surface calculée par intégration dans tous les cas elle est de plus de la moitié et le calcium décroît dans la même proportion

$\frac{P_{\text{cortical}}}{P_{\text{central}}} = \frac{\text{Ca cortical}}{\text{Ca central}} = 2,5$. Le calcul intégrant la surface des pics P et Ca dans les deux régions fournit le même rapport $\frac{\text{Ca}}{\text{P}} = 32,46\%$ le même composé est donc présent, mais plus ou moins abondant. A partir de ce système

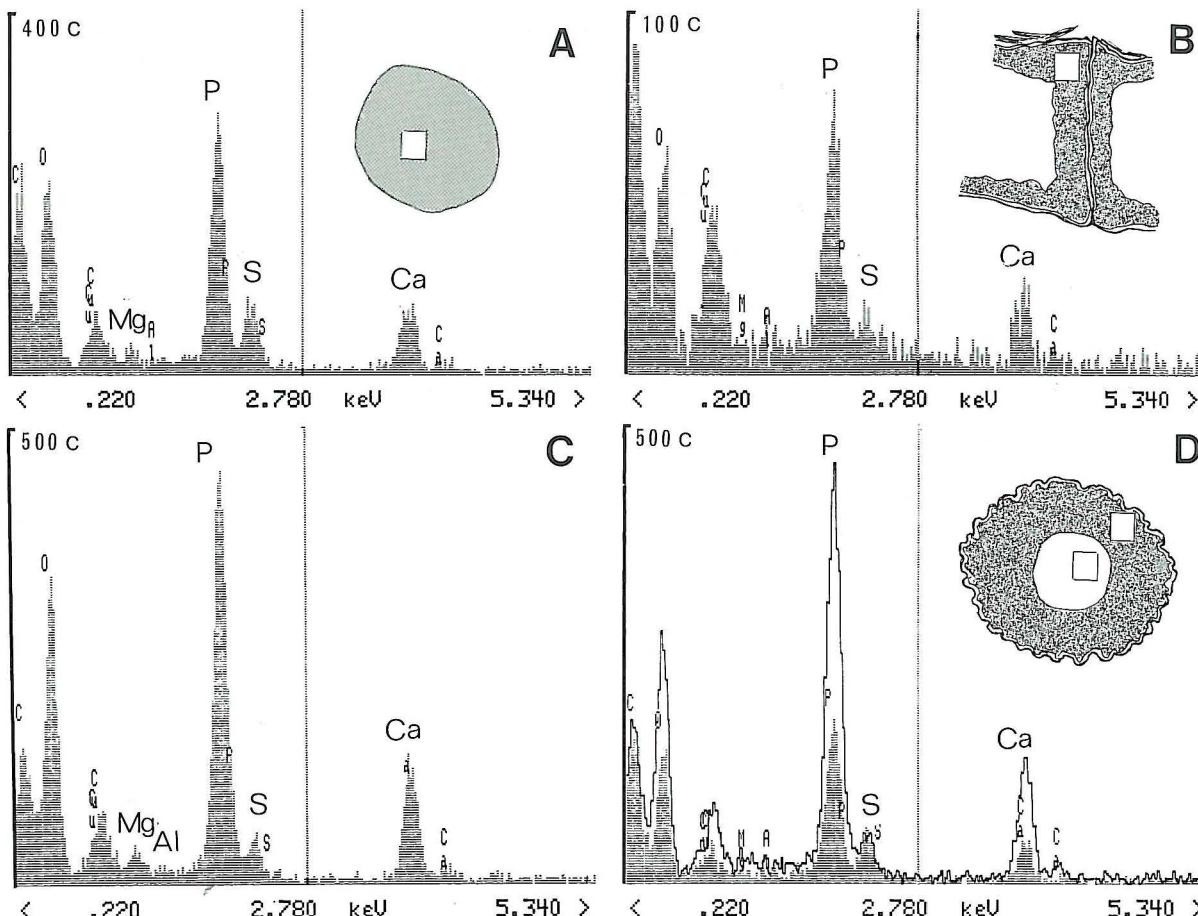


Fig. 1. : Microanalyse X en sélection d'énergie sur coupes ultrafinées. A: Sphérule homogène. B: Paroi du tube membraneux. C : Sphérule hétérogène, partie périphérique très minéralisée. D : Sphérule hétérogène, superposition des spectres concernant la partie centrale (en grisé) et la partie périphérique (en blanc), noter la réponse comparable du soufre. Les carrés placés sur les schémas délimitent les surfaces analysées par balayage (250 x 250 nm).

d'évaluation on observe que le soufre ne subit pas les mêmes fluctuations ; d'ailleurs en superposant les histogrammes obtenus pour les deux zones d'une même sphérule dans les mêmes conditions d'analyse (Fig. 1D), le soufre apparaît aussi abondant au centre qu'à la périphérie, et même un peu plus. Par contre les différences de réponse de l'oxygène dans les deux cas indiquent que ce dernier peut intervenir dans des combinaisons avec le soufre comme avec le phosphore (Tabl. II) .

TABLEAU II

(Microanalyse X en sélection d'énergie)

Sphérules hétérogènes : Périphérie Centre

	% total	%/P	% total	%/P
O	19,96	34,16	26,37	52,95
P	58,45	100	49,80	100
S	2,61	4,46	7,67	15,40
Ca	18,98	32,47	16,17	32,46

Valeurs obtenues après intégration de la surface des pics O, P, S, Ca.

Pour confirmer l'importance du soufre dans la composition des sphérules homogènes, on relève que la hauteur du pic soufre y est équivalente à celle du calcium, alors qu'elle en représente le tiers à la périphérie des sphérules hétérogènes .

L'analyse du tube fournit des réponses moins intenses que celles des grains de sécrétion mais on retrouve les mêmes pics principaux (Tabl. III) et le rapport de leurs hauteurs est sensiblement identique (Fig. 1B)

TABLEAU III

(Microanalyse X en sélection d'énergie)

Périphérie sphérule hétérogène

Paroi tube

P	$317,8 \pm 72,6$ (n = 5)	$Ca/P = 31,4\%$	$38,3 \pm 13,0$ (n = 6)	$Ca/P = 33,4\%$
Ca	$99,8 \pm 20,4$ (n = 5)		$12,8 \pm 6,8$ (n = 6)	

valeurs en nombre de coups correspondant à la hauteur des pics.
n : nombre de points analysés.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Un premier ensemble de conclusions reprend, en les confirmant par une étude ultrastructurale, une partie des résultats de notre précédent travail (Vovelle, 1973). La même formation glandulaire intervient chez l'adulte et chez la larve planctonique issue de la métatrophophore et constructrice du tube membraneux. Développée à l'origine en deux lobes importants, cette glande va subir une allométrie minorante en même temps que son dispositif évacuateur se compliquera pour former la fossette de l'organe constructeur. Ce processus n'intervient que lorsque la larve aulophore se stabilise sur le fond, et cette contribution à la métamorphose comporte aussi une diversification des sécrétions et des catégories cellulaires de la glande. A ce moment intervient l'élaboration de sphérules homogènes plus organiques et plus riches en soufre, plus plastiques que les sphérules hétérogènes dont elles vont former la matière interstitielle. En même temps les sphérules hétérogènes accusent leur divergence en deux catégories, les plus grosses augmentant en taille. Malgré tout, la composante fondamentale reste toujours la même, ce sont les "sphérules hétérogènes à membrane" qui se dilatent dans la paroi du tube ou la masse du ciment. Simplement ces sphérules sont seules présentes dans la phase aulophore durant laquelle elles s'organisent en couche unistratifiée : le passage de ce type d'association à l'agglutination massive du ciment ne peut qu'être brusque, il est matérialisé par la frontière entre le tube larvaire et le tube définitif (Pl. IIA).

Les résultats obtenus dans la présente étude font aussi apparaître que la composante organominérale du tube larvaire et du ciment de l'adulte est fondamentalement identique : c'est toujours un composé organique phosphaté, riche en calcium et à un moindre degré en magnésium. On évoque à son propos l'acide onuphique, identifié dans le tube du Polychète *Eunicida Hyalinoecia tubicola* (cf. *inter alia* Pautard & Zola, 1968). Nous en avons rapproché, dans d'autres études, les matériaux constitutifs ou cémentaires des tubes d'*Alvinella pompejana* et *Sabellaria alveolata*, (Vovelle & Gaill, 1986, Gruet, *et al.*, 1987), de même que nous l'avions mentionné au sujet du ciment du tube chez *Pectinaria* et *Petta pusilla* adultes (Vovelle, 1979). La comparaison de nos résultats actuels avec les premiers obtenus chez *P. koreni* adulte (Truchet & Vovelle, 1977) permet d'apprécier la présence précoce des principaux éléments chimiques et leur association avec des éléments mineurs comme l'aluminium. Nous avions reconnu chez l'adulte la présence du fer, versatile d'un individu à l'autre ; nous ne l'avons pas retrouvé dans nos échantillons larvaires de 1983, alors qu'un individu de 1971 en contenait juste après la métamorphose, cette contradiction peut s'expliquer par les différences individuelles déjà mentionnées.

Un deuxième ensemble de conclusions concerne l'apport spécifique et les limites de la microanalyse pour notre étude. Par rapport aux résultats présentés antérieurement à propos du ciment du tube de l'adulte (Truchet & Vovelle, 1977), le recours au microscope électronique et à la microanalyse X en sélection d'énergie à l'échelle ultrastructurale était nécessaire pour l'examen d'une structure aussi ténue que le fourreau de la larve aulophore. S'agissant d'une paroi de moins de 2 µm d'épaisseur dont les composantes creuses sont délimitées par une enveloppe six fois plus mince, les comparaisons quantitatives sont aléa-

toires. Qualitativement, répétons-le, la microanalyse X en dispersion de longueur d'onde détecte chez l'adulte les mêmes éléments que chez la larve : phosphore, calcium, magnésium, soufre, plus des traces d'aluminium. Quantitativement, si nous corrigéons le rendement du cristal KAP utilisé pour le présent travail par rapport à celui de 1977 (valeurs minorées d'un facteur 4 pour les éléments P, S et Mg) l'ordre d'importance des éléments reconnus est conservé au moins pour P et Ca. Nous pouvons faire état d'un résultat non publié communiqué par Gruet (lettre personnelle de 1986) et qui concerne l'analyse du ciment de *Pectinaria* adulte par spectrométrie X en sélection d'énergie sur lames minces de tube obtenues par les procédés des minéralogistes : les trois éléments identifiés par cet auteur (magnésium, phosphore et calcium, plus des traces de fer qu'il considère comme probablement exogènes) peuvent être exprimés en pourcentages relatifs d'atomes ou de poids moléculaires, soit pour Mg, 18,85 ou 13,88 %, pour P, 54,00 ou 51,34 %, pour Ca, 24,16 ou 29,05 %, pour Fe, 2,97 ou 5,11 %. Comme les conditions de préparation des échantillons ne sont pas les mêmes que pour notre étude du tube larvaire par spectrométrie X en sélection d'énergie, elles relativisent toute comparaison quantitative, et on constate que l'intervention de la fixation et de l'inclusion en résine est suffisante pour expliquer la minoration chez la larve de la réponse du magnésium, le cation le plus labile. Il est certain que les cellules glandulaires extraient plus activement et sélectivement le calcium que le magnésium à partir du liquide intérieur, aussi bien chez la larve que chez l'adulte. Nous faisons référence ici à des résultats concernant les glandes cémentaires de *Pectinaria* adulte, obtenus par spectrophotométrie d'absorption atomique dans une collaboration avec Stolkowski encore non publiée. Le magnésium apparaît par rapport au calcium comme l'élément prépondérant dans les tissus mous, mais à un moindre degré dans la glande cémenteuse que dans le muscle (en mM/mg de protéine ; Glande : Ca 0,264.10⁻³, Mg 0,355.10⁻³, Ca/Mg = 0,75 ; Muscle : Ca 0,125.10⁻³, Mg 0,305.10⁻³, Ca/Mg = 0,40). Le phosphore est en tout cas l'élément prépondérant de la combinaison et sa relative indépendance aux conditions de préparation (cf. l'analyse X en sélection d'énergie du tube larvaire) est un argument en faveur de sa forme organique.

Le troisième ensemble de conclusions peut être tiré de la comparaison du tube larvaire de *Pectinaria* avec le tube de l'adulte, ainsi qu'avec des formations analogues présentes chez d'autres Polychètes. Un point important concerne la continuité structurale et biochimique du matériau sécrété par le ver dès l'origine à partir du massif glandulaire élaborateur de sphérule dont la composante organophosphorée magnésocalcique est supposée proche de l'acide onuphique. Nous avons considéré que la présence de cette substance est un élément de rapprochement avec d'autres tubicoles aussi divers que *Hyalinoecia* (Eunicida Onuphidae), *Sabellaria* (Sabellariidae), et *Petta* (Amphictenidae). Par contre le rapprochement n'est pas évident avec le tube de la larve aulophore des Terebellidae, formation gélatineuse largement polysaccharidique. Les glandes sécrétrices de ce tube ne sont pas, rappelons-le, homologues dans leur situation à celles des Pectinaires, et elles ne préfigurent pas l'ensemble complexe des glandes surtout ventrales impliquées dans la formation du tube chez l'adulte (cf. Bielakoff, *et al.*, 1975). Par opposition avec le tube épais des Terebellidae, le fourreau de la larve aulophore de *Pectinaria* présente une remarquable minceur qui doit

correspondre à des propriétés de résistance mécanique originales. L'adhésivité immédiate des sphérolites dilatées qui s'accollent pour former le fourreau bulleux, et le durcissement simultané des parois des alvéoles, sous-entendent un biomatériau organominéral remarquable. La flottabilité conservée par la larve aulophore des Amphictenidae ne saurait être du même type que celle des Terebellidae, si l'on considère la ténuité des parois du tube des premières, dont les alvéoles ne sont évidemment pas remplies d'air. En somme, l'examen détaillé du tube de la larve aulophore de *Pectinaria* et de sa formation ne fournit pas d'argument pour conforter le rapprochement phylogénétique entre Terebellidae et Amphictenidae.

REMERCIEMENTS

Toute notre gratitude va, pour l'accueil et la récolte des animaux, au personnel et aux marins de Laboratoire de Biologie marine d'Helsingør, Danemark, et pour la microanalyse X en sélection d'énergie à Mme P. Beaunier du Service de Microscopie électronique du GRMP de l'Université P. et M. Curie. Nous remercions également le Professeur J. Stolkowski (Laboratoire de Physiologie chimique, Université P. et M. Curie) et Y. Gruet (Laboratoire de Biologie marine, Université de Nantes) pour les résultats non publiés concernant l'adulte qu'ils nous ont autorisés à utiliser. L'analyse ionique et la microanalyse X en dispersion de longueur d'onde ont été effectuées sur des appareils du Laboratoire d'Histophysiologie fondamentale et appliquée (Professeur R. Martoja) de l'Université P. et M. Curie.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- BHAUD, M. & C. CAZAUX, 1987. Description and identification of Polychaete larvae : their implications in current biological problems. *Oceanis*, 13 : 576-753.
- BIELAKOFF, J., D. DAMAS & J. VOVELLE, 1975. Étude histologique et histo chimique des formations glandulaires impliquées dans l'élaboration du tube de *Lanice conchilega* (Annelide Polychète). *Archs Zool. exp. gén.*, 116 : 449-520.
- CAZAUX, C., 1981. Évolution et adaptation larvaires chez les Polychètes. *Oceanis*, 7 : 43-78 .
- ELKAIM, B. & J.P. IRLINGER, 1987. Contribution à l'étude de la dynamique des populations de *Pectinaria koreni* Malmgren (Polychète) en Baie de Seine Orientale. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 107 : 171-197.
- FAUVEL, P., 1903. Le tube des Pectinaires. *Memorie Accad. pont. Nuovi Lincei*, 21 : 1-28.
- GRUET, Y., J. VOVELLE & M. GRASSET, 1987. Composante biominérale du ciment du tube chez *Sabellaria alveolata* (L.). Annelide Polychète. *Can. J. Zoo/.*, 65 : 837-842.
- KESSLER, M., 1963. Die Entwicklung von *Lanice conchilega* (Pallas) mit besonderer Berücksichtigung der Lebenweise. *Helgoländer. wiss. Meeresunters.*, 3 : 425-476.
- MILEIKOVSKY, S.A., 1977. On the systematic interrelationships within the Polychaeta and Annelida. An attempt to create an integrated system based on their larval morphology. In "Essays on Polychaetous Annelids in memory of Olga HARTMAN". *Spec. Publ. Allan Hancock Fdn, Univ. South California Press*, 503-524.
- OCKELMANN, K.W., 1964. An improved detritus-sledge for collecting meiobenthos. *Ophelia*, 1 : 217- 222 .
- PAUTARD, F.G.E. & H. ZOLA, 1968. The location of onuphic acid in *Hyalinoecia tubicola*. *J. Histochem. Cytochem..* 15 : 737-744.

- THORSON, G., 1946. Reproduction and larval development of Danish marine bottom invertebrates, with special reference to the planktonic larvae in the Sound (Oresund). *Meddr. Kommun Dam, Fisk. og Havunders.*, Plankton, 4 : 1-523.
- TIBERI, J. & J. VOVELLE, 1975. Données histochimiques sur la nature et la formation du tube larvaire chez *Lanice conchilega* Pallas, Polychète Terebellidae. *Arch. Zool. exp. gén.*, 116 : 303-318.
- TRUCHET, M. & J. VOVELLE, 1977. Étude de la glande cémentaire d'un Polychète *Tubicola*, *Pectinaria* (= *Lagis*) *koreni*, à l'aide de la microsonde électronique, du microanalyseur ionique et du microscope électronique à balayage. *Calcif. Tiss. Res.*, 24 : 231-238.
- VOVELLE, J., 1973. Évolution de la taille des grains du tube arénacé en fonction de la croissance chez *Pectinaria* (*Lagis*) *koreni* Malmgren (Polychète Sédentaire). *Ophelia*, 10 : 169-184.
- VOVELLE, J., 1979. Les glandes cémentaires de *Petta pusilla* Malmgren, Polychète tubicole Amphictenidae, et leur sécrétion organo-minérale. *Arch. Zool. exp. gén.*, 120 : 219-246.
- VOVELLE, J. & F. GAILL, 1986. Données morphologiques, histochimiques et microanalytiques sur l'élaboration du tube organominéral d'*Alvinella pompejana*, Polychète des sources hydrothermales, et leurs implications phylogénétiques. *Zoologica Scr.* 15 : 33-43.
- VOVELLE, J. & M. GRASSET, 1976. Les Pectinaires et leur sable ; les Pectinaires et leur ciment. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 101 : 1023.
- VOVELLE, J., M. GRASSET & M. TRUCHET, 1989. Biominéralisation des mâchoires chez *Hyalinoecia tubicola* (Müller) (Polychète, Eunicida). *Ann. Inst. océanogr.*, 65 : 15-36.
- WATSON, A. T., 1928. Habits and life-history of *Pectinaria*. *Proc. Trans. Lpool biol. Soc.*, 42 : 25-60.
- WILSON, D. P., 1928. The post-larval development of *Loimia medusa* Sav. *J. Biol. Ass. U.K.*, 1 : 129-149.