

DONNÉES HISTOCHIMIQUES ET HISTOLOGIQUES SUR L'ORGANE LUMINEUX DES ÉLYTRES D'ANNÉLIDES POLYNOINAE

par

Jean-Marie Bassot

Institut Océanographique - Paris.

Résumé

La zone lumineuse des élytres de Polynoinae est caractérisée par une différenciation des cellules épithéliales de la face inférieure.

Ces cellules ou photocytes, au même titre que les cellules banales, élaborent la cuticule de l'élytre et contiennent de longs faisceaux de fibres. Mais seuls les photocytes possèdent une zone périnucléaire riche en ARN, et ils accumulent de nombreux grains acidophiles ayant les caractères d'un mucopolysaccharide neutre ; leur richesse en cystéine est exceptionnelle.

La signification de ces caractères histochimiques est discutée en fonction des données ultrastructurales : bien que les grains représentent des entités complexes comprenant notamment une forme spécialisée de reticulum endoplasmique, il semble que les produits révélés soient effectivement des produits de sécrétion.

INTRODUCTION

Les Annélides Polychètes appartenant à la famille des *Aphroditiens* possèdent une double rangée d'expansions tégumentaires métamériques, les *élytres*, qui recouvrent leur face dorsale à la manière des tuiles d'une toiture. Chaque élytre a l'aspect d'un bouclier légèrement concave, ovoïde, très plat et souple ; elle s'insère par une petite surface circulaire de sa face inférieure sur un pédoncule ou « élytrophore » qui la relie au corps de l'animal ; sa face supérieure est généralement ornée de denticules et de papilles et bordée par une zone pigmentée. Chez les espèces les plus mobiles, les élytres s'autotomisent aisément au niveau de leur attache sur l'élytrophore.

De plus, chez de nombreuses espèces appartenant à la sous-famille des *Polynoinae*, une excitation mécanique, chimique ou électrique provoque une réponse lumineuse qui se propage d'avant en

arrière comme une onde et illumine successivement une surface précisément délimitée de chaque élytre. La forme de cette aire lumineuse varie suivant les espèces ; elle est centrée sur le disque d'insertion sur l'élytrophore qui, lui, reste obscur.

La localisation histologique de ce phénomène spectaculaire de bioluminescence a suscité de nombreux travaux. Tour à tour, presque toutes les structures des élytres en ont été rendues responsables : les « muscles » (Quatrefages, 1843), les nerfs qui, provenant de l'élytrophore, se ramifient dans toute l'élytre (Panceri, 1874, 1878), les papilles qui ornent la face supérieure des élytres (Kutschera, 1909 ; Dahlgren, 1916) ; enfin Jourdan (1885), puis Bonhomme (1942, 1954) ont reconnu, dans la couche de cellules épidermiques qui constituent la face inférieure des élytres, une zone de cellules beaucoup plus hautes que les cellules banales et caractérisées surtout par leur charge en gros grains réfringents. Ces cellules ne sont présentes que dans les espèces lumineuses ; leur répartition dans les élytres correspond bien aux limites de l'aire d'illumination. Il est donc fondé de les considérer comme des cellules lumineuses ou *photocytes* ; leur produit de sécrétion, figuré sous forme de grains, représenterait le support de la réaction lumineuse qui reste intracellulaire. Le travail de Bonhomme n'apporte que peu de précisions sur les caractères histo-chimiques et les affinités tinctoriales des photocytes : leurs grains sont acidophiles ; ils ne contiennent pas de phosphore ; ils sont riches en protides, comme l'atteste une réaction de Millon positive ; ils ne sont pas colorables par le noir Soudan.

Nicol (1953, 1954) a récemment repris l'étude des élytres de *Polynoïnae*. Il retrouve les photocytes, caractérisés par la présence de grains acidophiles à la face inférieure des élytres d'un très grand nombre d'espèces de ces Annélides ; il précise les conditions physiologiques de l'émission lumineuse et les caractères physiques de la lumière. Sur le plan histologique, ses observations portent surtout sur l'innervation des élytres. Celles qui concernent les photocytes confirment seulement la description de Bonhomme.

L'examen au microscope électronique des photocytes chez *Lagisca*, *Acholoe* (Bassot, 1964, 1965) et *Harmothoe* (Afzelius, 1964) a récemment révélé que leurs « grains de sécrétion » possèdent en fait une ultrastructure très complexe. Chaque grain est formé de microtubules ondulés, disposés d'une manière répétitive complexe qui évoque une organisation cristalline.

La paroi des microtubules est continue à celle du reticulum endoplasmique lisse ou granulaire, ou à l'enveloppe nucléaire externe. Un organite cytoplasmique, à savoir une forme très spécialisée de reticulum endoplasmique, fait donc partie intégrante des grains et seuls, les produits situés à l'intérieur des microtubules ou entre ceux-ci peuvent être interprétés comme des produits de sécrétion.

Il convenait donc de reprendre l'étude histologique des photocytes et, en particulier, de préciser les caractères histo-chimiques des grains photogènes. Les résultats de cette étude devront être discutés pour savoir quelle interprétation — organite ou produit de sécrétion — doit être donnée aux grains à l'échelle d'observation du microscope photonique.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Deux espèces d'Aphroditien *Polynoinae* ont surtout servi à cette étude : *Lagisca extenuata* Grube et *Acholoe astericola* Delle Ch.

Les exemplaires de *Lagisca* ont été recueillis sur les côtes de la Manche, à marée basse, sous les grosses pierres où ils sont assez abondants (région de Port-en-Bessin et de Roscoff).

Les *Acholoe* vivent dans les sillons interambulacraires de grandes étoiles de mer méditerranéennes (*Astropecten*, *Luidia*). Ces étoiles ont été pêchées par chalutage dans la région de Banyuls-sur-Mer et méthodiquement examinées pour prélever leurs commensales.

Dans tous les cas, les fixations ont été effectuées immédiatement après la capture des animaux. Lors de l'emploi des fixateurs connus pour être peu pénétrants, des élytres, individuellement détachées du corps de l'animal, étaient incisées de trois ou quatre traits de lame de rasoir, sous une goutte de fixateur, afin d'en multiplier les voies de pénétration.

Les liquides fixateurs de Bouin, de Halmi, de Regaud, de Maximow, de Carnoy, de Flemming et l'alcool-chloroforme ont été utilisés. Certaines des pièces fixées par les liquides contenant du bichromate de potassium ont été postchromées plusieurs jours à la température ordinaire.

Après déshydratation par les alcools éthylique et butylique normal, les pièces ont été incluses à la paraffine et débitées transversalement en coupes sériées de 3 à 7 μ d'épaisseur. La méthode de Mann au bleu de méthyle-éosine, de Mann-Dominici, les colorations à l'azan de Heidenhain, au trichrome en un temps de Gabe et Martoja (1957) et la triple coloration de Millot ont permis de préciser les caractères histologiques et les affinités tinctoriales générales des élytres.

La mise en évidence du chondriome a été tentée sur des coupes fines provenant de matériel postchromé, colorées par la fuchsine d'Altmann et l'hématoxyline au fer de Regaud. La recherche de l'acide désoxyribonucléique a été effectuée par la méthode de Feulgen et Rossenbeck sur coupes provenant de matériel fixé au liquide de Regaud ou de Flemming. L'acide ribonucléique a été mis en évidence par la galloxyanine et surtout la coloration au vert de méthyle-pyronine sur des coupes provenant de matériel fixé au liquide de Carnoy. Certaines coupes ont été traitées, pendant des temps variant de 1 h à 24 h, dans une solution à 0,001 p. 100 de ribonucléase.

Les détections histochimiques de glucides et de protides dont la liste est donnée dans les tableaux 2 et 3 ont été effectuées selon les techniques regroupées dans les ouvrages de Gomori (1952), de Pearse (1960) et de Lison (1960). L'épreuve de l'acétylation réversible a été pratiquée en suivant la méthode préconisée par Gabe et Martoja (1956). La présence de glycogène a été contrôlée en traitant des coupes par de la maltase ou de l'amylase.

La recherche des activités glycérophosphatasiques acides ou alcalines a été effectuée sur des coupes d'élytres fixées à l'alcool-chloroforme ou à l'acétone. Des coupes analogues ont servi à la détection du fer (réaction de Tirman et Schmeltzer) et du calcium (réaction de Stoelzner); des spodogrammes ont été confectionnés au four de Policard.

Les lipides ont été recherchés sur des coupes à congélation et surtout des dilacérations d'élytres fixées par le formol-calcium de Baker et traitées par le noir Soudan B à 60° C.

Enfin, des coupes dites « semi-fines » (0,5 à 1 μ) de pièces incluses à l'épon selon Luft (1961) ont été confectionnées sur un ultratome LKB équipé de couteaux de verre. Ces élytres avaient été fixées soit par l'acide osmique, soit par l'acroléine-formol puis par l'acide osmique dans un tampon phosphate pH 7,2. Les coupes ont été colorées par la méthode de Richardson et coll. (1960) dans un mélange de bleu et d'azur de méthylène.

OBSERVATIONS

Sur coupes, la structure des élytres de Polynoinae est relativement simple (Pl. I, 1 et 2). Une seule couche épithéliale continue, doublée extérieurement d'une cuticule, constitue la face supérieure de l'élytre comme sa face inférieure. Ces deux assises cellulaires sont séparées, dans l'épaisseur de l'élytre, par un feutrage de fibres qui laissent entre elles d'assez larges espaces.

Selon leur emplacement, les cellules hypodermiques et la cuticule ont des aspects et des spécialisations divers.

A) Les cellules épithéliales banales et la cuticule.

Les cellules, situées à la face *supérieure* des élytres, sont assez petites et très basses; elles contiennent souvent, mais en quantités variables selon les individus considérés, des granules de glycogène; ceux-ci sont bien mis en évidence par la réaction à l'acide periodique-Schiff ou le carmin de Best, mais ils disparaissent des coupes traitées par l'amylase. Dans certaines zones, les cellules épidermiques contiennent de nombreux granules sphériques d'un noir très dense qui ne sont plus apparents lorsque les coupes ont été fortement oxydées (permanganate de potassium, par exemple): ils représentent de la mélanine. Ce pigment est surtout abondant dans les cellules situées au bord des élytres; les cellules situées au-dessus de la zone photogène en sont toujours dépourvues.

La cuticule de la face supérieure porte de nombreuses ornements (Pl. I, 1).

Il s'agit d'une part, de denticules coniques qui reposent sur une embase en bourrelet; ils sont massifs. Les deux tiers basaux de leur axe sont occupés par un fin prolongement cellulaire. Les caractères

histochimiques de ces denticules diffèrent nettement de ceux de la cuticule ; ils ne sont pas Hotchkiss-positifs alors que la cuticule l'est fortement, et ils donnent une réaction des protides sulfhydrilés beaucoup plus forte que cette dernière. Il existe, en second lieu, des papilles cylindriques, dressées perpendiculairement au plan de l'élytre, toujours creusées d'un canal axial qui débouche à l'extérieur (Pl. I, 4). Ces papilles ont les mêmes affinités tinctoriales et les mêmes caractères histochimiques que la cuticule. Elles sont toujours situées au-dessus d'un petit groupe de cellules glandulaires disposées en rosette, beaucoup plus grandes que les cellules épithéliales banales. Des filets nerveux y aboutissent. Ces cellules sécrètent un produit Hotchkiss-positif dont on suit le cheminement vers le milieu extérieur, dans le canal de la papille cuticulaire. Ce sont ces derniers ensembles qui avaient été interprétés comme organes lumineux par Kutschera (1909) et par Dahlgren (1916).

La cuticule de la face inférieure des élytres a une apparence et une épaisseur uniforme sur toute sa surface ; elle est totalement dépourvue d'ornementations. A la limite de l'élytre et de l'élytrophore, elle est marquée d'une ligne de rupture transversale ; en fait, la plupart des élytres observées étaient déjà partiellement détachées de l'élytrophore (Pl. I, 1), cette autonomie étant due aux manipulations subies par l'annélide et à l'action des mélanges fixateurs.

Les cellules épithéliales de la face inférieure ont le même aspect que celles de la face opposée et sont seulement légèrement plus hautes.

Dans certaines régions, elles sont aussi susceptibles d'accumuler de la mélanine. Mais leur différenciation remarquable a lieu dans la zone d'illumination de l'élytre. Là toutes les cellules, toujours dispersées en une seule assise, ont des caractères particuliers qui leur ont valu d'être distinguées sous le nom de photocytes.

Le passage des cellules épithéliales banales aux photocytes est assez brusque : il s'effectue sur quelques cellules dont la hauteur croît rapidement et qui contiennent de plus en plus de grains acidophiles.

B) Les cellules lumineuses.

Les dimensions moyennes des cellules lumineuses sont de l'ordre de 4 μ sur 25 μ . Cependant leurs membranes ne sont nettement visibles que dans une courte partie de leur trajet, à partir de la cuticule. Plus haut, les frontières entre les photocytes voisins et les limites supérieures sont indiscernables, quelles que soient les méthodes histologiques employées : il est donc possible que la hauteur des photocytes, évaluée ici d'après la position des grains les plus apicaux, soit, en fait, beaucoup plus importante.

Le noyau des photocytes est situé dans leur tiers inférieur, donc légèrement plus haut que dans le cas des cellules hypodermiques banales. Sa forme est assez régulière, ovoïde, mais il présente parfois une ou deux profondes incisions qui délimitent des lobes. La chromatine est dispersée en petites mottes, abondantes surtout contre la membrane nucléaire. Le ou les nucléoles, relativement petits (1 à 2 μ),

sphériques, sont bien caractérisés par leur pyroninophilie après coloration par la méthode de Pappenheim-Unna. Cette affinité tinctoriale disparaît si les coupes ont été préalablement traitées par la ribonucléase.

La même coloration au vert de méthyle-pyronine, contrôlée par l'épreuve de la ribonucléase, met en évidence, d'une manière beaucoup plus nette que d'autres colorants basiques et, en particulier, la gallo-cyanine, une aire cytoplasmique riche en acide ribonucléique. Cette zone entoure le noyau ; elle est approximativement triangulaire, sa base étant parallèle à la cuticule (Pl. I, 6) ; elle n'existe que dans les photocytes et n'est pas caractérisée autrement que par sa basophilie.

Entre la partie inférieure de cette zone et la cuticule, le cytoplasme est finement strié longitudinalement ; les colorations par les méthodes dites générales lui confèrent une teinte plus claire que celle du reste du cytoplasme ; la fuchsine-paraldéhyde après oxydation permanganique en milieu sulfurique et la tétrazoréaction de Danielli le colorent fortement. D'autre part, on peut constamment révéler des quantités importantes de glycogène (Pl. I, 8) dans cette bande cytoplasmique qui, elle, existe aussi bien dans les photocytes que dans les autres cellules épithéliales.

Les colorations mitochondriales mettent en évidence, dans la région périnucléaire des photocytes, de tout petits granules fortement fuchsinophiles ou sidérophiles. Mais il est difficile d'affirmer que ces éléments représentent à coup sûr le chondriome ; en effet, les grains de photocytes se colorent aussi très fortement par la fuchsine d'Altmann ou l'hématoxyline de Regaud et les plus petits d'entre eux sont précisément situés dans la région infra et périnucléaire des photocytes.

C) Les grains photogènes.

Les grains photogènes sont bien conservés par tous les fixateurs histologiques usuels, aqueux ou alcooliques. Sur coupes non colorées, ils sont aisément repérables par leur réfringence qui est nettement plus élevée que celle d'aucune autre structure des élytres. Mais, examinés entre nicols croisés, les grains ne sont pas biréfringents.

Leur taille et leur nombre augmentent à mesure que l'on observe une région des photocytes plus éloignée de la cuticule. Dans la partie moyenne de ces cellules, les grains, bien séparés, ont souvent des contours polygonaux plus ou moins curvilignes ; leur dimension est de l'ordre de 2 à 3 μ . A l'apex des photocytes, les grains sont ovoïdes, leur grand axe étant parallèle à celui de la cellule ; ils sont tassés les uns contre les autres et déformés par ces contacts ; souvent ils sont creusés d'une ou plusieurs petites cavités. Les plus gros d'entre eux (6 μ), contiennent, en abondance variable selon les animaux observés, des inclusions extrêmement réfringentes mais de taille minime, ce qui exclut la possibilité de toute caractérisation histo-chimique.

Les principaux caractères histo-chimiques et les affinités tinctoriales des grains sont énumérés dans les tableaux 1, 2 et 3, qui appellent quelques commentaires et précisions.

TABLEAU I
AFFINITÉS TINCTORIALES GÉNÉRALES DES PHOTOCYTES
ET DES ÉLÉMENTS AVOISINANTS

Méthodes	Fixation	Grains	Cytoplasme péri- nucléaire	Faisceaux de fibres Observées dans la partie moyenne des élytres	Flaques
Azan	B H	Jaunes- orange	Bleu- jaune	Jaunes	Bleues
Trichrome en un temps	B H	Jaunes	Gris	Roses	Vertes
Triple Millot	B H	Rouges	Gris- jaune	Gris- rose	—
Mann	B	Roses	Bleu- gris	Roses	Bleues
Mann-Dominici	H	Bleu- vert	Mauve	Bleues	—
Safranine - vert lumière	Flem	Verts	Rose	Jau- nâtres	—
Hémalun seul	B H	Bleus			
Fuch sine paraldéhyde directe	B H	—	—	—	—
Oxydation-Fuchs. parald. ...	B H	—	Violet foncé	Violet clair	Violet clair
Vert de méthyle-pyronine ..	C	—	Rouge	—	—

TABLEAU II
RÉACTIONS DES GLUCIDES

Méthodes	Fixation	Grains des Photocytes	Glycogène	Faisceaux de fibres	Flaques
Acide periodique Schiff (A.P.S.)	H B	++	+++	++	+
Maltase A.P.S.	H B	++	—	++	+
Schiff direct	H B	—	—	—	—
Pyridine - A.P.S.	H B	++	+++	++	+
Acétylation A.P.S.	H B	—	—	—	—
Acétylation-saponification A.P.S.	H	++	+++	+	+
Bismuthate de sodium-Schiff	H	±	+++	+ à ++	++
Tétracétate de plomb-Schiff.	H	+	+	±	±
Acide chromique-Schiff	H B	—	+	+	+
Carmin de Best	H B	±	++	—	—
Bleu Alcian (Mowry)	H B	—	—	—	—
Réaction métachromatique .	H B	—	—	—	—

B, Bouin - H, Halmi - Flem, Flemming - C, Carnoy.

TABLEAU III
 DÉTECTION DES PROTIDES, DES NUCLEOPROTÉINES,
 DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX ET DES PHOSPHATASES

Méthodes	Fixation	Grains des Photocytes	Faisceaux des fibres	Flaques
Feulgen	H R M C	—	—	—
Gallocyanine	B H	—	—	—
Vert de méthyle-pyronine	C	—	—	—
Hartig Zaccharias	B H	+++	—	—
Salazar	B H	±	—	—
Alloxane - Schiff	B H	+++	+	+
Millon	B H	+	±	±
Sakaguchi	B	±	—	—
Tetrazoréaction (Danielli)	H	+	++	—
Tetrazoréaction (Landing and Hall)	H	+	+	+
Adams direct	B H	+++	+	±
Adams après réduction	B H	++++	+	—
D.D.D. direct	B H	++	+	—
D.D.D. après réduction	B H	++	+	—
Néotetrazolium direct	H	++++	+	—
Néotetrazolium après réduction ..	H	++++	+	—
Détection du fer	Alc. Chl.	—	—	—
Détection du calcium	Alc. Chl.	—	—	—
Phosphatase alcaline	Alc. Chl.	—	—	—
Phosphatase acide	Alc. Chl.	—	—	—

C, Carnoy - H, Halmi - R, Regaud - M, Maximow - Alc. Chl., Alcool Chloroforme.

1. Les résultats obtenus sont identiques chez *Lagisca* et chez *Acholoë*.

2. Lorsqu'une réaction histochimique donne un résultat soit positif, soit négatif, ce résultat est valable pour l'ensemble des grains de la zone photogène. De même, aucune des colorations employées, même celles qui mettent en compétition plusieurs colorants acides, ne permet jamais de distinguer deux types de grains. Cependant, il existe souvent un gradient d'intensité des réactions au long de l'axe cellulaire, les grains les plus gros étant les plus fortement colorés. Qui plus est, dans ces grains même, il existe aussi un net gradient suivant la même direction.

3. Les grains photogènes sont fortement acidophiles : ils prennent l'orange G du colorant de Heidenhain, l'éosine du mélange de Mann, le jaune de mars du trichrome en un temps ; ils sont très fortement colorés en rouge après une triple coloration de Millot qui donne des résultats particulièrement beaux sur ce matériel.

4. Les grains contiennent une substance révélabile par le réactif de Schiff après diverses oxydations (Pl. I, 8) et dont la nature gluci-

dique est prouvée par l'épreuve de l'acétylation réversible (tableau 2). La présence de ce glucide explique sans doute l'affinité des grains pour certains colorants basiques comme l'hémalun ou l'hématoxyline de Groat. Cette affinité est faible mais nette, à condition qu'aucun colorant acide ne soit employé ultérieurement ; elle persiste après action même prolongée (12 h.) de la ribonucléase. En outre, les grains ne se colorent pas par le bleu alcian à bas pH. Le bleu de toluidine à pH 6,3 les colore orthochromatiquement en bleu-vert. On peut donc conclure qu'ils contiennent un mucopolysaccharide neutre ou une glycoprotéine au sens large du terme.

Les réactions générales des glucides ou bien le carmin de Best mettent souvent en évidence, outre ce mucopolysaccharide, de petits amas de glycogène superposés aux grains ou situés à leur proximité immédiate. Mais ce glycogène, contrairement à celui qui est situé dans la partie cytoplasmique la plus proche de la cuticule, est présent en quantités très variables d'un animal à l'autre.

5. L'ensemble des réactions énumérées au tableau 3 prouve la richesse des grains en protides, particulièrement en α -aminoacides et en groupements réducteurs : certains de ces derniers groupements, révélés par la méthode en ferricyanure ferrique, sont indiscutablement des groupements sulfhydrilés, comme le montrent les réactions au 2-2'-dihydroxy-disulfure de dinaphtyle (D.D.D.) et au néotetrazolium, cette dernière donnant des résultats exceptionnellement forts (Pl. I, 5). Le fait qu'une réduction au thioglycérol ou au sulfure d'ammonium, pratiquée avant la mise en œuvre de ces réactions, n'en modifie pratiquement pas l'intensité, prouve l'abondance des groupements - SH, ce qu'il faut très probablement rapporter à la présence de cystéine.

Les détectations des aminoacides à fonction phénol par couplage avec un colorant azoïque puis postcouplage avec de l'acide H (Pl. I, 7), donnent des résultats moyennement forts. Ces résultats ne sont pas affectés par un traitement préalable à l'iode (réaction de Landing et Hall), ce qui tend à prouver que la réaction est due à la présence d'histidine plus qu'à celle de tyrosine ou de tryptophane. La réaction de Sakaguchi, à peine positive, dénote une faible teneur en radicaux guanidine.

6. Les grains ne contiennent ni acide désoxyribonucléique, ni acide ribonucléique histochimiquement décelable. Leur affinité pour certains colorants basiques s'explique suffisamment (voir ci-dessus) en tenant compte de la présence d'un mucopolysaccharide neutre ; de plus, les grains ne sont pas colorés du tout après mise en œuvre de la technique de Pappenheim-Unna.

7. Les grains ne contiennent pas de lipides histochimiquement décelables. Les réactions de détection du fer et du calcium sont négatives ; examinés sur spodogrammes, les grains ne montrent d'ailleurs que des cendres blanches. Enfin, la recherche d'activités phosphatases acides ou alcalines par la méthode de Gomori ne donne de résultats positifs dans aucune des structures des élytres.

D) La partie moyenne des élytres.

Entre les photocytes ou les cellules banales de l'épithélium inférieur et l'épithélium de la face supérieure, la partie moyenne des élytres est traversée par de nombreux faisceaux de fibres ; leur orientation est toujours transversale, leur longueur peut atteindre 60 μ , leur diamètre est de l'ordre de 1 à 2 μ . La réaction nucléale de Feulgen et Rossenbeck ne met jamais en évidence, dans cette partie moyenne des élytres, de noyaux autres que ceux des cellules engainant les filets nerveux qui cheminent dans l'élytre ou ceux de rares cellules isolées, probablement sanguines. Les coupes semi-fines ainsi que certaines colorations trichromes (tableau 1), qui mettent particulièrement bien en évidence les faisceaux de fibres, montrent que celles-ci contractent des relations topographiques intimes avec les cellules épithéliales (Pl. I, 2, 3 et 7), sans permettre d'affirmer pour autant leur situation intracellulaire.

Les mêmes colorations dites générales soulignent le contraste entre les faisceaux de fibres et les espaces qui les séparent, en mettant en évidence, dans ces espaces interfibrillaires, des flaques de densité irrégulière, qui prennent le bleu d'aniline du colorant de Heidenhain, le bleu de méthyle du colorant de Mann, alors que les fibres prennent l'orange G ou l'éosine.

Les réactions histochimiques (tableaux 2 et 3) confirment ces différences : les flaques et les fibres contiennent toutes deux un glucide, mais seules ces dernières sont bien mises en évidence par les réactions de détection des protides et, en particulier, par la tétrazo-réaction de Danielli (Pl. I, 7).

DISCUSSION

Les photocytes se distinguent donc par un ensemble de caractères très tranchés des cellules épithéliales banales. Ils n'en sont cependant qu'une différenciation locale et assument, au même titre qu'elles, certaines fonctions.

1. Les photocytes élaborent une partie de la cuticule continue qui revêt l'élytre. La zone cytoplasmique, située à proximité immédiate de la cuticule, est bien caractérisée par son aspect, ses affinités tinctoriales et ses caractères histochimiques, notamment sa richesse en protides phénoliques. Cette zone existe dans toutes les cellules épithéliales de l'élytre. On peut donc l'interpréter comme le lieu d'accumulation d'éléments rentrant dans la constitution de la cuticule.

2. Les photocytes participent à la cohésion générale de l'élytre, remarquable, puisque cette expansion tégumentaire souple et résistante comporte seulement deux assises cellulaires dans son épaisseur. La cuticule intervient certainement pour une large part dans cette cohésion. Mais il faut considérer aussi le rôle des cellules elles-mêmes et

celui des faisceaux de fibres. Les seules observations au microscope photonique ne permettent pas, comme cela a été signalé, de distinguer nettement les contours cellulaires. On peut donc supposer que ceux-ci sont extrêmement sinueux et irréguliers, ce qui favoriserait l'adhérence des cellules apposées. Le fait que des faisceaux de fibres peuvent être suivis jusque dans la partie infranucléaire des cellules épithéliales et particulièrement des photocytes, apporte aussi un argument pour dire que l'apex des cellules est probablement très découpé. Les observations au microscope électronique (Bassot, 1965) confirment ces vues et permettent de préciser que les faisceaux de fibres sont en réalité toujours engainés dans les prolongements cellulaires ; ainsi, seules les flaques glucidiques, situées entre les faisceaux, sont extracellulaires. Les faisceaux de fibres sont présents dans toutes les zones de l'élytre et existent aussi chez les espèces non lumineuses. Leur disposition et leur direction, presque toujours perpendiculaire au plan de l'élytre, plaident en faveur du rôle purement mécanique qu'ils pourraient jouer en maintenant une certaine distance entre les couches épithéliales de la face inférieure et de la face supérieure, ce qui permet à l'élytre d'avoir une épaisseur non négligeable.

A côté de fonctions communes aux photocytes et aux cellules épithéliales banales, fonctions auxquelles correspondent des structures qui existent dans les deux types de cellules, les photocytes se singularisent par la présence de grains acidophiles et, du point de vue fonctionnel, par la bioluminescence.

L'augmentation de la taille des grains, depuis la région périnucléaire jusqu'au pôle de la cellule où ils s'accumulent, est signalée par Bonhomme (1942, 1954), qui interprète les grains comme des *grains de sécrétion*. L'hypothèse, formulée par cet auteur, d'une origine mitochondriale des grains, n'est certainement pas à retenir.

La mise en évidence, dans la zone périnucléaire, d'une zone riche en acide ribonucléique, apporte un argument plus probant en faveur de l'interprétation des grains comme produit de sécrétion. Il est plausible, en effet, de considérer que les grains résulteraient de l'activité élaboratrice d'un ergastoplasme. Les caractères histochimiques des grains (à l'exception de leur teneur particulièrement forte en groupements SH) sont en fait assez banaux : ce sont ceux des produits de sécrétion de nombreuses cellules glandulaires dites séreuses, dont le cytoplasme est également riche en acide ribonucléique.

En ne considérant que les seules données de la microscopie photonique, il se trouve cependant certains arguments qui rendent l'interprétation des grains comme produit de sécrétion assez délicate. Selon cette conception, il faudrait en effet considérer que les photocytes ont une bipolarité fonctionnelle d'un type exceptionnel chez les Métazoaires : ils élaboreraient la cuticule à une de leurs extrémités et accumuleraient à l'autre un produit de sécrétion radicalement différent. D'autre part, on conçoit mal qu'elles pourraient être les étapes finales du cycle sécrétoire des grains, puisque l'on n'observe jamais d'images d'extrusion ni de lyse intracellulaire.

L'observation des grains au microscope électronique (Bassot, 1964 et 1965) démontre la complexité de leur structure et confirme qu'ils ne peuvent être entièrement considérés comme des grains de sécrétion.

En effet, rappelons-le, une forme hautement spécialisée de reticulum endoplasmique, c'est-à-dire un organite cytoplasmique, fait partie intégrante des grains. Ce reticulum est là, organisé en microtubules uniformément calibrés, disposés d'une manière répétitive complexe. Seuls les produits contenus soit dans la lumière des microtubules, soit entre les microtubules, peuvent être considérés comme des produits de sécrétion au sens restreint du terme.

Les données histochimiques et histologiques ne laissent absolument pas soupçonner cette organisation infrastructurale, mais elles permettent d'en préciser l'interprétation. L'absence d'acide ribonucléique et de ribosomes permet difficilement d'accorder un rôle élaborateur aux microtubules des grains. Il est plausible de considérer que le ou les produits de sécrétion sont synthétisés au niveau du reticulum endoplasmique banal périnucléaire. Celui-ci est en continuité avec les microtubules des grains : les produits élaborés peuvent donc émigrer vers ces derniers et y être emmagasinés. Ainsi, les grains photogènes seraient seulement un lieu d'accumulation de produits élaborés ailleurs, l'une des conséquences de l'organisation complexe qui vient d'être rappelée étant un accroissement considérable des surfaces de contact par rapport aux volumes.

On peut se demander lequel ou lesquels des constituants des grains (le constituant membranaire, le produit situé à l'intérieur des microtubules ou le produit situé entre ceux-ci) sont révélés par des méthodes histochimiques. En ce qui concerne les structures membranaires, il faut évoquer les quelques cas où des organites cytoplasmiques, suffisamment bien caractérisés et localisés dans des cellules, ont pu être analysés histochimiquement. On sait ainsi que l'appareil de Golgi donne une réaction de Hotchkiss-Mc Manus positive (cf bibliographie *in* Graumann 1964). Les corps myéloïdes des cellules épithéliales pigmentaires de la rétine de Grenouille — (Porter et Yamada, 1960) corps constitués par un empilement très régulier de saccules membranaires, continus sur leur bord au reticulum endoplasmique lisse — sont aussi APS positifs. Mais, pas plus dans ces exemples que dans celui des grains photogènes de Polynoinae, on ne saurait affirmer que la réaction APS positive est due à l'organite même et non aux produits qu'il accumule ou synthétise. Cependant, dans les grains des Annélides, le gradient d'intensité des réactions, dû à un déplacement des produits réactifs au cours des manœuvres de fixation, accreditte l'hypothèse selon laquelle les colorations et réactions histochimiques effectuées au cours de cette étude décèlent les vrais produits de sécrétion et non le reticulum endoplasmique agencé en microtubules.

Summary

The luminous area of the elytra, in polynoïd worms, is characterized by a local differentiation of the epithelial cells of the underside.

These cells or photocytes, just like common epithelial cells, secrete the elytra cuticle and contain long, slender bundles of fibers. But only the photocytes possess a perinuclear cytoplasm rich in RNA, and they store numerous acidophilic granules, containing a neutral mucopolysaccharide; they are exceptionally rich in cystein.

The significance of these histochemical particularities is discussed in comparison with the ultrastructural data: although the granules are in fact very complex

and partially made of a cytoplasmic organella, i.e., a specialized form of endoplasmic reticulum, it seems that the products histochemically revealed are really secretory products.

Zusammenfassung

Die leuchtende Zone der Elytren von Polynoïnae ist durch eine Differenzierung der Epithelialzellen der Innenseite gekennzeichnet.

Diese Zellen oder Photocyten bilden ebenso wie gewöhnliche Zellen die Cuticula der Elytren und enthalten lange Faserbündel. Aber nur die Photocyten besitzen eine an ARN reiche Perinuklearzone, und häufen zahlreiche neutrale Mucopolysaccharid Körner an; ihr Gehalt an Cystein ist aussergewöhnlich hoch.

Die Bedeutung dieser histochemischen Eigenschaften wird im Zusammenhang mit der Ultrastruktur diskutiert; obwohl diese Granula komplexe Einheiten darstellen, die insbesondere eine spezielle Form eines endoplasmatischen Retikulums aufweisen, scheint es, dass die nachgewiesenen Stoffe Sekretionsprodukte sind.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- AFZELIUS, B.A., 1964. — Communication personnelle.
- BASSOT, J.-M., 1964. — Présence, dans les photocytes des Annélides Polynoïnae, d'une forme paracristalline de reticulum endoplasmique. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 259, pp. 1549-1552.
- BASSOT, J.-M., 1965. — Une forme microtubulaire et paracristalline de réticulum endoplasmique dans les photocytes des Annélides Polynoïnae. *J. Cell. Biol.* (sous presse).
- BONHOMME, C., 1962. — Recherches sur l'histologie de l'appareil lumineux des Polynoïnae. *Bull. Inst. Océan. Monaco*, 39, 823, 8 p.
- BONHOMME, C., 1954. — L'appareil photogène de quelques Annélides méditerranéennes. *Arch. Anat. micr. et Morph. exp.*, 43, pp. 202-235.
- DAHLGREN, U., 1916. — The production of light by animals. *J. Franklin Inst.*, 181, pp. 243-261.
- GABE, M. et MARTOJA, M., 1956. — Rôle du facteur temps dans l'acétylation réversible suivant Mc Manus et Cason. *Ann. Histochimie* 1, pp. 181-190.
- GABE, M. et MARTOJA, M., 1957. — Une coloration trichrome en un temps sans différenciation. *Bull. Micr. appl.* 7, pp. 50-53.
- GOMORI, G., 1952. — Microscopic histochemistry. Chicago Univ. Press.
- GRAUMANN, W., 1964. — Handbuch der Histochemie. Tome II : polysaccharide. Gustav Fischer éd., Stuttgart, 743 p.
- JOURDAN, E., 1885. — Structure des élytres de quelques Polynoïes. *Zool. Anz.* 8, pp. 128-134.
- KUTSCHERA, F., 1909. — Die Leuchtorgane von Acholoë astericola. *Z. Wiss. Zool.* 92, pp. 75-102.
- LISON, L., 1960. — Histochimie et Cytochimie animales. Gauthier-Villars, Paris.
- LUFT, J.H., 1961. — Improvements in exsposy resin embedding methods. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.* 9, pp. 409-414.
- NICOL, J.A.C., 1953. — Luminescence in polynoïd worms. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 32, pp. 65-84.
- NICOL, J.A.C., 1954. — The nervous control of luminescent responses in polynoïd worms. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 33, pp. 225-255.
- PANCERI, P., 1874. — Intorno alla luce che emana dei nervi delle elitre della Polynoe. *R.C. Accad. Napoli* 13, pp. 143-147.
- PEARSE, A.G.E., 1960. — Histochemistry. Churchill, London.
- PORTER, K.R. et YAMADA, E., 1960. — Studies on endoplasmic reticulum. V : its form and differentiation in pigment epithelial cells of the frog retina. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.* 8, pp. 181-205.
- QUATREFAGES, A. DE, 1863. — Note sur un nouveau mode de phosphorescence observé chez quelques Annélides et Ophiures. *Ann. Sci. Nat. Zool.*, 2, 19, pp. 183-192.
- RICHARDSON, K.G., JARETT, L. et FINKE, E.H., 1960. — Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technology* 35, pp. 313-323.

PLANCHE I

1. — Aspect d'une élytre de *Lagisca* à faible grossissement, en coupe transversale.

L'élytre s'insère sur la face dorsale de l'Annélide par l'intermédiaire d'un élytrophore. La fixation histologique a provoqué un début d'autotomie de l'élytre, qui se détache de l'élytrophore selon une ligne de déhiscence bien marquée.

La cuticule de la face supérieure porte de nombreuses ornementsations, soit des denticules *d*, soit des papilles *p*, alors que la cuticule de la face inférieure est lisse.

Les cellules de la zone photogène *Ph* sont aisément identifiables dès ce grossissement par leur taille plus élevée que les cellules banales et la présence de nombreux grains « photogènes ». *f* : faisceaux de fibres séparant les assises épithéliales supérieures et inférieures ; *ne* : nerf de l'élytre.

Halmi, Azan, *G* = 175.

2. — Détail d'une préparation analogue, au niveau de la zone photogène.

Celle-ci est formée de cellules épithéliales modifiées contenant de nombreux grains photogènes *g*.

Les faisceaux de fibres laissent entre eux des espaces extracellulaires clairs. *c* : cuticule.

G = 650.

3. — Préparation analogue : aspect des photocytes à fort grossissement.

Remarquer, immédiatement au-dessus de la cuticule, l'aspect strié du cytoplasme. Des fibres *f* semblent pénétrer profondément dans les photocytes. Les grains photogènes sont de diverses tailles. Les plus éloignés de la cuticule sont les plus gros et les plus fortement colorés. Ils contiennent des petites vacuoles et des inclusions denses. *n* : noyau.

G = 3 000.

4. — Détail d'une papille à la face supérieure d'une élytre. Un petit groupe de cellules glandulaires est situé sous l'expansion cuticulaire creuse.

Lagisca, Bouin, Trichrome en un temps.

G = 2 500.

5. — Détections des protides sulfhydrilés.

Les grains photogènes, surtout ceux qui sont les plus éloignés de la cuticule, donnent une réaction très fortement positive qui prouve leur richesse en cystéine.

Lagisca, Halmi, réaction au neotetrazolium sans réduction préalable.

G = 650.

6. — Présence d'une zone cytoplasmique riche en acide ribonucléique dans les photocytes. Cette zone, approximativement triangulaire, est colorée par la pyronine ; les grains photogènes restent incolores.

Lagisca, Carnoy, vert de méthyle-pyronine. Ecran vert.

G = 650.

7. — Détection des aminoacides phénoliques.

Les grains donnent une réaction nettement positive mais moins forte cependant que celle des faisceaux de fibres (dont on peut suivre le cheminement jusqu'au niveau des noyaux) ou de la bande cytoplasmique basale apposée à la cuticule.

Lagisca, Halmi, tétrazoréaction de Danielli.

G = 650.

8. — Détection des glucides.

Les grains donnent une réaction d'autant plus forte qu'ils sont plus éloignés de la cuticule. La partie tout à fait basale du cytoplasme est riche en glycogène.

Lagisca, Bouin, réaction au bismuthate de sodium-Schiff. Ecran vert.

G = 650.

