

**COMPOSÉS HALOGÉNÉS  
ET ÉLÉMENTS MINÉRAUX  
IMPLIQUÉS DANS LA CONSOLIDATION DES SOIES  
CHEZ *PETTA PUSILLA* MALMGREN,  
POLYCHÈTE AMPHICTENIDAE**

par

Jean Vovelle (1), Michèle Grasset et Michel Truchet (2)

**Résumé**

Les soies palées du Polychète Amphictenidae *Petta pusilla* ont été examinées par la cytologie, l'histochimie et la microanalyse. Le faisceau de tubes creux chitineux qui les constitue à partir des microvillosités du chétoblaste est oblitéré dans la région corticale par une protéine riche en tyrosine halogénée (Br et I). La teneur en brome est plus stable que celle de l'iode qui augmente vers la pointe. Les fortes palées externes sont consolidées (sur leur face externe surtout) par cette substance, impliquée sans doute dans un processus de tannage, davantage que les premières formées, riches en calcium, qui se localise ensuite à la base et à la face interne des soies. Le fer est discrètement présent.

**Introduction**

Le projet initial de ce travail était d'apprécier l'interférence éventuelle d'un processus de biominéralisation avec le tannage quinonique qui stabilise les protéines fixées sur trame chitineuse, dans la constitution des soies d'Annélides Polychètes. Nous avons choisi l'espèce *Petta pusilla*, récoltée en Suède, dont nous avons étudié le ciment organo-minéral du tube (Vovelle, 1979); nous y avons reconnu la présence d'une composante ferrique plus abondante et plus constante que chez la Pectinaire commune en Normandie, *Lagis koreni* (Truchet et Vovelle, 1977). Or, des observations non publiées en détail (Le Bail et Vovelle, 1971, cité in Vovelle, 1982) nous avaient fait identifier le même métal dans les soies de *Lagis*, parfois en abondance, mais avec une réponse capricieuse selon les échantillons. Nous avons échoué à identifier le fer dans des conditions plus satisfaisantes chez *Petta*, mais cette hypothèse de travail et les moyens de détection

---

1. Histologie et Cytologie des Invertébrés marins. Université P. et M. Curie, 12, rue Cuvier, 75005 Paris.

2. Histophysiologie des Insectes. Equipe de recherche associée au C.N.R.S, n° 570. Université P. et M. Curie, 12, rue Cuvier, 75005 Paris.

mis en œuvre (microanalyse) ont permis, par compensation, de mettre en vedette des éléments imprévus (halogènes), conduisant à définir pour la soie un bilan d'ensemble plus complet que celui que nous avons établi dans une récente synthèse (Vovelle, 1982), à partir de données bibliographiques et de résultats personnels. On trouvera dans l'article en question une revue des travaux concernant la structure de la soie d'Annélide, la démonstration de sa trame chitineuse, du tannage quinonique qui stabilise sa composante protéique et de la présence éventuelle de biominéraux (Ca et Fe). En ce qui concerne la participation de composés halogénés, ignorée dans cette mise au point, les deux seules données de la littérature mettent en cause l'iode : celles de Swan (1950) qui détecte l'incorporation de l'iode radioactif dans des soies de Serpuliens, et de Gorbman *et al.* (1954) qui, par radiochromatographie, reconnaissent le même élément (sous forme diiodotyrosine et monoiodotyrosine) dans celles d'un Néréidien. Confirmant et complétant ces diagnostics, nos résultats évoquent l'intérêt phylogénique d'un système de stabilisation de structures squelettiques mieux connu chez d'autres groupes d'Invertébrés. Adressées principalement à *Petta pusilla*, nos observations ont été élargies sur quelques points à d'autres Amphictenidae (*Lagis koreni* et *Pectinaria auricoma*).

### Matériel et méthodes

#### Récolte

*Petta pusilla* a été récoltée en août 1977 et en juillet 1981 à proximité de la Kristineberg Marinbiologiska Station (Suède) à l'embouchure du Gullmarfjord, par 30 mètres de profondeur, à l'endroit déjà connu et exploité pour des travaux antérieurs (Humlesäcksrannan). Les quelques *Pectinaria auricoma* utilisées pour la comparaison proviennent aussi du Gullmarfjord; *Lagis koreni* a été collectée en Normandie (Le Home Varaville). Des *Petta* récoltées en août 1977 ont été comparées à celles de la dernière récolte : elles fournissent des résultats identiques pour l'histo-chimie et la microanalyse.

#### Étude histologique et histo-chimique

Une partie des animaux a été fixée au Bouin aqueux (48 h), au formol salé et à l'alcool-formol selon la formule de Mc-Gee Russell (12 h). Après inclusion à la paraffine, les échantillons ont été coupés à 7  $\mu\text{m}$  pour l'anatomie microscopique, l'histo-chimie et la microanalyse.

Examen topographique après coloration à l'Azan de Heidenhain.

#### Histo-chimie des substances minérales

Calcium : méthode de substitution de Stoeltzner, méthode à la laque d'Alizarine (variante Mc-Gee Russell), méthode de chélation au GBHA (Kashiwa) pratiquée sur coupes à la paraffine. Fer ferrique : réaction de Perls au ferrocyanure.

#### Histo-chimie des composés organiques

Polysaccharides : méthode à l'Acide periodique-Schiff. Chitine : méthode signalétique au Rouge Congo différenciée au carbonate de lithium.

Protéines. Tryptophane : méthode de Glenner au rosindole. Tyrosine : méthode de Millon (variante Pollister), méthode de Morel et Sisley.

Éléments du tannage quinonique; composés réducteurs : réaction argentaffine. Et comme signalétique de composantes d'un tannage quinonique, méthode au vert malachite d'après Smyth.

### Cytologie ultrastructurale

Fixation par le glutaraldéhyde à 2 p. 100 dans le tampon cacodylate 0,4M à pH 7,2, pendant 1 h 30 à 40°C. Post-fixation au tétroxyde d'osmium à 2 p. 100 dans le tampon véronal pH 7,2, pendant 2 h à 4°C. Déshydratation par les alcools successifs et l'oxyde de propylène.

Inclusion à l'araldite.

Coupes ultrafines : sur microtome Reichert OMU 2, contrastées par la double coloration acétate d'uranyle-citrate de plomb selon Reynolds (1963).

Observation : sur microscope électronique Philips EM 300 sous 60 kV.

### Microanalyse (1)

Des coupes voisines de celles utilisées pour l'histochimie, fixées à l'alcool-formol et, éventuellement, des coupes semi-fines de pièces fixées à la glutaraldéhyde seule et non désaralditées, ont été examinées soit à la microsonde, soit à l'analyseur ionique.

— Microsonde de Castaing. Les coupes étalées sur terphane carboné, séchées et déparaffinées, ont été analysées par spectrographie en dispersion de longueur d'onde avec une microsonde Cameca MS 46 dans les conditions suivantes : tension d'accélération 30 kV; intensité de la sonde, 50 nA; cristaux P.E.T. pour le calcium, le fer et l'iode, KAP pour le phosphore, le soufre et le brome, diamètre de sonde 1 µm environ.

— Microanalyseur ionique. Coupes étalées sur or poli ou sur platine, déparaffinées et séchées. Examen sur appareil Cameca SMI 300, dans des conditions précisées antérieurement (Truchet et Vovelle, 1977) : bombardement 0,+ (7,5 µA environ); diaphragme de contraste de la lentille à émission : 200 µm; résolution sur l'image : 1 µm environ. Champ observé de 250 µm de diamètre, champ de mesure : 60 µm de diamètre. Tension objet : 4,5 kV; tension convertisseur 42 kV.

### Repères de morphologie et d'anatomie microscopique

Les soies palées de *Petta* répondent à la définition qu'en donne Fauvel pour l'ensemble des Amphictenidae, « grandes soies aplaties... dirigées obliquement en avant et formant opercule obturant le tube de l'animal », on pourrait leur appliquer aussi le complément de description que Bobin formule pour le genre *Lagis* : « ... rangées en une seule ligne en dents de peigne, symétriques à droite et à gauche... Les plus jeunes, à la fois plus courtes et de plus grand diamètre, sont situées à l'une des extrémités des rangées, sur les bords de l'opercule ». Les palées de *Petta* s'écartent de ces descriptions inspirées des genres *Pectinaria* et *Lagis* par un détail important, elles ne sont pas dorées mais sombres, et leur extrémité est obtuse au lieu d'apparaître effilée ou même bouclée comme chez ces derniers.

On en compte extérieurement 9 à 10 chez l'adulte (d'après Fauvel), contre 10 à 15 chez *Lagis*. L'examen d'individus très jeunes, juste après la métamorphose (diamètre du tube 0,4 mm) a montré chez *Lagis* que la plupart des palées (9) étaient déjà fonctionnelles, donc très précocement formées. La présence à l'extrémité externe de chaque rangée d'une soie inachevée, encore enclavée, est facilement observable chez *Lagis* et, chez *Petta*, nous avons pu en détecter un

(1) Etude effectuée au Service commun de Microanalyse de l'Université de Paris Val-de-Marne (Sc 27, Faculté de Médecine) avec l'aide du CNRS et de l'INSERM. Nous remercions vivement le Professeur R. Martoja pour sa tutelle obligeante à la microsonde.

stade extrêmement précoce dans la même situation (correspondant à une douzième soie de la rangée,  $n + 1$  si nous désignons par  $n$  la dernière soie fonctionnelle apparue et  $n-10$  la plus ancienne).

La chronologie d'apparition des soies dans la rangée, confirmée par cette dernière observation, est conforme à la succession indiquée par Bobin, et l'observation de coupes sagittales sériées nous a permis de reconnaître la dégénérescence de la cellule basale, le chétoblaste, pour les 6 soies les plus âgées chez une *Petta* pourvue de 11 soies par rangée (plus une soie en formation). Les palées  $n-10$  à  $n-6$  présentent une région basale atrophiée, basophile à l'Azan par contraste avec l'ensemble de la pièce squelettique, en rapport avec un amarrage de tonofibrilles. A la base des palées  $n-4$  à  $n$ , le chétoblaste, cellule triangulaire en section, à gros noyau nucléolé, témoigne de la possibilité d'une croissance poursuivie.

Les soies des deux extrémités d'une rangée (les plus âgées comme les plus jeunes) sont plus superficielles dans leur enracinement que les centrales et, en même temps, plus courtes, la plus longue et la plus profondément enfoncée dans le bulbe sétigère correspondant au rang  $n-4$  pour une rangée de 11 soies. Les racines successives se disposent donc sur une ligne parabolique plus symétrique chez *Petta* que chez *Lagis* où les soies les plus jeunes se décalent rapidement vers l'extérieur. Le diamètre des soies évolue rapidement : les trois ou quatre plus âgées sont grêles, les suivantes beaucoup plus épaisses (diamètre double, en section elliptique  $250 \mu\text{m}-120 \mu\text{m}$  pour une soie  $n-2$ ). Le montage *in toto* d'un bulbe sétigère fait apparaître l'obliquité de la ligne d'extrusion des soies à l'extérieur du corps de l'animal, par rapport à un plan de section transversal, de même qu'il souligne l'hétérogénéité de constitution des soies (Fig. 1A). Si les bases sont translucides, la matière plus élaborée, de structure fibrillaire, marque dans sa partie corticale externe une opacification nette. Aussi bien chez *Lagis* que chez *Petta*, cette condensation particulière intervient plus ou moins bas le long de la hampe : très haut pour les soies âgées, plus près de la racine pour les soies jeunes, avec un maximum d'extension pour la soie  $n-3$ . Ainsi, compte tenu de l'apparition successive des soies, du décalage des niveaux d'enracinement et de l'importance variable de ce processus de condensation, une coupe transversale ou frontale de l'animal ne peut être interprétée comme présentant une série simple d'étapes de maturation de la soie. Il n'est enfin pas évident que les soies âgées grêles aient la même composition que les robustes soies jeunes.

Sur montages *in toto* et même à l'observation sur le vivant, les palées de *Petta* présentent dans leur partie extérieure au corps de l'animal, à leur surface interne surtout, un dépôt superficiel noirâtre qui évoque leur environnement vaseux, mais qui reste très adhérent.

#### Données succinctes sur l'ultrastructure de la soie et des tissus voisins (Fig. 1B)

Ont été retenues, d'une étude qui doit encore être complétée par l'examen précis des sites d'élaboration du matériel constitutif de la soie, les seules données qui peuvent aider à une meilleure

compréhension de l'architecture de cette dernière et de son insertion dans le bulbe, pour éclairer certains résultats histochimiques.

Les images obtenues confirment que les soies palées de *Petta* sont des baguettes squelettiques extracellulaires conformes dans leur structure aux descriptions de Bouligand (1966-67), Orrhage (1970) et de Gustus-O'Clair et Cloney (1973-74) concernant d'autres Polychètes. Le plan initial est celui d'un faisceau de tubes parallèles plus

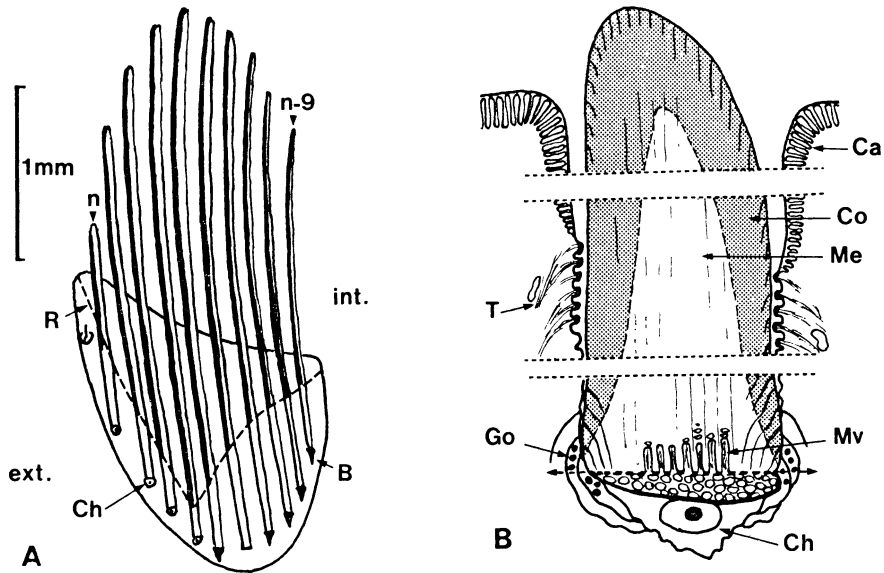


FIG. 1

A - Représentation schématique de la rame droite de palées et du bulbe sétigère. B : base atrophiée des soies âgées, Ch : chétoblaste à la racine des dernières soies apparues, n : dernière soie sortie, R : ligne limitante du renforcement de la face externe des soies.

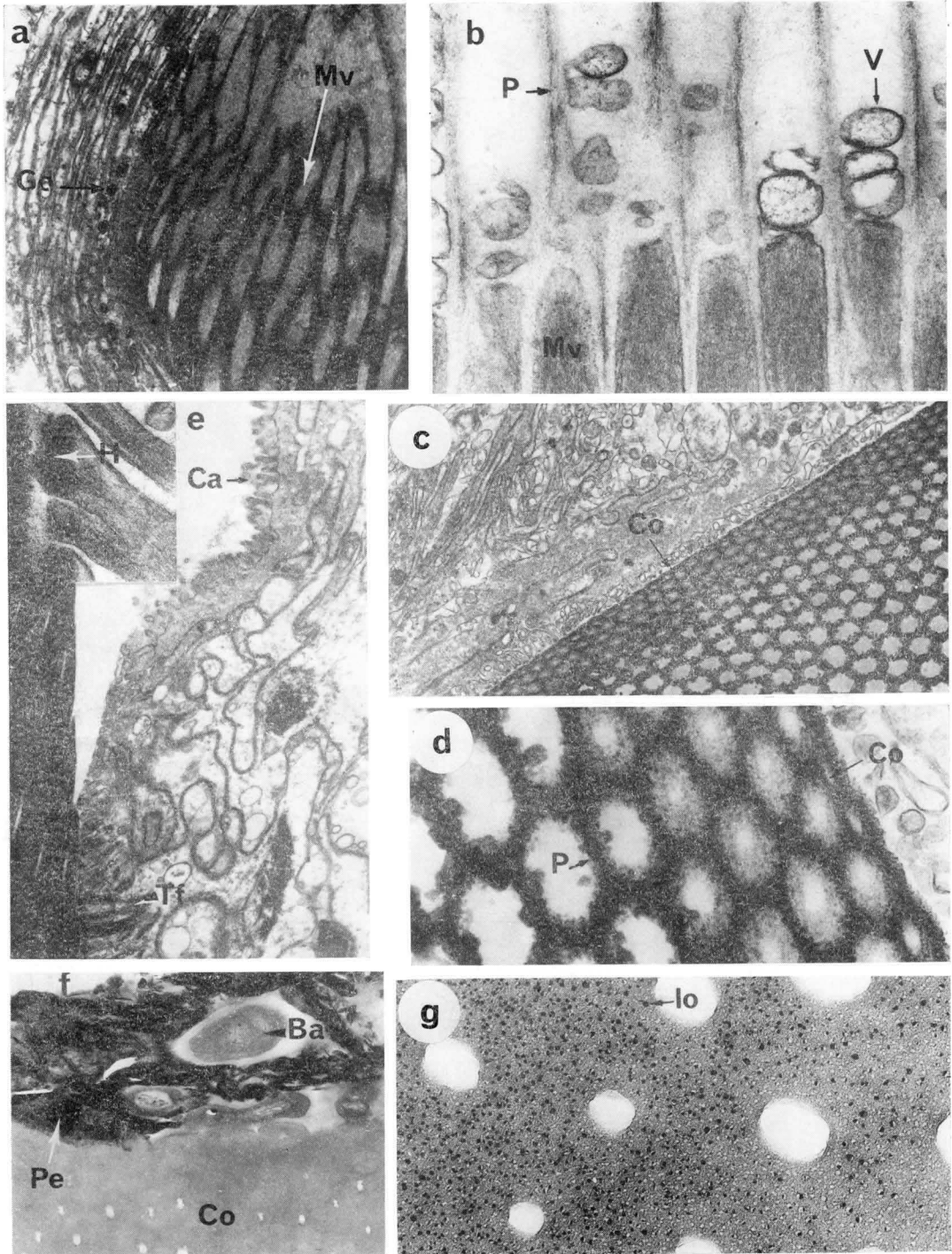
B - Représentation schématique d'une palée d'après la microscopie électronique. Ca : cuticule annélidienne collagénique, Ch : chétoblaste, Co : cortex, Go : grains osmiophiles des cellules latérales profondes « de la gaine », Me : medulla, Mv : microvillosités, T : paquets de tonofilaments en rapport avec les hémidesmosomes adhésifs.

ou moins oblitérés, unités cylindriques enracinées sur un plateau de micro-villosités spéciales dépendant du chétoblaste (Planche Ib). Le diamètre de ces tubes ( $0,5 \mu\text{m}$  chez *Petta*) est délimité à l'origine par celui des microvillosités à armature filamenteuse qui se prolongent plus ou moins loin dans leur canal central; hautes au moins de  $5 \mu\text{m}$ , ces dernières peuvent s'y prolonger par une série de vésicules résiduelles. Le diamètre de ces unités cylindriques parallèles est réduit à la périphérie ou *cortex* de la soie, mais trois considérations concourent à expliquer cette disposition : la croissance en épaisseur se fait par adjonction de nouvelles microvillosités périphériques, les tubes s'amincissent à leur extrémité distale jusqu'à une pointe effilée oblique par rapport à l'axe de la baguette (l'ensemble des pointes juxtaposées définit alors la surface de cette dernière), enfin la lumière des tubes est progressivement comblée vers leur extrémité,

pour devenir presque virtuelle. Les cloisons inter-microvilleuses qui définissent à l'origine les parois communes aux tubes juxtaposés sont constituées d'un matériau fibrillaire longitudinal, graduellement renforcé *intérieurement* par une matière dense aux électrons. On peut penser que cette trame primitive est de nature chitineuse, et la considérer comme une production externe (glycocalyx ?) des microvillosités du chétoblaste. Chez *Petta*, cette organisation fondamentale s'observe bien sur coupe transversale des palées internes, les plus âgées et les plus grêles (Planche Ic) : le colmatage incomplet des tubes périphériques caractérise leur cortex, tandis que la lumière des tubes de la médulla présente des inclusions globuleuses irrégulières, peut-être abandonnées par la rétraction progressive des microvillosités (Planche Id). Les palées externes (n à n-7), de plus grand diamètre, ont un cortex plus épais, surtout vers l'extérieur de l'animal. La lumière des canaux internes se rétrécit jusqu'à devenir presque inexistante (0,5  $\mu\text{m}$ ) et les parois initiales fibreuses se fondent et disparaissent dans une matière homogène. Au sein de cette dernière se matérialisent progressivement de minuscules inclusions (Planche Ig) : ponctuations plus claires réparties régulièrement, ponctuations opaques aux électrons (osmiophiles) réparties électivement dans le cortex, surtout à la face externe, des soies les plus jeunes (n à n-7). Sur coupes longitudinales, les inclusions osmiophiles apparaissent non pas globuleuses (50 à 100 Å) mais étirées (300 à 700 Å).

Les points originaux de ces observations par rapport à celles de Bouligand et de Gustus et Cloney par exemple (qui ne traitent il est vrai que de soies larvaires) concernent l'intégration de la composante fibreuse originelle dans une matière corticale homogène (protéique) et l'individualisation dans cette dernière d'une phase osmiophile au niveau de soies (et de régions de celles-ci) que nous verrons concernées électivement par la présence de tyrosine halogénée. La différence de composition des palées jeunes et âgées est en somme matérialisée par leur différence d'aspect au niveau ultrastructural. Le problème de l'incorporation d'une composante complémentaire aux minces parois fibreuses (chitineuses ?) des tubes est difficile : nous n'avons pu observer comme Gustus et Cloney l'apport d'une substance externe à l'extrémité des microvillosités et des tubes qui les prolongent, à partir des cellules latérales les plus profondes (« de la gaine »), pour former ce qu'ils définissent comme l'émail. Telle que nous l'avons observée, la situation interne du matériel de colmatage par rapport à la trame initiale implique au moins une certaine perméabilité de cette dernière. Les processus de consolidation doivent être précoces dans l'ontogenèse de la soie et régionalement proches de la zone de croissance microvilleuse du chétoblaste.

Les tissus périphériques à la pièce squelettique comportent ce dernier et la gaine de cellules latérales, profondes ou superficielles. Chez les animaux adultes, le chétoblaste est régressé à la base d'une bonne partie des soies, même si le plateau de microvillosités renforcées témoigne encore de son intervention. Lorsqu'il est encore actif, le cytoplasme sous-jacent est riche en petites mitochondries. Les cellules voisines du chétoblaste, nombreuses et étroites, appliquées aux microvillosités les plus périphériques, présentent localement des granulations osmiophiles arrondies de produit de sécrétion (Planche

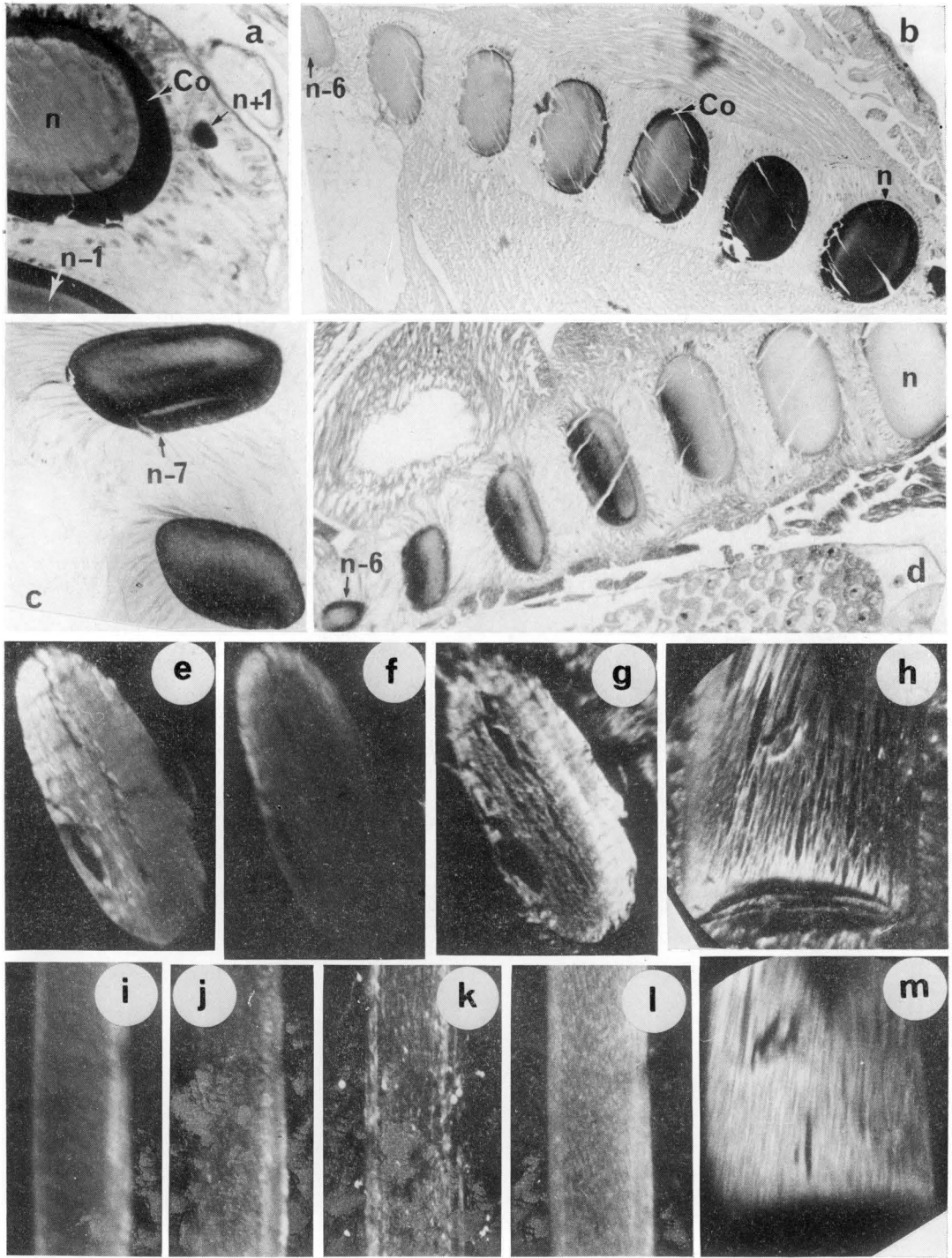


J. VOVELLE, M. GRASSET et M. TRUCHET

PLANCHE I

Images ultrastructurales de la palée.

a : bord de la racine; b : détail des microvillosités; c : coupe transversale de la soie n-9; d : détail du cortex de C; e : coupe longitudinale d'une palée au niveau de la zone d'extrusion, en encart : détail de l'hémidesmosome; f : gangue exogène (fixation glutaraldéhyde seul); g : coupe transversale du cortex de la soie n-1.  
 abréviations. Les mêmes que dans la figure 1, et Ba : bactéries épiphytes, H : hémidesmosome, Io : inclusions osmiophiles, P : parois fibreuses des tubes, Pe : pèlites, V : vésicules résiduelles.  
 (Grossissements : a et c  $\times 200$ , b et d  $\times 75$ , e à m  $\times 120$ .)



J. VOVELLE, M. GRASSET et M. TRUCHET

Ia). Plus haut, le long de la colonne de la soie, l'apex des cellules latérales se différencie en microvillosités aplaties à leur extrémité pour se terminer par un hémidesmosome, d'importants paquets de tonoflaments en rapport avec l'ensemble de ces derniers s'enracinent dans le cytoplasme des cellules hautes et étroites. L'extrusion de la soie à l'extérieur du corps de l'animal correspond à un changement brutal d'aspect des cellules « de la gaine » : les hémidesmosomes disparaissent, une cuticule rudimentaire se précise entre les microvillosités apicales, elle se renforce localement d'une épicuticule striée avant de s'épaissir et de rejoindre la haute cuticule collagénique du reste du corps (Planche Ie). La partie profonde de la soie adhère donc intimement aux tissus périphériques, ce qui rend douteux qu'aucun élément exogène participe à son renforcement. Juste après son extrusion, sa surface apparaît recouverte de plaquettes minérales, de type péritique, agglomérées autour de bactéries épiphytes : c'est la gangue déjà reconnue de l'échelle photonique (Planche If).

### Résultats de l'étude histochimique

L'étude histochimique, ici présentée comme préalable, a été en fait influencée et dirigée par les résultats de l'examen histophysique que l'hypothèse initiale imposait. Les halogènes, détectés à la microsonde, ont suggéré la recherche de la tyrosine, compte tenu entre autres des résultats présentés par Hunt *et al.* concernant les tyrosines halogénées des pièces squelettiques de Mollusques. Valorisant la présence du calcium, la pratique de l'analyseur ionique a pour sa part conduit à un retour fructueux aux méthodes classiques de détection de ce cation.

#### — Polysaccharides.

Ils concernent la matrice chitineuse de la soie. Ont été utilisées la méthode de l'Acide Periodique Schiff (APS) dont Runham a, sur d'autres matériaux, démontré le rapport avec la chitine et le masquage fréquent par les protéines tannées (1961), et la réaction signalétique au Rouge Congo, d'une spécificité discutable pour d'autres motifs, vulnérable d'ailleurs aux mêmes masquages.

- La réaction à l'APS est négative sur l'ensemble des soies (de même sur les soies de *Lagis koreni*).

### PLANCHE II

#### Histochimie et microanalyseur

a : réaction argentaffine sur les soies n et n-1 (noter n+1 en formation); b : réaction de Morel et Sisley; c : réaction au GBHA sur les soies n-7 et n-8. d : réaction de Stoeltzner; e, f et g : images à l'analyseur ionique des éléments  $\text{Br}^-$  ( $2,5 \cdot 10^{-15}$  A, 3 mn),  $\text{I}^-$  ( $3 \cdot 10^{-17}$  A, 20 mn) et  $\text{Ca}^+$  ( $4 \cdot 10^{-14}$  A, 10 s) sur une petite soie âgée (n-8); h et m : idem sur une racine de grosse soie moyenne pour les éléments  $\text{Ca}^+$  ( $10^{-14}$  A, 20 s) et  $\text{Br}^-$  ( $8 \cdot 10^{-14}$  A, 2 mn 30); i, j, k et l : idem pour la région apicale d'une soie moyenne, pour moyenne, pour  $\text{Br}^-$  ( $2 \cdot 10^{-15}$  A, 3 mn),  $\text{I}^-$  ( $7 \cdot 10^{-16}$  A, 8 mn),  $\text{Ca}^+$  ( $8 \cdot 10^{-15}$  A, 20 s) et  $\text{CN}^-$  ( $5 \cdot 10^{-14}$  A, 4 s). (Entre parenthèses : intensité d'émission et temps de pose.)

Mêmes abréviations que Fig. 1 et Planche I.

(Grossissements : a  $\times$  12 500, b  $\times$  35 000, c  $\times$  6 800, d  $\times$  33 000, e  $\times$  10 000, encart  $\times$  50 000, f  $\times$  16 000, g  $\times$  66 000.)

- La réaction au Rouge Congo est négative sur l'ensemble de la hampe des grandes soies de *Petta*, sauf peut-être une légère teinte à la base des soies assez jeunes. Cette indication, qu'on retrouve plus nettement chez *Lagis*, se comprend mieux en considérant les réactions *in toto* pratiquées chez cette dernière espèce. La réponse positive au Rouge Congo ne concerne alors, modérément, que la partie basale des soies : sur un assez long parcours pour les 2 ou 3 soies grêles les plus âgées, sur un parcours plus restreint pour les soies les plus jeunes. Seule la soie n, en formation, présente une réponse franche et intense. Il faut admettre une grande précocité du masquage, d'ailleurs évoqué par Jeuniaux, de la chitine par des protéines associées, notamment en ce qui concerne les grandes soies de la partie moyenne de la série. Cette interprétation est sans doute valable pour *Petta*.

— *Protéines, composantes du tannage quinonique.*

- Tryptophane. Pour tenir compte de l'unique indication positive signalée par Brown (cité *in* Picken et Lotmar, 1950, concernant *Hermione* sur analyses chromatographiques), nous avons pratiqué la méthode de Glenner sur des coupes frontales obliques des soies. La réponse est négative à tous les niveaux et la présence de tryptophane semble écartée.

- Tyrosine. Elle a été mise en évidence par les deux réactions de Millon et de Morel et Sisley dont la bonne spécificité est reconnue. Les deux réponses, très positives concernent surtout le cortex des soies, et plus précisément des soies jeunes (n à n-5 ou n-6) sur coupes frontales. Cela est cohérent pour le Millon, du moins avec les données de Goodrich 1896, Dennel 1950, Picken et Lotmar citant Brown 1950, Lehy 1966, Michel et Vovelle 1974, Le Bail, n.p. 1971, sur diverses espèces d'Annélides. Les soies âgées, les plus minces, sont négatives ou marquent seulement une réponse limitée sur le cortex externe. Progressivement, l'anneau cortical se complète vers la face interne et la plage médullaire de la coupe est concernée dans sa totalité, avec un renforcement du côté externe (Planche II b). Cette homogénéisation de la réponse se marque surtout à la réaction de Morel et Sisley; la réaction de Millon est presque électivement corticale, et l'on peut se demander si le principe même de la première méthode n'est pas en cause, par son recours terminal à un second couplage qui peut impliquer davantage de substances réagissantes que le monophénol tyrosine. La soie n, la plus externe en formation, présente une réponse incomplète qui souligne son état inachevé.

— *Composés réducteurs.*

La réaction argentaffine, positive après un traitement long, donne sur les mêmes coupes des résultats voisins de ceux précédemment évoqués (Planche IIa). La strate corticale superficielle, bien délimitée, est juste esquissée dans sa partie externe pour les soies âgées, elle se complète et se renforce à partir des soies n-5 ou n-4. La région médullaire réagit alors progressivement vers l'extérieur, dans sa partie externe, en laissant moins réactif un liseré sous-cortical. La réaction médullaire externe, brunâtre, se différencie par son aspect et son intensité de celle du cortex. On sait que la réaction argentaffine a été

elle aussi reconnue comme indicatrice d'un des éléments du tannage quinonique des soies chez divers Annélides (Dennel, Picken et Lotmar, Michel et Vovelle, Lehy, Le Bail), mais on l'interprète en général en fonction de la présence d'un orthodiphénol réducteur : l'association de ce dernier avec la tyrosine est telle chez *Petta* que les images des deux composés ne sont pas rigoureusement superposables (réaction argentaffine plus corticale).

— *La réaction au vert malachite*, d'interprétation plus incertaine, mais utilisée depuis Brown et Smyth (1954) pour signaler les protéines impliquées dans le tannage quinonique, recoupe partiellement les indications précédentes en soulignant la complexité des substances concernées. Sa réponse est positive là encore sur les soies les plus jeunes (de n à n-5 ou n-6), à peine esquissée sur la partie externe des soies grêles âgées, mais elle se marque surtout dans la région sous-corticale et médullaire externe, laissant négative la strate la plus superficielle qui répond si vivement à la réaction argentaffine et au Millon.

L'ensemble de ces réactions confirme l'importance dans la constitution de la soie d'une protéine aromatique, riche en tyrosine, plus abondante dans les soies jeunes que dans les soies âgées et plus dense dans la région corticale, surtout externe, ce que confirment des coupes sagittales présentant des sections longitudinales en profil de soies moyennes.

#### *Eléments minéraux.*

- Calcium. Des résultats positifs sont obtenus aussi bien par la méthode de substitution au cobalt de Stoeltzner que par les deux méthodes aux laques, à l'alizarine et au GBHA selon Kashiwa *et al.*. Si l'on met à part les images fournies par l'alizarine, plus grossières et moins contrastées que celles des deux autres méthodes, la superposition des réponses fournies par des séries de sections subtransversales en coupe frontale de l'animal est satisfaisante : il semble simplement que le GBHA, plus sensible, fournisse des sites plus étendus et plus nombreux que la méthode de Stoeltzner (Planche IIc). Les soies concernées sont les plus âgées, d'ordre n-8 à n-5 pour une série de 8 soies, avec une réponse maximale en n-7. Les soies les plus jeunes ne réagissent pas positivement au GBHA, et répondent discrètement au Stoeltzner dans un mince liseré cortical et dans la région médullo-interne (Planche II d). Pour les soies les plus riches en calcium, les coupes transversales présentent un territoire réactif complémentaire de celui qui contient de la tyrosine dans les soies jeunes : le métal apparaît dans la région corticale et subcorticale interne et l'anneau de sa répartition se referme en position subcorticale externe pour les soies les plus minéralisées (n-7, n-6). Dans les conditions optimales, on observe même au Stoeltzner que la zone médullaire interne présente de fines ponctuations positives correspondant à une partie des canalicules microvillositaires (leur disposition rappelle les "basal cell processes" observés par Orrhage chez *Pectinaria belgica*). Une section longitudinale en profil d'une soie moyenne (n-5) sur coupe sagittale indique la localisation périphérique stricte de calcium, avec une plus grande épaisseur à la face interne. Dans la région basale

radiculaire, la réaction plus diffuse s'élargit en biseau jusqu'au plateau de microvillosités.

Il semble donc qu'entre l'imprégnation des soies par une protéine tannable complexe et leur biominéralisation, une complémentarité à la fois topographique et chronologique existe. Les soies âgées, pauvres en protéines, sont riches en calcium, les soies jeunes, riches en protéines sont pauvres en calcium. La face externe des soies est renforcée par la protéine, la face interne par le métal.

- Le fer. La méthode de Perls, de détection du fer ferrique, ne met le métal en évidence à aucun niveau des soies quel que soit leur âge, non plus que sur les sections longitudinales. Une réponse positive nette n'apparaît au Bleu de Prusse que sur des éléments figurés exogènes incorporés à la gangue périphérique déjà signalée.

Pour la comparaison, on a pratiqué la méthode de Perls sur deux autres espèces d'Amphictenidae : *Pectinaria auricoma* provenant des mêmes gisements suédois et *Lagis koreni* provenant de Normandie (outre deux individus juvéniles de cette espèce déjà étudiés et récoltés à Helsingor en 1971 — diamètre à l'ouverture du tube inférieur à 1 mm). *Pectinaria auricoma* présente, sur coupes transversales des soies à l'extrusion, dans la zone corticale, une réponse infime ou même douteuse. En effet, la zone faiblement réagissante est cernée par un manchon de matériel exogène beaucoup plus homogène et riche en fer que ne l'était la gangue des soies de *Petta* (cette différence d'aspect pouvant provenir du contexte écologique des deux espèces). Par contre, les soies de *Lagis koreni*, qui feront l'objet d'une étude détaillée ultérieure, présentent des sites réactifs liés à la matière même de la soie. Les formations réagissantes chez l'adulte sont les soies les plus âgées et les plus grêles (n-7 à n-10) au niveau du cortex et de la zone subcorticale interne. Les stades juvéniles présentent des images comparables au niveau des 3 ou 4 soies les plus âgées, encore que les autres restent cernées d'un liseré réagissant. A la façon de ce qu'on a pu observer chez *Petta* au Stoeltzner, une fine ponctuation apparaît même dans une partie des canalicules microvilleux de la zone corticale interne. Le rapprochement des sites positifs pour le fer chez *Lagis* et pour le calcium chez *Petta* mérite d'être souligné.

## RÉSULTATS DE L'ÉTUDE A LA MICROSONDE

Une première série de mesures a concerné des coupes frontales présentant, dans les deux bulbes sectionnés symétriquement, des séries de soies en coupe subtransversale, de plus en plus âgées vers le plan de symétrie (l'obliquité accusée des deux rames de soies palées par rapport à l'axe du corps explique qu'on obtienne une telle section selon ce plan de coupe). Sans sous-estimer l'intérêt de l'évolution des éléments mesurés sur cette série, on rappellera que, compte tenu de l'insertion des racines selon une ligne parabolique, les niveaux comparés ne sont pas équivalents d'une soie à l'autre, les plus proches du chétoblaste se trouvant aux deux extrémités de l'aligne-

ment. Cet examen initial a mis en vedette deux éléments, I et Br, dans leur évolution et leur association. La figure 2 en donne une appréciation significative qu'il faut nuancer. L'expression en valeurs moyennes masque en effet la réalité d'une répartition inégale des deux halogènes à la périphérie ou du côté externe ou interne de la soie. Or, dans le détail des mesures, cette inégalité suggère de façon plus accusée la différence de localisation de I et Br (ainsi, par exemple, pour la soie n-1, I est présent à la face externe avec 80 ch/s, à la face interne avec 50 ch/s et, pour la soie n-7, Br répond à la face externe avec 20 ch/s, à la face interne avec 40 ch/s). De même, les valeurs maximales des réponses sont atténuées par les moyennes : elles sont pour l'iode de plus de 80 ch/s dans le cortex externe de la soie n-1 et pour le brome de 65 ch/s dans le cortex interne de la soie n-9.

L'examen d'une coupe frontale présentant des sections subtransversales de séries de soies après sortie hors du corps de l'animal a nécessité une précaution supplémentaire dans la localisation de la mesure. En effet, chaque soie est intimement engainée par le dépôt de matériel exogène déjà mentionné. La matière indiscutablement endogène présente localement des condensations d'I et Br plus fortes que les sections au niveau des racines :

Br = 30 chocs/s en n-7

80 chocs/s en n-3

I = 60 chocs/s en n-6

de 100 à 300 chocs/s entre n-2 et n-5 (moy. 190 chocs/s).

Les valeurs obtenues excluent entre autres que le brome disparaisse vers la pointe au profit de l'iode. Deux métaux apparaissent, que la coupe profonde avait négligés : fer très discret (5 chocs/s) et calcium localisé corticalement (40 chocs/s), alors que la médulla en présente une réponse plus banale (15 chocs/s).

Par comparaison, la gangue révèle les éléments minéraux de la vase (Fe : 220, Ca : 180, K : 120, Al : 200, Si : 700 chocs/s, pour citer les plus abondants).

Des coupes sagittales et frontales rectifiées ont permis d'analyser à la sonde la section longitudinale d'une même soie depuis sa racine jusqu'à sa pointe. Ont été examinées une soie du rang n-4 ou n-3 et ses voisines immédiates. Le plan de coupe, perpendiculaire à l'aplatissement de la soie, permet de faire ressortir la dissymétrie de répartition du matériel halogène et minéralisé entre les parties externe et interne.

Les résultats obtenus ont permis de confirmer que les halogènes, et surtout l'iode, ont une condensation corticale nette, surtout externe.

L'abondance du brome et de l'iode augmente de la racine à la pointe. Le brome, qui manifeste même une légère réponse positive dans la région du chéto-blaste où l'iode est absent, est présent en quantités notables à la base de la racine de la soie. Il se stabilise rapidement jusqu'au point d'extrusion à des valeurs moyennes (entre 20 et 50 chocs/s). A l'extérieur de l'animal, la condensation de la matière de la soie, qu'on enregistre parallèlement pour l'iode, ne le concerne que modérément (augmentation à 90-110 chocs). L'iode

est détectable plus haut le long de la hampe; il passe de 10 à 50-60 chocs/s entre le quart et la moitié de la racine, pour atteindre, dès avant l'extrusion, des valeurs plus élevées (100-120 chocs) et à l'extérieur de l'animal, présenter des valeurs encore plus fortes (140 à 300 chocs/s). Rappelons pour la comparaison que la colloïde des thyroïdes d'Urodèles au maximum d'activité (Hourdry, communication personnelle) n'atteint que 120 chocs/s.

## MICROSONDE MS 46

(RESULTATS EN CHOCS/SECONDE, EN EXPOSANT : NOMBRE DE MESURES UTILISÉES POUR LA MOYENNE)

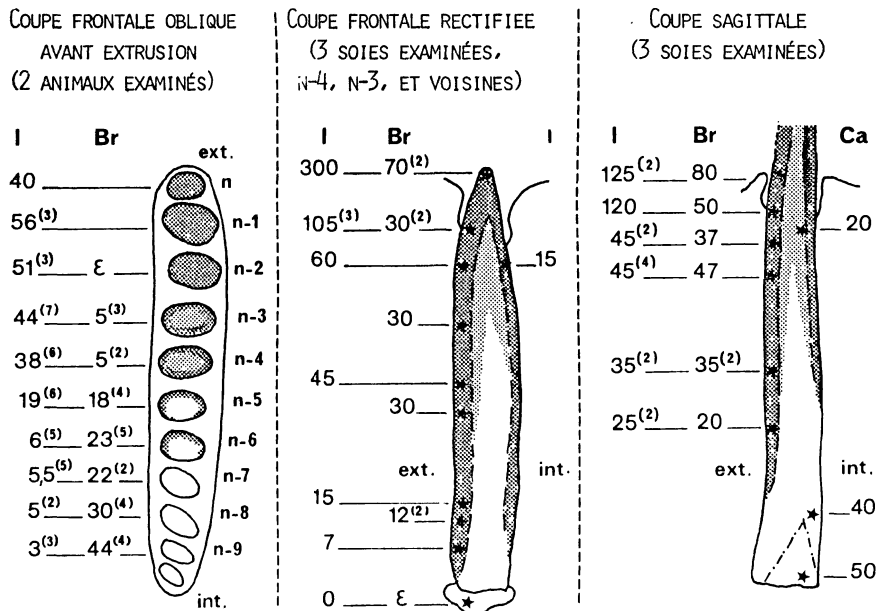


FIG. 2

Valeurs obtenues à la microsonde.

La répartition du calcium est remarquable sur ces coupes de soies « en profil ». Particulièrement concentré à la base de la racine (50 chocs/s) il garde ensuite une condensation notable (40 chocs/s, dans le tiers inférieur), en biseau de plus en plus étroit dans la région corticale interne. Le fer n'est pas totalement absent de la région corticale moyenne (5 à 10 ch/s).

On a analysé à la microsonde, pour la comparaison, une coupe frontale de *Lagis* (= *Pectinaria*) *koreni*, à un niveau où les soies en section subtransversale sont externes au corps de l'animal. Cet examen méritera confirmation, mais il recoupe et enrichit déjà les résultats obtenus pour *Petta*. Iode et brome sont présents avec des teneurs et des répartitions peu différentes de celles que *Petta* a pu fournir dans les mêmes conditions. Les réponses maximales de l'iode sont sur les soies externes (90 ch/s), celles du brome sur les internes (40 ch/s). Le calcium se manifeste plus nettement que chez *Petta* au

même niveau avec des valeurs maximales de 50 à 60 ch/s sur les soies internes. Les mêmes soies internes présentent une réponse du fer beaucoup plus spectaculaire que pour l'espèce de référence, pouvant monter jusqu'à 150 et même 400 ch/s. Ces résultats, qui ne sont pas imputables à une gangue minérale composite et qui sont en accord avec l'histochimie, démarquent spécifiquement *Lagis* par rapport à *Petta*. Remarquons à nouveau que, chez *Lagis*, l'imprégnation ferrique semble concerner les mêmes soies âgées au niveau desquelles le calcium est abondant chez les deux espèces.

### RÉSULTATS DE L'ÉTUDE A L'ANALYSEUR IONIQUE

Les deux présentations de la soie utilisées pour l'étude à la microsonde ont été retenues pour l'examen à l'analyseur ionique : sections transversales sur coupes frontales de l'animal et sections longitudinales « de profil » sur coupes sagittales; des coupes voisines ont ainsi pu être comparées et le recours à des coupes semi-fines après inclusion à l'araldite a confirmé les résultats de cette approche dans les deux plans. L'analyseur ionique a permis, par l'analyse des spectres, une confirmation de la liste des éléments révélés par l'autre méthode, qu'il complète sur des points mineurs (présence de chlore et, discrètement, d'alcalino-terreux accompagnateurs de calcium). Les images obtenues ont surtout permis une localisation beaucoup plus précise d'iode, de brome et de calcium.

La réponse des halogènes, Br et I, est spectaculaire sur les spectres d'émission d'ions négatifs, encore que l'iode soit moins mis en vedette par cette approche qu'avec la microsonde. Si ces spectres soulignent l'importance du brome par l'indication du petit pic secondaire BrC (91-93), les spectres d'émission d'ions positifs présentent régulièrement des pics notables BrCa (119-121), ICa (167, plus discret) et presque toujours Br<sup>+</sup> (79-81) et I<sup>+</sup> (127). La présence de Cl (ignoré par la microsonde) est régulière, parfois concurrente de celle de Br.

La réponse du calcium est nette et sans exception, confirmée par les pics satellites habituels (CaCN : 66) ou d'autres plus exceptionnels (BrCa et ICa). Le magnésium apparaît avec une moindre importance sur plusieurs spectres et l'on retient l'apparition occasionnelle de baryum et de strontium. La présence de fer est indiquée par l'examen du rapport des pics 56-57 et la présence corrélative du petit pic FeOH; elle a été confirmée par un spectre HRM à la masse 56<sup>+</sup>.

L'évolution topographique de la répartition des éléments a été suivie d'après les images obtenues, mais aussi en tenant compte de l'intensité d'émission des divers territoires photographiés ou analysés.

Contrairement à l'indication suggérée par l'analyse à la microsonde, Br et I se retrouvent généralement dans les mêmes sites (Planche IIe, f), l'apparence de leur complémentarité pouvant parvenir d'une chronologie différente de leur incorporation à la soie. Les intensités d'émission de Br (entre  $0,5 \cdot 10^{-15}$  et  $3 \cdot 10^{-15}$ ) sont assez stables quel que soit l'âge de la soie ou la hauteur sur la hampe, tandis que

les intensités d'émission de I varient considérablement d'une soie à l'autre ( $10^{-17}$  pour n-6;  $1,5 \cdot 10^{-15}$  pour n-1) et de la racine à la pointe d'une soie moyenne (de  $8 \cdot 10^{-17}$  à  $6 \cdot 10^{-16}$ ). Ces chiffres sont difficilement comparables à ceux que fournit l'analyse par spectrographie des rayons X; leur discordance tient vraisemblablement d'abord à la différence des prises d'essai : ponctuelle avec la microsonde, très étendue avec l'analyseur, il en résulte un effet de moyenne. Par ailleurs peut intervenir une variation de la composition chimique des composés halogénés le long de la hampe, entraînant une modification des rendements ioniques. Aussi discrète qu'elle soit, la localisation de l'iode à la racine est la même que celle du brome, déjà importante. Vers la pointe, la répartition des deux halogènes est plus corticale et souligne électivement la région externe de la soie (Planche III, f). Dans la mesure où elle concerne, à un moindre degré, une partie de la plage centrale externe, on la reconnaît superposable par exemple à la répartition de la tyrosine par la technique de Morel et Sisley. Par comparaison, la répartition du chlore est différente, plus généralisée et sans condensation corticale : son implication dans la constitution des protéines sclérotisées n'est pas du même ordre. Si l'augmentation de la teneur de l'iode de la racine jusqu'à la pointe (par exemple en comparaison des images parallèles C1 ou C4) est aussi nette que la précocité d'établissement et la stabilité de celle du brome, les deux éléments apparaissent pourtant juste au-dessus du plateau de microvillosités initiales, sans qu'on puisse détecter de précurseurs du dépôt au niveau du chétoblaste et des cellules voisines (Planche II m). On peut supposer qu'au niveau des soies moyennes chez l'animal adulte, ce processus est déjà achevé.

La répartition du calcium est complémentaire de celle des deux halogènes majeurs même si, à l'origine, au niveau de la racine, leurs images sont homogènes et superposables. Le plateau de microvillosités du chétoblaste est identifiable par sa striation sur les images de cet élément, de même que la cellule sous-jacente, et les cellules périphériques de la soie sur tout son trajet (notamment les cellules à tonofilaments) (Planche II h). A la mi-longueur de la racine, la disposition en biseau du Ca se précise et l'élément se concentre sur la face interne de la soie. Sa répartition, assez proche de celle de K par exemple, est pourtant plus localisée, et la corrélation des images est également nette entre le calcium et le carbone organique. L'importance du calcium est décroissante de la racine vers la pointe et des soies âgées vers les soies jeunes. Dans les soies âgées, le calcium est plus diffus et plus abondant que dans les soies moyennes et jeunes où il souligne le cortex interne d'un liseré bien délimité : ces images sont conformes à celles obtenues par l'histochimie.

## DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les résultats les plus importants de cette prospection ont été apportés par les méthodes de microanalyse. La microsonde de Castaing a fait apparaître la composante halogénée des soies : des renseigne-

ments isolés signalaient la présence d'iode chez deux espèces différentes de Polychètes; elle se confirme chez *Petta* comme chez *Lagis* mais en association avec le brome. Cette rencontre brome-iode n'est pas exceptionnelle et, chez les Invertébrés inférieurs (Spongiaires et Cnidaires) où des composés halogénés ont été impliqués dans la squelettogénèse, la coexistence de dibromo- et de diiodotyrosine dans la spongine a été démontrée de longue date par Roche *et al.* (1952). Cet auteur a insisté sur la fixation de l'iode et du brome en corrélation avec la teneur en tyrosine, et cette même rencontre a été analysée en détail par Hunt *et al.* (1971-72) à propos de l'opercule du Buccin, où les deux halogènes associés à la tyrosine sont cette fois le brome et le chlore. Lorsque ce dernier auteur donne une évaluation globale du rapport monochlorotyrosine-monobromomonochlorotyrosine dans l'opercule, nos méthodes de microanalyse suggèrent dans la soie de *Petta* que la répartition des composés bromés et iodés n'est pas exactement superposable; le brome du moins, plus précocement apparu à la racine de la soie, garde une teneur stationnaire, tandis que l'iode augmente considérablement vers la pointe. Il est peu probable que ces éléments proviennent du chétoblaste mais plutôt des cellules immédiatement voisines dans la genèse précoce de la pièce squelettique. La présence moins significativement localisée du chlore (et de traces de fer) souligne pourtant le processus de condensation généralisé des halogènes par cette dernière. La topographie de la répartition de l'iode principalement est superposable à celle de la tyrosine identifiée dans la soie par l'histochimie : c'est une indication de la formule probable du composé d'addition, dont on sait (cf. Lison, Ganter et Jolles) que la liaison ne le rend pas réfractaire à la détection. La répartition de la tyrosine dans la soie apparaît en rapport avec celle d'autres substances intervenant dans un processus de tannage quinonique, notamment des composés réducteurs argentaffines (orthodiphénols ?). Cette indication est peut-être à mettre en rapport avec la présence d'halogènes, si l'on tient compte des hypothèses discutées par Hunt *et al.* (1971) à propos du Buccin, suivant lesquelles « l'halogénéation de la tyrosine... soit assisterait le tannage en le rendant plus réactif, soit en apparaîtrait comme une conséquence indirecte... ».

Dans le détail des résultats, une constatation s'impose : toutes les soies d'une même rangée de palées ne sont pas comparables dans leur composition chimique. Les premières apparues, celles qui sont plus simples dans leur structure, sont peu ou pas concernées par le développement d'un cortex renforcé de protéines halogénées. Par contre, dès leur base enracinée sur des microvillosités, leur trame chitineuse présente un enrichissement calcique notable, qui n'apparaît pas avec la même intensité dans les grosses soies plus tardives. Cette intervention du calcium, assurée par l'histochimie et par la microanalyse, comme élément de biominéralisation d'une pièce squelettique, apparaît complémentaire topographiquement et préalable ontogénétiquement de la sclérotisation par tannage avec implication de composés halogénés. Elle n'est pas insolite si l'on se rappelle la forte calcification des soies de certains Polychètes, comme l'*Amphinomidae Euphrosyne* (Bobin, 1948), ou même les indications, encore approximatives, de pourcentages pondéraux en certains métaux donnés par

George et Southward (1973) à l'aide de la microsonde, pour les soies du Sabellidae *Fabricia* (Ca : 0,1, Mg : 0,1, Fe : 0,2). Ces derniers auteurs proposent, eux aussi, quelques hypothèses sur le rôle des métaux détectés, en indiquant que « le fer peut intervenir comme un agent de liaison dans le tannage de la protéine » et que « les matrices qui ont une affinité pour le calcium peuvent aussi en avoir pour le fer ». La répartition du calcium chez *Petta* n'est pas complètement cohérente avec ces considérations : elle semble davantage liée à la trame organique (chitineuse ?) des formations les plus précoces, et exclue des zones sclérotisées plus tardives.

D'autres composantes de la soie ne peuvent être omises du bilan d'ensemble. La discrétion de la chitine est compréhensible; on sait que, si Jeuniaux évalue sa participation à 33 p. 100 dans les palées de *Pectinaria*, il a montré chez d'autres Polychètes qu'elle est pour plus de 97 p. 100 sous forme masquée. Le fer, dont la présence hypothétique avait justifié la recherche entreprise, n'est pas totalement absent et la microanalyse réussit mieux que l'histochemie à en signaler les traces. La reprise méthodique de l'examen d'Amphictenidae plus favorables pourra peut-être préciser à quel moment et à quel niveau de la formation de la soie il intervient.

Les autres problèmes encore non résolus par cette étude, outre le niveau du processus enzymatique du tannage, sont du ressort d'une approche cytologique et cytochimique à l'échelle ultrastructurale. Ainsi pour localiser les sites intracellulaires d'élaboration des divers matériaux constitutifs sera-t-il nécessaire de s'adresser à des formes jeunes, post-larvaires, d'Amphictenidae assez fréquents (de la même façon que Bouligand ou Gustus et Cloney l'ont fait pour décrire la morphogenèse des soies de Syllidiens ou de Néréidiens). On peut également espérer, grâce à l'hétérogénéité du matériau définitif, identifier par des méthodes biophysiques la nature des diverses inclusions que le microscope électronique y fait apparaître.

### Summary

The paleae setae of *Petta pusilla* (Polychaeta, Amphictenidae) were investigated by means of cytology, histochemistry and microanalysis. The bundle of hollow chitinous tubes which makes them up from the chaetoblast microvilli is obturated in the cortical area by a protein, rich in halogenated tyrosin (Br and I). The bromin content is more constant than the iodine one, which increases to the point. The thick external paleae are consolidated (mainly on their external side) by this matter, implicated probably in a tanning process, more than the calcium rich first ones to appear, the cation being next located at the basis and external side of setae. Iron is discreetly present.

### INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- BOBIN, G., 1944. — Morphogenèse des soies chez les Annélides Polychètes. *Ann. Inst. Océan.*, 22, pp. 355-366.
- BOBIN, G., 1948. — Histologie et cytologie des bulbes sétigères d'*Euprosyne foliosa* Audouin et M. Edwards (Annélide Polychète). *Arch. Zool. exp. gén.*, 85 (3), pp. 138-150.

- BOULIGAND, Y., 1966. — Les soies et les cellules associées chez deux Annélides Polychètes. *Z. für Zellforsch.*, 79, pp. 332-363.
- BROWN, C.H., 1950. — Quinone tanning in the animal kingdom. *Nature*, 164, p. 275.
- DENNEL, R., 1949. — Earthworm chaetae. *Nature*, 164, p. 370.
- FAUVEL, P., 1927. — Faune de France, Polychètes sédentaires. Lechevallier, Paris.
- GANTER, P. et JOLLES, G., 1969. — Histochimie. Gauthier-Villars, Paris.
- GEORGE, J.D. et SOUTHWARD, E.L., 1973. — A comparative study of the setae of Pogonophora and Polychaetous Annelida. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 53, pp. 403-424.
- GOODRICH, E.S., 1896. — Note on the cuticle and chaetae of Oligochaetae. *Quart. J. Micr. Sci.*, 39, pp. 39-65.
- GORBMAN, A., CLEMENTS, M. et O'BRIEN, R., 1954. — Utilization of radioiodine by Invertebrates, with special study of several Annelida and Mollusca. *J. exptl. Zool.*, 127, pp. 75-92.
- GUSTUS, R.M. et COLNEY, R.A., 1973. — Ultrastructure of the larval compound setae of the Polychaete *Nereis vexillosa* Grube. *J. Morphology*, 140 (3), pp. 355-366.
- HUNT, S. et BREUER, S.W., 1971. — Isolation of a new naturally occurring halogenated amino acid: Monochloromonobromotyrosine. *Biochem. Biophys. Acta.*, 252, pp. 401-404.
- JEUNIAUX, C., 1963. — Chitine et chitinolyse. Masson éd., Paris.
- LEHY, T., 1966. — Mise en évidence d'un système de tannage quinonique au niveau des soies chez *Sabellaria alveolata* (L.), Polychète sédentaire. *Ann. Histochem.*, 11, pp. 71-78.
- LISON, L., 1960. — Histochimie et Cytochimie animale. Gauthier-Villars, Paris.
- MICHEL, C. et VOVELLE, J., 1974. — Tannage quinonique des soies chez *Syllis cornuta* Rathke. *Bull. Soc. zool. France*, 99 (1), p. 175.
- O'CLAIR, R.M. et COLNEY, R.A., 1974. — Patterns of morphogenesis mediated by dynamic microvilli: Chaetogenesis in *Nereis vexillosa*. *Cell. Tiss. Res.*, 151, pp. 141-157.
- ORRHAGE, L., 1971. — Light and electron microscope studies of some annelid setae. *Acta zoologica*, 52, pp. 157-169.
- PICKEN, L.E.R. et LOTMAR, W., 1950. — Oriented protein in chitinous structures. *Nature*, 165, pp. 599-600.
- ROCHE, J., 1952. — Biochimie comparée des scléroprotéines iodées des Anthozoaires et des Spongiaires. *Experientia*, 8 (2), pp. 45-54.
- RUNHAM, N.W., 1961. — Investigations into the histochemistry of chitin. *J. Histochem. Cytochem.*, 9, pp. 87-91.
- SMYTH, J.D., 1954. — A technique for the histochemical demonstration of polyphe-noloxydase and its application to egg-shell formation in Helminths and byssus formation in *Mytilus*. *Quart. J. micr. Sci.*, 95, pp. 139-152.
- SWAN, E.F., 1950. — The calcarous tube secreting glands of the Serpulid Polychaetes. *J. Morphol.*, 86, pp. 285-314.
- TRUCHET, M. et VOVELLE, J., 1977. — Etude de la glande cémentaire d'un Polychète tubicole (*Pectinaria* (= *Lagis*) *koreni*) à l'aide de la microsonde électronique, du microanalyseur ionique et du microscope électronique à balayage. *Calcif. Tiss. Res.*, 24, pp. 231-238.
- VOVELLE, J., 1979. — Les glandes cémentaires de *Petta pusilla* Malmgren, Polychète tubicole Amphictenidae et leur sécrétion organominérale. *Arch. Zool. exp. gén.*, 120 (2), pp. 219-246.
- VOVELLE, J., 1982. — Structures et matériaux squelettogènes organiques et minéraux chez les Annélides et les Molluscs. *Bull. Soc., zool. France*, 107 (3), pp. 401-417.