



HAL
open science

ASPECTS CYCLIQUES DE LA MORPHOGENÈSE DE LA COQUILLE DE RISSOA PAR VA DA COSTA (GASTÉROPODE PROSOBRANCHE)

Gilda Gostan

► **To cite this version:**

Gilda Gostan. ASPECTS CYCLIQUES DE LA MORPHOGENÈSE DE LA COQUILLE DE RISSOA PAR VA DA COSTA (GASTÉROPODE PROSOBRANCHE). *Vie et Milieu*, 1966, pp.9-108. hal-02946019

HAL Id: hal-02946019

<https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-02946019v1>

Submitted on 22 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ASPECTS CYCLIQUES DE LA MORPHOGENÈSE
DE LA COQUILLE DE *RISSOA PARVA* DA COSTA
(GASTÉROPODE PROSOBRANCHE)**

par Gilda GOSTAN

SOMMAIRE

INTRODUCTION	11
CHAPITRE I. — BIOLOGIE DE <i>RISSOA PARVA</i>	13
Définition de l'espèce. Position systématique	13
Biologie	15
Construction de la coquille définitive	17
1) Définition des étapes de croissance	17
2) Développement de la coquille au cours des saisons ...	19
3) Vitesse de construction des côtes et des sillons	19
4) Etude du stade terminal	24
a) construction de la côte terminale	24
b) régénération de la côte terminale	25
c) accroissement pondéral pendant le stade IV	26
Résumé du chapitre I	30
CHAPITRE II. — RECHERCHE D'UNE CORRÉLATION ENTRE LE DÉVELOPPEMENT DE LA COQUILLE ET LE DÉVELOPPE- MENT DES TISSUS	31
I. — Appareil génital	32
Description	33
Développement	35
Recherche d'une corrélation entre l'organogenèse gé- nitale et le développement de la coquille	37

II. — Manteau	41
Description : le manteau jusqu'au bourrelet palléal ..	42
le bourrelet palléal	43
Modifications du bourrelet palléal en fonction de l'âge.	44
Discussion	47
Résumé du chapitre II	48
CHAPITRE III. — ÉTUDE DE LA PÉRIODICITÉ DE L'ORNEMEN-	
TATION	49
1) Etude des localisations du calcium	49
Méthodes	50
Résultats	53
A) Localisations	53
B) Cycle	55
C) Discussion	55
2) Etude des localisations des Polysaccharides	57
Méthodes	58
Résultats	58
A) Répartition des Polysaccharides	58
B) Evolution de la teneur en glucides	60
Discussion	60
3) Etude de l'activité phosphatasique alcaline	62
Méthodes	63
Résultats	64
A) Localisations	65
B) Cycle	68
Discussion	73
1) Rôle de la phosphomonoestérase alcaline dans la	
calcification	73
a) rôle dans la synthèse de la conchyoline .	74
b) absorption et transport	74
c) levée d'une inhibition	75
2) Chez <i>Rissoa parva</i>	75
Résumé	76
4) Autoradiographie : Utilisation de ⁴⁵ Ca comme traceur	77
Technique	77
Expériences avec ⁴⁵ Ca	78
Résultats	80
Discussion	84
A) Absorption du calcium	84
B) Transport et répartition	85
Résumé	86
Conclusions générales	87
Résumé	90
Bibliographie	92
Explication des planches	98

INTRODUCTION

La coquille des Mollusques a fait l'objet, dès le XVIII^e siècle, de nombreux travaux, mais c'est MOYNIER DE VILLEPOIX (1892) qui a définitivement démontré l'origine animale du test. Cet auteur a établi, grâce à des recherches expérimentales, le rôle des différentes parties du manteau dans la sécrétion du périostracum et des couches calcaires. Il a aussi mis en évidence que le calcium de la coquille peut être réutilisé. A la suite de MOYNIER DE VILLEPOIX, les auteurs modernes se sont essentiellement intéressés aux modalités de l'action du manteau et au déterminisme des formes minéralogiques du calcaire.

Cependant, l'étude de la croissance du test peut également être abordée du point de vue de la morphogenèse. En effet, toute modification de l'activité du manteau, causée soit par un changement dans l'état physiologique de l'animal (crise de croissance), soit par une altération des conditions du milieu, devrait se traduire par des modifications de la forme générale de la coquille ou de son ornementation. PELSENEER (1932) et, tout récemment, WAUTIER, PAVANS DE CECCATTY *et al.* (1962) se sont penchés sur cet aspect du problème. Ils ont montré, le premier chez *Trivia arctica*, les seconds sur un Ancyliidae, *Gundlachia* sp., qu'il existe des relations étroites entre les formes de coquille que peuvent présenter ces animaux et l'acquisition de la maturité sexuelle. Dans le cas de *Gundlachia*, comme chez certains Prosobranches (*Apórrhais pespelicans*), la grande différence observée entre les formes jeunes et « adultes » représente un cas-limite. Mais DRACH (1953) a souligné que, chez les Prosobranches, « le phénomène de terminalisation est en réalité beaucoup plus général et peut être souvent décelé par les caractères structuraux de la coquille au niveau du péristome ».

Chez certains Mollusques, à l'intérêt de l'ornementation du bord du péristome s'ajoute celui de l'ornementation de la surface entière du test. Les malacologistes ont l'habitude de distinguer des stries longitudinales, les côtes disposées normalement à la direction d'allongement de la coquille et qui sont dites transversales.

L'ornementation transversale a semblé plus particulièrement intéressante à étudier du fait qu'elle implique une discontinuité de l'activité du manteau.

P. DRACH a attiré mon attention sur l'intérêt que présente un Prosobranch, *Rissoa parva*, pour l'étude de la morphogenèse interne. *Rissoa parva* est une espèce annuelle, de petite taille, vivant en populations denses. Sa coquille est ornée de côtes transversales bien dessinées et le bord externe du péristome est souligné par un bourrelet terminal. Elle présente donc l'avantage d'ajouter à une ornementation du type périodique un ornement terminal, et une croissance rapide. De plus, contrairement à ce qui se présente chez d'autres espèces (Muricidés), le relief de la coquille n'est pas périodiquement résorbé; ceci constitue un avantage supplémentaire pour l'interprétation de l'activité du manteau.

Étant donné l'étude de la croissance du test peut également être abordée du point de vue de la morphogenèse. En effet, toute modification de l'activité du manteau, causée soit par un changement dans l'état physiologique de l'animal (criste de croissance), soit par une altération des conditions du milieu, devrait se traduire par des modifications de la forme générale de la coquille ou de son ornementation (FRANZ 1932) et, tout récemment, WATSON (1952) et GREGORY et al. (1952) se sont penchés sur cet aspect du problème. Ils ont montré, le premier chez l'étoile mer et les seconds sur un Annelide, *Gnathochia* sp., qu'il existe des relations étroites entre les formes de coquille que peuvent présenter ces animaux et l'ornementation de la matrice sexuelle. Dans le cas de *Gnathochia*, comme chez certains Prosobranchs (*Apatina papilion*), la grande différence observée entre les formes jeunes et « adultes » représente un cas limite. Mais JARON (1953) a souligné que, chez les Prosobranchs, « le phénomène de terminalisation est en réalité beaucoup plus général et peut être souvent décelé par les caractéristiques de la coquille au niveau du péristome ».

Chez certains Mollusques à l'intérieur de l'ornementation du bord du péristome s'ajoute ainsi de l'ornementation de la surface externe du test. Les malacologistes ont l'habitude de distinguer des stries longitudinales, les côtes disposées normalement à la direction d'allongement de la coquille et qui sont dites transversales.

CHAPITRE PREMIER

BIOLOGIE DE *RISSOA PARVA*

Définition de l'espèce. Position systématique

Rissoa parva Da Costa est un Prosobranché Monotocarde appartenant au sous-ordre des Taenioglosses ou Mesogastropoda. La superfamille des *Rissoacea*, caractérisée par la présence d'un stylet cristallin, groupe entre autres les familles des *Rissoidae*, *Hydrobiidae*, *Assimineidae*. Les *Rissoidae* possèdent, à l'arrière du pied, un appendice filiforme, simple ou divisé en plusieurs filaments (ANKEL, T.N.O., 1936). La systématique des *Rissoidae* est assez complexe, en raison de la variabilité qui affecte la plupart des espèces : presque toutes présentent des variétés qui diffèrent du type par la taille et l'ornementation de la coquille. THIELE (1931) divise la famille des *Rissoidae* en trois tribus ou sous-familles : les *Rissoinae*, les *Barlecinæ*, les *Hemistomiinæ* : la différence entre les *Barlecinæ* et les *Rissoinae* réside dans la forme de l'opercule qui ne porte pas de prolongements chez les *Rissoinae*.

Le genre *Rissoa* Desmarest, 1814, est caractérisé par l'existence, chez presque toutes les espèces, de côtes transversales, par l'épaississement fréquent du bord du péristome et par la forme ovale de ce dernier. Un troisième caractère, commun à *R. parva*, *R. inconspicua*, *R. guerini*, *R. (Onoba) striata*, *R. ventricosa*, *R. auriscalpium*, est l'absence de côtes sur les tours supérieurs de la coquille.

Quatre espèces de *Rissoa* vivent à Roscoff, dans la zone de balancement des marées. *Rissoa parva* est la plus fréquente; elle est également l'espèce dominante à Plymouth (FRETTER et GRAHAM, 1962). Les trois autres espèces roscovites sont *R. membranacea* Adams, *R. lilacina* Récluz et *R. guerini* Récluz (CORNET et MARCHAD, 1951). J'ai adopté, pour la détermination de *R. parva*, la description de JEFFREYS (1867), qui est très complète, et dont la partie relative à la coquille est reproduite ici :

« *Rissoa parva* Da Costa : shell conic-oval, rather solid, nearly opaque, somewhat glossy; *sculpture* : strong and slightly curved ribs, like buttresses, of which there are 8 on the body-whorl, and 12 on the penultimate and next whorl (the succeeding whorls having no ribs); the ribs do not extend to the base : their interstices are

frequently cancellated, and their termination on the lower part of the last whorl defined by more or less distinct spirial striae, arising from the intensity or concentration of microscopical lines which cover the whole surface in that direction; the labial rib is thick and white, placed at a short distance behind the outer lip. *Colour* mostly pale yellowish-white, sometimes brown or chocolate, obscurely marked occasionally with rays between some of the ribs, and with a band round the base, always having a falciform streak from the suture behind the labial rib towards the middle of the outer lip; the rays, band, and streak are chestnut-brown; sometimes the ribs are white, the tip is pinkish, and the mouth is edged with chestnut-brown. *Spire* short, bluntly pointed : whorls 6-7 convex, the last occupying nearly two-thirds of the spire. *Suture* rather slight, but distinct. *Mouth* roundish-oval, somewhat expanded, *outer lip* thin, contracted and incurved above, *inner lip* reflected on the pillar and at the base, where there is no appearance of an umbilical crevice. *Operculum* thin, whitish, with a small excentric spire and delicately striated » (L 0.165; B 0.1).

Rissoa parva comprend deux variétés :

la variété *interrupta*, qui se distingue par sa coquille, plus petite, plus mince et semi-transparente, dépourvue de côtes;

la variété *exilis*, qui est naine, lisse, et dont la côte terminale est rudimentaire ou absente.

L'animal est blanc et porte parfois une discrète tache pigmentaire à la partie supérieure de la tête. L'appendice de la partie postérieure du pied est long, unique. La sole plantaire porte, dans la moitié postérieure, une fente longitudinale. L'animal extrait de la coquille laisse apercevoir le stylet cristallin, vert clair.

Nous avons vu que *Rissoa parva* était très abondante à Roscoff; elle cohabite essentiellement avec *R. guerini* qui se distingue de *R. parva* par différents caractères : une côte subterminale blanche, plus large que chez *R. parva*, sans tache pigmentaire mais suivie d'une ligne pigmentée qui cerne le bord du péristome; les tours de spire sont plus renflés chez *R. parva*; la hauteur de la spire est inférieure chez *R. parva*; les premiers tours, lisses, sont pigmentés chez *R. guerini* et ne le sont pas chez *R. parva*. Enfin, la pigmentation de l'animal vivant, indépendamment de celle de la coquille, se présente différemment dans ces deux espèces : la région nucale est pigmentée en rouge ou en noir chez *R. guerini*, peu ou pas pigmentée chez *R. parva*. Ces derniers caractères sont primordiaux pour la diagnose des jeunes animaux.

Echantillonnage : la récolte des *Rissoa* est en fait une collecte d'algues qui sont rapportées et éventuellement expédiées à sec; à l'arrivée au laboratoire, les algues sont réparties dans des bacs et recouvertes d'eau de mer. Les *Rissoa* d'un ou plusieurs bacs

sont recueillies à mesure qu'elles montent sur les parois du récipient; d'autre part, les touffes d'algues sont secouées à sec au-dessus d'une cuvette plate, rincées et essorées à plusieurs reprises, jusqu'à ce qu'elles ne portent plus d'animaux. Les *Rissoa* qui tombent des algues sont, soit placées dans un cristallisoir contenant de l'eau de mer, soit fixées à l'alcool 70°.

Biologie

J'ai étudié l'évolution d'une population de *R. parva* suivie mensuellement pendant deux ans; les échantillons ont été recueillis à Saint-Efflam (Côtes-du-Nord). *Rissoa parva* vit dans la zone inférieure du niveau médiolittoral : on la trouve dans le chenal ensablé à Callot, au Beclem, à Saint-Efflam. Elle colonise des algues rouges et brunes : Rhodymeniales, algues calcaires (*Jania rubens*, *Coralina* sp.); parmi les Sphacelariales, *Halopteris scoparia* porte toujours un grand nombre de *Rissoa*; on en trouve encore sur *Cladostephus verticillatus*. CORNET et MARCHE-MARCHAD (1951) signalent sa présence sur les Zoostères, mais elle ne s'y trouve pas en très grand nombre.

Rissoa parva se nourrit d'algues et de diatomées épiphytes, comme me l'a prouvé l'examen des contenus stomacaux. STAR-MÜHLNER (1955) a décrit, pour les espèces de la mer adriatique, le même type de nourriture.

La période de reproduction se situe, pour la population étudiée, en hiver; les capsules de ponte, nombreuses sur les algues à partir de décembre, deviennent innombrables en février. Le développement embryonnaire dure en moyenne trois semaines en captivité, à 13 °C. LEBOUR (1934) a observé un développement plus rapide, l'éclosion se produisant vers le dixième jour. La larve de *R. parva* appartient au groupe des véligères planctotrophes à vie pélagique longue, selon la classification de THORSON (1946). Elle présente un stade au cours duquel elle peut soit nager, soit ramper (« swimming-crawling stage »).

Parmi les *Rissoa* provenant d'une même récolte, on remarque une certaine proportion d'individus de petite taille, dont la coquille est plus étroite et l'ornementation moins apparente que pour le reste de la population. Ces animaux de petite taille étant régulièrement présents en assez grand nombre, il était légitime de se demander s'ils représentaient une fraction hétérogène de la population.

J'ai mesuré la hauteur de plusieurs lots de *R. parva* en choisissant comme repères la partie apicale de la coquille et le bord

inférieur, basal, du péristome. Les mesures ont été faites à la loupe binoculaire munie d'un oculaire micrométrique à tambour, les *Rissoa* étant toujours placées horizontalement par rapport au champ de vision (voir photo 1).

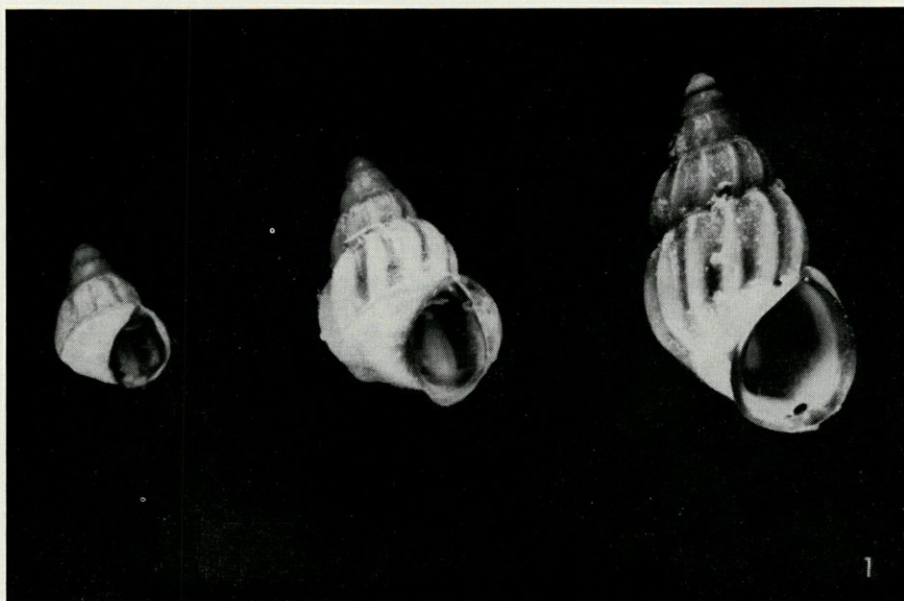


PHOTO 1. — *Rissoa parva* Da Costa : évolution de la forme du péristome au cours des étapes II, III, IV. ($\times 12,6$).

TABLEAU 1
Taille de la coquille des *R. parva* au stade IV;
la répartition des sujets est unimodale.

Hauteur de la coquille <i>R. parva</i> IV	Fréquence des animaux récoltés							
	août		sept.		octobre		janvier	
	n	%	n	%	n	%	n	%
300 - 399		2.5	1	1	1	1	1	0.1
400 - 499	80	20	3	3	9	9	130	13
500 - 599	191	47	27	27	50	50	549	57
600 - 699	100	25	63	63	39	39	290	29.8
700 - 799	22	6.5	6	6	1	1	1	0.1
Total	403		100		100		971	

Le tableau 1 indique la répartition des animaux en classes de taille. Les hauteurs sont exprimées en unités micrométriques

(100 unités = 0,66 mm). La hauteur moyenne d'un millier de *R. parva* récoltées en janvier est de 565 unités micrométriques, soit 3,8 mm. La courbe de répartition des tailles est unimodale. L'hypothèse d'un dimorphisme sexuel, tel qu'il se présente chez *R. violacea* Desmarest (ANKEL, 1936), peut donc être écartée.

Construction de la coquille définitive

1. — Définition des étapes de croissance

La coquille achevée de *R. parva* se compose de trois régions représentant trois périodes successives du développement :

la région supérieure, lisse, correspond au début du développement;

la partie médiane, occupant trois ou quatre tours de spire, est ornée de côtes régulièrement espacées;

enfin, la dernière région est constituée par la côte terminale ornée de deux taches fauves falciformes (photo 2).

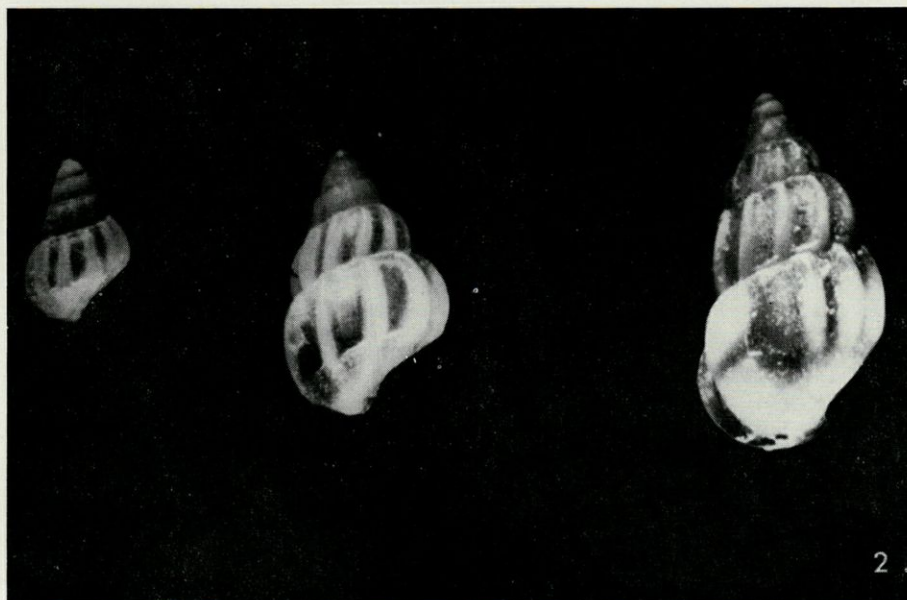


PHOTO 2. — Remarquer l'absence de côtes sur les tours supérieurs et, pour le troisième sujet, la côte terminale ($\times 12,6$).

Dans un lot de *R. parva*, on pourra donc distinguer trois types de coquilles : petite et lisse, en partie lisse — en partie costulée, enfin, bordée d'une côte terminale épaisse. De plus, la forme du péristome des coquilles non encore bordées mais pourvues de côtes, permet de faire une distinction supplémentaire selon que le péristome est ovale ou qu'il dessine un angle voisin de 90°. Une population de *R. parva* comprend donc quatre types de sujets de taille croissante; le développement complet de la coquille est constitué par la succession de ces quatre types :

Etape I : coquille lisse, comportant deux ou trois tours de spire;

Etape II : apparition de côtes transversales. Le bord externe et la base du péristome dessinent un angle voisin de 90°. L'ouverture du péristome est plus large que haute.

Etape III : l'ouverture péristomienne est deux fois plus haute que large; elle est ovale.

Etape IV : l'ouverture péristomienne conserve la même forme; elle est marquée du côté externe, opposé à la columelle, par un fort bourrelet terminal dont les caractères (largeur, pigmentation) sont utilisés pour la diagnose de l'espèce.

Le passage de l'une à l'autre de ces étapes est progressif. On peut remarquer l'existence de nombreux intermédiaires entre les étapes II et III. La limite marquée par l'angle du bord externe et de la base du péristome s'efface graduellement en même temps que la coquille s'allonge et que la hauteur du péristome s'accroît. La fin du stade III est reconnaissable au fait que les côtes deviennent moins marquées en relief et en hauteur. Ce phénomène peut être suffisamment accentué pour qu'il y ait disparition totale des dernières côtes de ce stade. Cette observation correspond à la description de BUCQUOY, DAUTZENBERG et DOLLFUS (1882) : « sur le dernier tour, les côtes s'arrêtent brusquement un peu au-dessous de la périphérie et la base de la coquille est lisse ».

J'ai pu observer également que le développement de la coquille des espèces voisines, *R. guerini*, *R. auriscalpium*, *R. variabilis*, présente les mêmes étapes.

La généralité de cette évolution chez plusieurs espèces de *Rissoa* m'a conduite à rechercher si ces différents aspects de la coquille correspondaient à des étapes de l'organogenèse ou simplement à des phases de croissance. On verra donc dans ce chapitre quelles sont les caractéristiques de la croissance des coquilles de *R. parva*. Les corrélations possibles entre les étapes de construction de la coquille et les phases du développement des organes internes feront l'objet du chapitre II.

2. — Développement de la coquille au cours des saisons

Ce développement est illustré par le tableau 2, dans lequel sont portés les pourcentages des animaux récoltés aux différents stades au cours de l'année. L'examen de ce tableau montre que :

a. — à l'exception des mois de juin et juillet, le pourcentage du stade IV est très élevé (environ 80 % de la population);

b. — aux mois de juin et juillet, les stades I et II sont dominants;

c. — les pourcentages des stades intermédiaires II et II sont relativement importants pendant les mois d'août et de septembre.

Ce tableau permet de confirmer que *R. parva* est une espèce annuelle, dont le développement, après la vie larvaire, est divisé en deux périodes de durée inégale. La première période, comprenant les stades I, II, III, débute en juin et durera trois à quatre mois; la seconde période, correspondant au stade IV, durera de septembre à mai, soit environ neuf à dix mois. Au début de cette période, la coquille, qui a atteint sa longueur définitive, continue à évoluer; elle s'opacifie, se couvre d'épiphytes et, comme nous le verrons ultérieurement, s'épaissit. Ainsi, pendant l'hiver, la population reste stable.

Le renouvellement annuel de *R. membranacea* a été observé sur les côtes danoises (SMIDT, 1938).

3. — Estimation de la vitesse de construction des côtes et des sillons pendant les stades II et III

La croissance de la coquille sera envisagée pour les étapes II et III, étapes où la coquille est ornée de côtes transversales régulièrement espacées. Ces côtes fournissent des repères utilisables pour observer la croissance en longueur de la coquille : la répétition de l'ensemble constitué par une côte et par le sillon intercostal qui la précède permet de définir un cycle de croissance de la coquille :

la phase « A », correspondant au sillon qui sépare deux côtes;
la phase « B » à la côte elle-même.

Durée d'un cycle A B

a. — Evaluation d'après l'observation des animaux récoltés

L'ordre de grandeur de la durée d'un cycle A B peut être évalué en examinant les échantillons d'une population prélevés à diffé-

rentes époques de l'année. Connaissant, d'une part, le temps total de construction des côtes, c'est-à-dire la durée des étapes II et III, et, d'autre part, le nombre total des côtes chez les individus ayant achevé leur croissance, on peut calculer le temps moyen consacré

TABLEAU 2

Composition d'une population de *R. parva*.

Ce tableau indique, pour des récoltes mensuelles, la composition d'une population de *R. parva*; les animaux sont répartis en quatre groupes correspondant aux étapes du développement de la coquille.

Dates	Etapes de croissance							
	I		II		III		IV	
	n	%	n	%	n	%	n	%
avril 1961 ...	8	0.7	37	2.4	111	5.8	1730	91.0
mai	72	5.0	54	20.0	9	2.0	125	48.0
juin	181	18.0	717	72.0	73	7.3	33	3.3
juillet (début)	4	0.7	317	61.5	145	28.1	49	9.5
juillet (fin) ..	15	2.0	42	5.6	93	12.7	590	79.7
août	27	2.5	131	11.8	135	12.1	114	73.5
septembre ...	8	1.6	41	8.1	13	2.5	447	87.8
octobre	2	0.7	1	0.3	6	2.0	290	97.0
novembre ...	37	8.0	107	23.3	57	12.4	259	57.0
décembre ...	14	2.3	30	4.8	137	22.1	439	70.8
janv. 1962 ...	20	3.4	78	13.1	48	8.0	450	75.5
février	82	10.3	67	8.5	31	3.9	592	77.3
mars	24	4.3	165	29.8	60	10.8	305	55.0

à la construction d'un ensemble côte-sillon. Les deux étapes II et III durent, en été, de trois à quatre mois; le nombre moyen des côtes étant de 29, le temps de construction de l'unité « côte-sillon » serait de 3 à 4 jours. En supposant que le déroulement des phases A et B nécessite un temps égal, on peut évaluer à 40 h. environ la durée d'élaboration d'un sillon ou d'une côte. Si cette proposition est juste, le nombre d'individus A trouvés dans une population devrait être égal à celui des B.

Sur 750 *R. parva* récoltées en octobre 1958, 381 étaient en phase A, et 369 en B; de même, parmi 155 *R. parva* récoltées en juillet 1961, 76 étaient en A et 79 en B. Ainsi, la probabilité de rencontrer un animal en phase A ou B est la même et on peut penser que, dans la nature, les temps de construction d'une côte ou d'un sillon sont égaux. En été, ce temps est de l'ordre de 40 h.

La croissance de la coquille de *R. parva* est donc régulière et se rattache au mode « continu » défini par DRACH (1953); cette

continuité implique l'existence d'un cycle de l'activité du manteau et, éventuellement, d'autres tissus participant à la construction de la coquille. L'étude de cette périodicité fera l'objet du chapitre III.

b. — *Evaluation d'après les observations sur des animaux en élevage*

Conditions d'élevage et techniques : les élevages destinés à l'étude de la durée totale du cycle A B ont été réalisés en groupant les animaux par lots, selon l'étape définie par la morphologie de la coquille. J'ai constitué quatre lots de *R. parva* : IIA, IIB, IIIA et IIIB. Les animaux ont été groupés par dix ou vingt et placés dans des cristallisoirs ou des cuvettes de polyéthylène contenant environ un litre d'eau et élevés à la température du laboratoire (17°5 à 18°5). Certains lots ont été placés en eau courante, les autres en eau confinée, renouvelée quotidiennement. Les bacs à élevage ont été garnis de touffes d'*Halopteris scoparia* et de fragments d'Ulves, les *Rissoa* colonisant indifféremment l'un et l'autre support.

L'accroissement en longueur de la coquille est évalué en comptant les côtes et les intervalles qui les séparent, et qui sont désignés respectivement par les symboles A et B, l'ensemble A + B constituant la longueur unité construite pendant un cycle. La dernière côte ou le dernier sillon formés au moment de la mise en élevage sont peints à l'encre de chine ou avec une encre soluble dans l'alcool. On a ainsi un point de repère à partir duquel il est facile de compter les côtes et les intervalles construits au cours de l'élevage. Les animaux sont placés quelques instants sur un papier buvard avant d'être peints. Par la suite, les examens sont également faits à sec pour plus de précision, car une goutte d'eau dans l'ouverture du péristome diffracte la lumière et l'observation du bord externe du péristome en est rendue malaisée; d'autre part, l'animal mouillé sort partiellement de sa coquille pour essayer de se redresser, ce qui gêne également l'observation du bord du péristome. L'ensemble des manipulations des animaux hors de l'eau dure de 3 à 4 minutes et les animaux ne semblent pas en être incommodés.

J'ai d'abord examiné les sujets en élevage toutes les 12 ou 24 h.; l'accroissement de la coquille au cours de ce temps est assez faible et j'ai espacé les examens de 48 h ou même de trois jours. L'accroissement de la coquille est exprimé par le nombre d'heures nécessaires à la construction d'une côte et d'un sillon. Les résultats obtenus pour les différents lots sont groupés en classes de 24 h. Le tableau suivant (tableau 3) indique le pourcentage de *Rissoa* dans chaque classe en tenant compte des conditions d'élevage en eau courante ou en eau confinée.

TABLEAU 3

Croissance en longueur de la coquille de *R. parva*.

L'unité de longueur choisie est l'ensemble constitué par un sillon (A) et une côte (B).

L'allongement est exprimé

par le nombre d'heures nécessaires à un allongement AB; les résultats sont groupés en classes de 25 heures.

Nombre d'heures pour cr. = 1	Eau courante		Eau confinée	
	% <i>Rissoa</i>	% cumulés	% <i>Rissoa</i>	% cumulés
1 à 25	5.1		3.3	
26 à 50	57.7	62.8	49	52.3
51 à 75	16.6	79.4	28.9	81.2
76 à 100	11.5	90.9	5.5	86.7
101 à 125	3.8	94.7	1.1	87.8
126 à 150	2.6	97.3	11.0	98.8
151 à 175	0		0	
176 à 200	1.3	98.6	0	
201 à 225	0		0	
226 à 250	1.3	99.9	1.1	99.9

Il apparaît que :

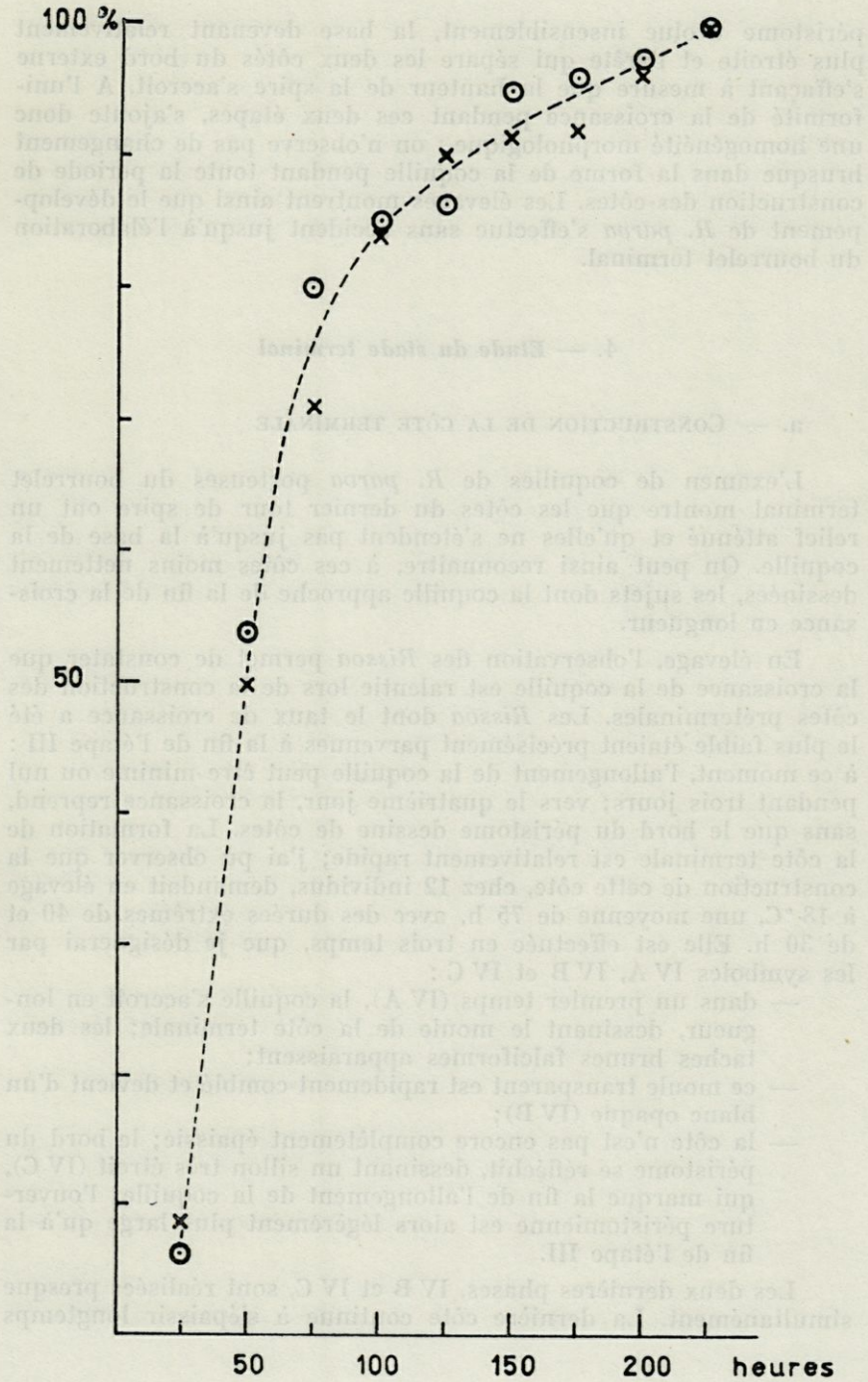
1. — 90 % des individus de la population construisent un cycle AB en moins de cent heures et que, dans plus de 60 % des cas, les animaux construisent ce cycle en plus de 26 heures. Si l'on tient compte des observations faites dans la nature, qui indiquent que les deux parties du cycle AB se déroulent dans des temps égaux, on voit que la majorité des individus a construit une côte et un sillon pendant un temps de 15 à 50 h. Les observations faites à partir d'animaux récoltés ont permis d'estimer ce temps à 40 h environ, ce qui confirme les observations faites sur les élevages.

2. — Les deux distributions des fréquences des *Rissoa* prises au stade II ou III sont identiques. Ceci permet de conclure que les temps d'édification des côtes ou des sillons sont indépendants des étapes II et III (fig. 1).

L'examen qualitatif des *Rissoa* en élevage montre que le passage de l'étape II à l'étape III est progressif, que la forme du

FIG. 1. — Croissance en longueur de la coquille en fonction du temps : abscisses : les temps groupés en classes de 25 h; ordonnées : les pourcentages cumulés des fréquences des *R. parva* II et III qui ont construit une côte et un sillon dans chaque classe.

On note que les courbes de fréquence des *R. parva* II (×) et III (⊙) sont confondues.



péristome évolue insensiblement, la base devenant relativement plus étroite et l'arête qui sépare les deux côtés du bord externe s'effaçant à mesure que la hauteur de la spire s'accroît. A l'uniformité de la croissance pendant ces deux étapes, s'ajoute donc une homogénéité morphologique : on n'observe pas de changement brusque dans la forme de la coquille pendant toute la période de construction des côtes. Les élevages montrent ainsi que le développement de *R. parva* s'effectue sans accident jusqu'à l'élaboration du bourrelet terminal.

4. — Etude du stade terminal

a. — CONSTRUCTION DE LA CÔTE TERMINALE

L'examen de coquilles de *R. parva* porteuses du bourrelet terminal montre que les côtes du dernier tour de spire ont un relief atténué et qu'elles ne s'étendent pas jusqu'à la base de la coquille. On peut ainsi reconnaître, à ces côtes moins nettement dessinées, les sujets dont la coquille approche de la fin de la croissance en longueur.

En élevage, l'observation des *Rissoa* permet de constater que la croissance de la coquille est ralentie lors de la construction des côtes préterminales. Les *Rissoa* dont le taux de croissance a été le plus faible étaient précisément parvenues à la fin de l'étape III : à ce moment, l'allongement de la coquille peut être minime ou nul pendant trois jours; vers le quatrième jour, la croissance reprend, sans que le bord du péristome dessine de côtes. La formation de la côte terminale est relativement rapide; j'ai pu observer que la construction de cette côte, chez 12 individus, demandait en élevage à 18 °C, une moyenne de 75 h, avec des durées extrêmes de 40 et de 30 h. Elle est effectuée en trois temps, que je désignerai par les symboles IV A, IV B et IV C :

- dans un premier temps (IV A), la coquille s'accroît en longueur, dessinant le moule de la côte terminale; les deux taches brunes falciformes apparaissent;
- ce moule transparent est rapidement comblé et devient d'un blanc opaque (IV B);
- la côte n'est pas encore complètement épaissie; le bord du péristome se réfléchit, dessinant un sillon très étroit (IV C), qui marque la fin de l'allongement de la coquille; l'ouverture péristomienne est alors légèrement plus large qu'à la fin de l'étape III.

Les deux dernières phases, IV B et IV C, sont réalisées presque simultanément. La dernière côte continue à s'épaissir longtemps

après la construction du sillon caractérisant la phase IV C. L'épaississement se produit également pour la région subterminale de la coquille, c'est-à-dire pour les deux dernières côtes. Une coupe de la coquille opérée normalement aux dernières côtes montre que les sillons subterminaux sont peu marqués; la périodicité de l'ornementation disparaît à la fin de la croissance de la coquille; toute la partie terminale est épaissie suivant un gradient dont le maximum est constitué par la côte terminale. Je signale ici une anomalie que j'ai observée sur quelques *R. parva* : la reprise de la croissance en longueur au-delà de la côte terminale, et la construction d'un second bourrelet terminal. Cette particularité est relativement fréquente chez les animaux récoltés en juillet-août, période où la croissance de la coquille est rapide. On peut obtenir expérimentalement ce redoublement de la côte terminale.

b. — RÉGÉNÉRATION DE LA CÔTE TERMINALE

L'étude de la formation de la côte terminale a été complétée par des expériences de régénération.

La côte est meulée à l'aide d'une fraise de dentiste, sans léser les tours précédents. Les animaux « opérés » sont divisés en deux lots : le premier est conservé à l'eau courante, le second en eau confinée, renouvelée quotidiennement. L'alimentation des animaux des deux lots est identique.

J'ai meulé le bord externe du péristome de 35 *R. parva* IV et observé la régénération de l'extrémité de la coquille pendant une semaine, les animaux étant conservés à une température de 18 °C.

1) La régénération s'opère en trois temps : allongement de la coquille à partir du point où s'est arrêté le meulage; épaississement progressif de la longueur néoformée, la côte devenant opaque en s'épaississant; installation des deux flammules pigmentées de l'étape IV. A la différence de la construction normale de la dernière côte, la pigmentation apparaît ici après la formation et le comblement de la côte.

2) Il est intéressant de noter que les animaux dont la côte terminale est meulée entièrement régénèrent beaucoup plus rapidement que les sujets qui subissent le meulage partiel de cette côte. La régénération commence plus tard chez ces derniers et aboutit au redoublement de la côte terminale, qui est toujours construite normalement à la cicatrice. Il est possible que les *Rissoa* qui présentent, dans la nature, un tel redoublement, aient subi un traumatisme, une lésion de la côte terminale provoquant un nouvel accrois-

sement en longueur de la coquille; mais, alors que cet accroissement aboutit à la construction de 6 ou 7 nouvelles côtes et de la côte terminale chez les sujets vivant en liberté, le meulage de la côte terminale chez les *Rissoa* conservées en élevage ne provoque pas une nouvelle croissance en longueur.

3) Parmi les animaux meulés en juillet, quelques-uns commencent déjà à épaissir la côte néoformée deux jours après le meulage; l'épaississement se poursuit du deuxième au cinquième jour; la côte est entièrement reformée et pigmentée dès le septième jour pour les deux tiers des sujets. Au contraire, en octobre, la régénération s'effectue très lentement: sur 14 sujets, le début de l'allongement a commencé, pour trois d'entre eux, le troisième jour, pour quatre autres, le quatrième jour et pour trois encore, il n'a commencé que le cinquième jour.

Une semaine après, deux sujets ont complètement régénéré une côte terminale, les autres sont demeurés au stade de croissance en longueur, mais l'épaississement de la côte n'est pas ébauché. Enfin, pour trois animaux, après trois jours, on n'observe qu'une cicatrisation du bourrelet, entamé irrégulièrement par la meule. En automne, la vitesse de régénération de la dernière côte est nettement plus faible qu'en été. Les élevages étant réalisés dans des conditions identiques, la vitesse de régénération semble donc être fonction de l'état physiologique des *Rissoa* et de la saison.

J'ai comparé la vitesse de régénération de la côte terminale chez des *Rissoa* élevées en eau courante ou en eau confinée, et réparti les sujets en deux lots après le meulage de la dernière côte. La différence paraît sensible au début de la régénération: pendant les deux premiers jours, les animaux élevés en eau confinée effectuent seulement une croissance en surface, alors que certains animaux maintenus en eau courante ébauchent un épaississement de la côte reconstruite. Par la suite, il est difficile d'établir une distinction entre les deux groupes; la croissance en épaisseur est longue et l'avance ou le retard pris par certains des sujets s'effacent pendant cette période. Il ne semble donc pas que l'élevage des *R. parva* en eau confinée soit défavorable, et ceci est vrai aussi bien pour les jeunes en cours de croissance (tableau n° 3) que pour les animaux qui ont subi le meulage de la côte terminale.

c. — ACCROISSEMENT PONDÉRAL PENDANT LE STADE IV

La coquille des *R. parva* IV récoltées en été ou aux saisons suivantes présente un aspect différent; transparente chez les animaux dont l'arrêt de croissance est récent, elle s'opacifie progressi-

vement à mesure que l'animal vieillit. Au contraire les sujets constituant la population hivernale se différencient des précédents par une coquille opaque et recouverte parfois d'épiphytes. L'étude du renouvellement annuel de la population a montré que, pour la plupart, les *Rissoa* parvenaient à l'étape IV dès le mois de septembre. Il semble donc que l'épaississement apparent de la coquille caractérise les sujets plus âgés rencontrés en hiver et dont l'accroissement en longueur est terminé.

Afin de mesurer cet épaississement, j'ai pesé des *R. parva* IV provenant de récoltes échelonnées du mois de juillet 1961 au mois d'avril 1962.

Les animaux, fixés et conservés dans l'alcool à 70°, ont été séchés à 110 °C avant d'être pesés. Etant donnée la petite taille des *Rissoa*, dont le poids varie autour de 2 à 3 mg, j'ai groupé les animaux par lots de 25 ou de 50, réduisant ainsi l'erreur sur la pesée. Les *Rissoa* ont été réunies par classe de taille, la hauteur de la coquille étant mesurée comme je l'ai indiqué au paragraphe précédent. J'ai choisi un intervalle de classe couvrant 100 unités micrométriques. Les *Rissoa* destinées aux pesées proviennent des deux classes les plus nombreuses, les plus représentatives et, pour chacune de ces classes, 5 ou 6 lots de 50 *Rissoa* ont été constitués. J'ai pesé des sujets récoltés à un trimestre d'intervalle, la mesure étant toutefois répétée en juillet et en août, c'est-à-dire pendant les deux mois où la croissance en longueur est le plus rapide et au cours desquels apparaissent de jeunes IV.

Les poids, reportés dans le tableau 4, augmentent d'abord fortement, puis se stabilisent jusqu'en octobre et continuent à s'accroître pendant l'automne et l'hiver. L'accroissement pondéral des *Rissoa* entières atteint, pour la classe 500-599, 24,4 % du poids mesuré en juillet, et, pour la classe 600-699, 16,6 % de ce poids. J'ai vérifié que l'accroissement du poids des *Rissoa* était bien dû à l'épaississement de la coquille en effectuant des pesées de coquilles seules : les animaux étaient extraits de leur coquille brisée. Les coquilles, séchées à nouveau par souci d'homogénéité ont été pesées par lots de 25. La figure 2, et le tableau 4 indiquent le poids des lots de *Rissoa* entières, celui des coquilles seules et enfin, le poids des *Rissoa* sans coquille, calculé par différence. Le poids des coquilles seules augmente à peu près régulièrement au cours du temps chez les individus de petite taille, mais la courbe relative aux sujets plus grands est plus accidentée. Dans les deux cas, cependant, on note un accroissement important entre juillet et août, puis jusqu'en janvier, une stabilisation relative suivie d'une remontée en avril.

Pour les deux classes, le poids des tissus est faible en automne et, après un maximum en hiver, accuse une chute après la période

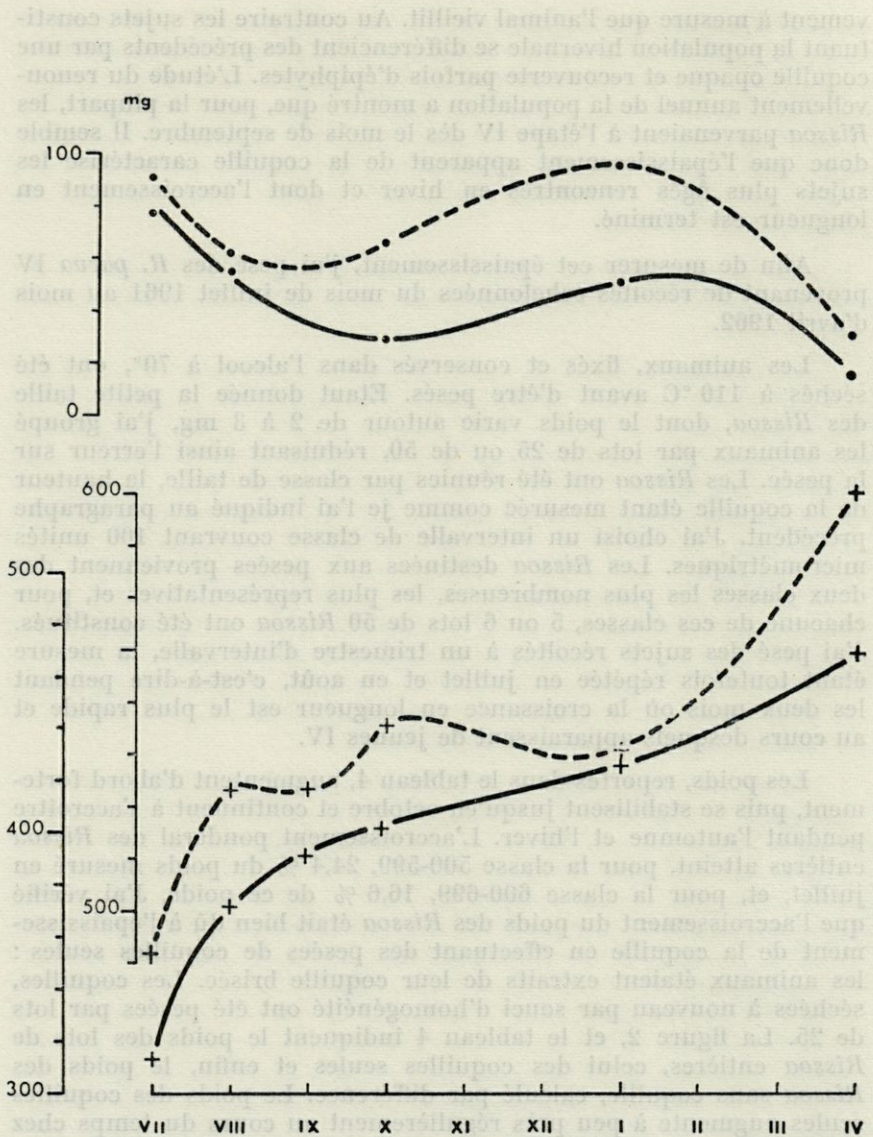


FIG. 2. — Accroissement pondéral des *R. parva* IV au cours du temps : les croix représentent les poids des coquilles, les points représentent les poids des tissus. Les courbes en traits pleins sont relatives aux animaux de la classe 500-599, les courbes en traits pointillés sont relatives aux animaux de la classe 600-699 (les poids sont ceux de 100 *Risso*).

TABLEAU 4
Accroissement pondéral des *Rissoa parva*
après la fin de la croissance en longueur.

	Date	nb.	Poids de 100 <i>R. p.</i> entières en mg P	Poids des coquilles seules en mg p	Poids des <i>Rissoa</i> en mg (P — p)	Δp mg
Classe 500-599	Juillet	175	389.2	312.4	76.8	
	Août	100	426.4	372.0	54.4	59.6
	Sept.			390.8		18.8
	Oct.	300	428.8	400.8	28.0	10.0
	Janv.	300	475.4	425.6	49.8	24.8
	Avril	150	484.4	468.8	15.6	43.2
Classe 600-699	Juillet	100	575.4	484.0	91.4	
	Août	125	607.8	546.0	61.8	62.0
	Sept.			546.0		0.0
	Oct.	100	637.3	571.2	66.1	25.2
	Janv.	150	656.8	561.6	95.2	— 9.6
	Avril	300	691.6	660.8	30.8	99.2

de reproduction. Comme le montre la figure 2, le poids des seules coquilles continue à s'accroître pendant cette période.

Il est intéressant de remarquer que le minimum automnal du poids des tissus ou de la coquille s'ajoute aux observations déjà citées sur le ralentissement de la croissance en longueur de la coquille et son aptitude à la régénération. D'autre part, l'allure de la courbe relative au poids des tissus trouvera une explication dans l'étude de l'évolution saisonnière de l'appareil génital qui sera envisagée dans le prochain chapitre.

RÉSUMÉ DES OBSERVATIONS DU CHAPITRE I

Les observations sur une population de *R. parva* au cours des saisons, tant sur des animaux récoltés dans la nature que sur des animaux suivis en élevage ont permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

1) L'été, par de nombreux aspects, apparaît comme une saison déterminante pour la croissance de cette espèce annuelle : croissance en longueur pour les jeunes dont la coquille se présente aux stades II et III, accroissement pondéral et régénération rapide pour les animaux dont la croissance en longueur est achevée.

2) A l'opposé, l'automne, du point de vue du développement de la coquille apparaît comme la saison d'activité minimale.

3) D'autre part, le rythme de la croissance au passage de l'étape II à l'étape III est inchangé. Les étapes II et III, différant par la forme du péristome, sont donc comprises dans une seule grande période du développement.

4) Enfin, le temps nécessaire à la construction d'une côte est du même ordre de grandeur que celui qui est employé à la construction d'un sillon. Il est compris, en juillet, entre 15 et 40 heures. La croissance est donc relativement plus importante au moment de l'élaboration des côtes, où elle comporte simultanément un accroissement en surface et en épaisseur.

CHAPITRE II

RECHERCHE D'UNE CORRÉLATION ENTRE LE DÉVELOPPEMENT DE LA COQUILLE ET LE DÉVELOPPEMENT DES TISSUS

L'observation des coquilles de *Rissoa parva* montre que la spire subit des modifications depuis les premiers tours jusqu'à la manifestation extérieure de l'arrêt de croissance :

- la modification la plus remarquable est l'apparition d'une côte terminale qui caractérise une sorte de « forme imaginaire » survenant lorsque la coquille compte 6 à 7 tours de spire;
- cet arrêt de croissance est précédé par deux changements morphologiques qui ont été utilisés pour définir des « étapes » dans le développement de la coquille : le premier concerne la forme du péristome, le second l'ornementation de la spire. Celle-ci, lisse pendant les 3 premiers tours, acquiert à partir du quatrième tour une ornementation due à la construction de côtes transversales. La croissance de la coquille, qui avait jusque là un caractère continu, devient alors périodique.

Il m'a semblé intéressant de rechercher la cause de ces changements ou tout au moins d'essayer de les rattacher à une modification plus profonde affectant les tissus « vivants ».

Nous avons vu que les *R. parva* parvenues au terme de la croissance longitudinale de la coquille subissaient un accroissement pondéral. PELSENEER (1932) a montré, dans une étude intitulée : « La métamorphose préadulte des *Cypreidae* », que la maturation des *Trivia* se déroulait exclusivement après l'arrêt de la croissance en longueur de la coquille et que cet arrêt de croissance était accompagné de modifications intéressant le manteau et la coquille.

Il est ainsi possible de reconnaître les adultes du genre *Trivia* aux caractères de la coquille et du manteau. MOORE (1936) et

TOURAINÉ (1952, D.E.S. Paris) ont montré que, chez *Nucella lapillus*, l'acquisition de la maturité sexuelle allait de pair avec l'épaississement du bord externe du péristome. Dans ces deux espèces, le développement de l'appareil génital est corrélatif d'un certain aspect de la coquille.

WAUTIER, PAVANS DE CECCATTY *et al.* (1962) ont observé une relation entre l'aspect de la coquille et le développement de l'appareil génital de *Gundlachia sp.*

La présence, chez *Rissoa parva*, d'un bourrelet terminal, suggère l'existence d'un phénomène analogue : on peut penser que l'organogenèse génitale est postérieure à l'arrêt de la croissance.

D'autre part, on sait que la croissance de la coquille des Mollusques est due à l'activité du manteau : les changements morphologiques successifs de la coquille de *R. parva* sont-ils liés à des modifications structurales de cet organe ?

Le présent chapitre est consacré à l'étude des tissus au cours des différents stades de croissance de la coquille. Il sera divisé en deux parties traitant : 1, du développement de l'appareil génital et de la recherche d'une corrélation entre ce développement et la croissance de la coquille; 2, de l'activité du manteau pendant cette croissance.

I. — Appareil génital

Dans cette première partie, je tâcherai de répondre à deux questions concernant une éventuelle corrélation entre le développement génital et les changements morphologiques observés sur la coquille.

La première question peut être formulée comme suit : tous les individus porteurs du bourrelet terminal sont-ils adultes ? La seconde question est complémentaire de la précédente et a pour but de savoir si tous les animaux aptes à la reproduction sont porteurs du bourrelet terminal.

Avant d'aborder ces questions, je rappellerai brièvement la structure de l'appareil génital de *Rissoa parva*.

Description de l'appareil génital

L'appareil génital des *Rissoidae* a été décrit par JOHANSSON (1939) dans une étude sur l'anatomie comparée des *Rissoidea* et

des familles voisines, *Hydrobiidae* et *Littorinidae*. *Rissoa parva* ne figurant pas parmi les espèces décrites, j'étudierai : la composition du tractus génital parfaitement développé, le développement de l'appareil génital mâle et femelle.

DESCRIPTION DE L'APPAREIL GÉNITAL MÂLE

L'appareil génital mâle comprend le testicule, logé dans la concavité de la glande digestive, et qui occupe un volume variable, le spermiducte, qui apparaît, sur le vivant, comme un canal d'un blanc légèrement rosé et qui s'élargit au niveau de la vésicule séminale, et le pénis dont l'attache est située à l'arrière du tentacule oculaire droit. Le pénis est cylindrique chez les sujets immatures; chez les animaux mûrs, il est aplati et terminé par une pointe latérale.

L'examen microscopique montre que le testicule est séparé de la glande digestive et du manteau du sac viscéral par un conjonctif lâche. Le parcours du spermiducte avant le pénis comprend trois parties : le tronçon proximal du spermiducte va du testicule à la vésicule séminale, située au niveau de l'estomac; le tronçon moyen suit l'enroulement du sac viscéral depuis la vésicule séminale, qui constitue la région la plus large du gonoducte, jusqu'à la région inférieure du pied; enfin, dans le dernier tronçon, le spermiducte remonte latéralement le long du muscle pédieux jusqu'à l'origine du pénis; au niveau de l'attache du pénis, le canal déférent est entouré d'un tissu conjonctif analogue à celui de l'attache du manteau ou des tentacules. Dans les deux premières régions, la paroi du spermiducte est constituée par un épithélium cubique unistratifié; dans la dernière partie, des muscles circulaires s'ajoutent à la paroi du spermiducte qui a une section plus étroite.

On ne voit pas de différenciations glandulaires le long du spermiducte; les seules cellules glandulaires du tractus génital mâle sont situées dans le pénis; ce sont des éléments cylindriques allongés, disposés radialement autour du canal déférent. La présence de cellules glandulaires dans cette région a été observée par JOHANSSON chez *Rissoa violacea* et *R. membranacea*; ces deux espèces sont, comme *R. parva*, dépourvues de prostate typique, mais possèdent un segment glandulaire autour du canal déférent dans le pénis (photos 3, 15).

DESCRIPTION DE L'APPAREIL GÉNITAL FEMELLE

On peut généralement distinguer sur le vivant : l'ovaire, l'oviducte et l'utérus. L'ovaire est, chez les femelles mûres, plus volu-

mineux que la glande digestive; les ovocytes sont d'un blanc jaunâtre. L'oviducte proximal est logé dans la concavité du sac viscéral, faisant suite à l'ovaire. L'utérus, ou glande de la capsule selon la terminologie de FRETTER, a une position antérieure droite. Il forme un rectangle blanc opaque, reconnaissable même lorsqu'il est peu développé, par sa forme et sa position légèrement oblique. En arrière de l'utérus, le réceptacle séminal forme une petite sphère représentant environ le dixième du volume de l'utérus. Le canal du réceptacle séminal dessine une anse dont les branches sont longitudinales : le canal est d'un rose brillant, coloration identique à celle du spermiducte et probablement due aux spermatozoïdes contenus dans la lumière. Postérieurement au canal, on distingue la glande proximale de l'oviducte, glande de l'albumine selon FRETTER et GRAHAM (1962), qui a la forme d'un large croissant. L'examen macroscopique ne permet pas de distinguer la continuité entre la glande proximale et l'oviducte, qui est très mince dans cette région.

La glande de la capsule peut être divisée en plusieurs régions dont les produits de sécrétion diffèrent histochimiquement (photo 14). Au point de vue morphologique, elle comprend deux régions de surface inégale, séparées par la lumière de la glande. La région postérieure, dorsale, est composée de hautes cellules glandulaires (100 μ) séparées par des cellules de soutien : les granulations de sécrétion sont réparties sur toute la longueur de la cellule. La région antérieure, ventrale, est composée d'éléments de plus petite taille : les cellules, hautes de 15 à 20 μ , sont ciliées. La glande de la capsule s'ouvre ventralement dans la cavité palléale; elle communique postérieurement avec le réceptacle séminal.

Le canal conduisant au réceptacle séminal est étroit et sinueux. Sa paroi comprend une forte assise de fibres musculaires circulaires externe, et des cellules épithéliales ciliées disposées en une couche interne. Le réceptacle séminal est entouré d'une tunique musculaire plus mince que celle du canal. Les cellules épithéliales sont de hauteur inégale; elles laissent place à une large lumière; les spermatozoïdes sont libres dans la lumière ou, le plus souvent, ordonnés normalement à la paroi, leur tête enfoncée dans les cellules épithéliales, le flagelle orienté vers la lumière. Cette disposition est identique à celle qui a été décrite par JOHANSSON (1939) pour *Rissoa membranacea*, par LINKE (1933) pour les littorines, par FRETTER (1948) pour *Skeneopsis planorbis*.

Du réceptacle séminal qui constitue un caecum, part un canal se rendant à la glande désignée par FRETTER et GRAHAM (1962) sous le nom de glande de l'albumine, et que j'appellerai, d'après sa situation au voisinage de l'oviducte, la « glande proximale de l'oviducte », désignation proche de celle de JOHANSSON (Obere Oviduktdrüse) et qui ne présume pas de ses fonctions. Cette glande

est moins volumineuse que la glande de la capsule; elle possède une étroite lumière entourée de hautes cellules bourrées de produit de sécrétion.

Développement de l'appareil génital

1. — GONADE INDIFFÉRENCIÉE

On distingue deux étapes dans l'organisation de la gonade indifférenciée : dans la première étape, les gonocytes sont disposés en un cordon compact; les cellules germinales, groupées en îlots entourés de tissu conjonctif, ont un volumineux noyau (8 à 10 μ de diamètre), peu chromatique. Chaque îlot comprend 7 ou 8 cellules.

Dans un stade plus avancé, les cellules germinales, plus nombreuses, forment la paroi de tubules creux; elles conservent les mêmes caractères morphologiques.

La transformation de la gonade indifférenciée en ovaire ou en testicule se reconnaît, peu après ce stade, à la taille des cellules : dans un testicule jeune, elles sont plus petites, leur noyau mesurant de 4 à 6 μ de diamètre; au contraire, l'ovaire jeune est composé de cellules plus volumineuses.

2. — TRACTUS GÉNITAL MÂLE

L'appareil génital mâle se différencie à partir de deux ébauches éloignées, celle du testicule d'une part, celle du pénis d'autre part. Le développement du pénis et la transformation de la gonade indifférenciée en testicule sont contemporains. L'évolution conduisant des gonies aux spermatozoïdes se fait de la paroi vers le centre de la gonade. Les cellules périphériques donnent la réaction à l'acide périodique-Schiff. Les figures de division sont, naturellement, très nombreuses dans le testicule jeune. La chromatine est disposée en anneau dans les spermatides. Les spermatozoïdes occupent le centre du testicule.

Le spermiducte est constitué avant que l'évolution des cellules germinales soit achevée; sa différenciation précède l'apparition des spermatozoïdes.

La différenciation du segment glandulaire du canal déférent dans le pénis constitue la dernière étape du développement du tractus génital mâle.

3. — TRACTUS GÉNITAL FEMELLE

L'appareil génital femelle comprend, à un stade où il est peu développé, l'ovaire et l'ébauche de l'utérus.

L'ovaire se présente sous forme de tubules dont la paroi est constituée par les ovogonies ou les ovocytes jeunes. Leur taille varie entre 10 et 12 μ : elle est donc très légèrement supérieure à celle des éléments de la gonade indifférenciée. Le noyau, à nucléole excentrique, occupe presque entièrement la surface cellulaire. Entre les tubules ovariens se trouve un tissu conjonctif à nombreux amoébo-cytes; au voisinage immédiat des tubules les fibres conjonctives dessinent des lacunes qui renferment souvent des sphérules calcaires.

L'utérus se présente à ce stade comme une invagination du manteau, immédiatement voisine de la glande hypobranchiale. Il est situé à droite du rectum, comprend une partie antérieure étroite, longitudinale, et une partie plus profonde, élargie transversalement. La paroi utérine a une structure identique dans ces deux régions. Elle est constituée par :

- un épithélium plat extérieur;
- intérieurement, une assise de cellules orientées perpendiculairement à la lumière. Ces cellules, à noyau basal ou médian, ne montrent aucune activité sécrétoire, mais se caractérisent par leur forte chromophilie après l'emploi du rouge nucléaire solide et de l'hématoxyline de Groat.

A un stade plus avancé, la lumière des tubules est comblée du fait de la multiplication du nombre des ovocytes jeunes; l'ovaire comprend alors deux catégories de cellules : à la périphérie, du côté columellaire, se trouvent des éléments de petite taille (10 μ de diamètre nucléaire), à chromatine disposée en bâtonnets; l'intérieur de la gonade comprend des ovocytes plus grands, dont la chromatine, très peu colorable, forme des amas lâches. Ces ovocytes sont apparemment en interphase. Leur noyau a un diamètre de 17 à 20 μ , la plus grande longueur de la cellule atteignant 30 à 45 μ . A ce stade, l'utérus s'est allongé et sa paroi est plissée transversalement. Il s'est également développé en profondeur et on distingue une partie supérieure longue et étroite, et une partie inférieure dilatée, limitant une vaste cavité; entre ces deux régions, l'utérus émet vers la gauche une branche transversale qui se prolonge en un canal sinueux entouré de fibres musculaires. La paroi du canal comprend des cellules basses (10 μ) et quelques cellules muqueuses dont le produit de sécrétion est coloré par la fuchsine paraldéhyde. La paroi de la glande de la capsule diffère de celle du canal : elle est composée de cellules allongées, atteignant 18 μ de haut, qui ne manifestent aucune fonction sécrétrice. Les cellules, à noyau basal

ou médian, ont toutes une forte affinité pour les colorants nucléaires. Les cellules de la partie inférieure de l'utérus ont les mêmes caractères que celles de la branche latérale; la forme de cette région, circulaire, sa lumière très vaste, suggèrent que cette partie du tractus génital constitue peut-être une première ébauche de réceptacle séminal.

Le réceptacle séminal se différencie immédiatement après l'utérus, avant que celui-ci n'acquière une fonction sécrétrice, et alors que l'ovaire contient des ovocytes de tailles diverses, non encore chargés de vitellus. Le réceptacle séminal présente d'emblée un aspect proche de celui de l'adulte. Les fibres musculaires périphériques manquent cependant dans l'organe jeune. L'épithélium interne est constitué de cellules à noyau basal, de hauteur régulière, dont le cytoplasme apical est plus clair. Les réactions des glucides sont toujours négatives au niveau du réceptacle séminal; l'extrémité apicale des cellules de l'assise la plus interne donne la réaction de Takamatsu-Gomori.

La dernière glande différenciée est la glande proximale de l'oviducte. La première ébauche que j'ai reconnue se trouve au contact du réceptacle séminal et constitue un organe triangulaire, composé d'un épithélium simple à hautes cellules ne laissant qu'une étroite cavité au centre de la future glande. Lorsque les cellules sont plus évoluées, elles renferment des sphérules donnant la réaction à l'acide periodique-Schiff.

On voit que l'appareil génital femelle se différencie d'avant en arrière : l'examen de 55 femelles jeunes dont le sexe n'était pas reconnaissable à la dissection a montré que les différentes parties du tractus génital étaient représentées comme suit :

ovaire	présent chez 55	<i>Rissoa parva</i>		
utérus jeune	»	»	44	»
R.S. jeune	»	»	32	»
glande proximale ...	»	»	10	»

La différenciation de l'appareil génital de *R. parva* s'opère donc, chez les mâles et les femelles, à partir de deux ébauches éloignées, celle de la gonade et celle des genitalia distales, pénis ou utérus. Ce mode de différenciation a été décrit par TOURAINE (1953) chez *Nucella lapillus*.

Recherche d'une corrélation entre l'organogenèse génitale et le développement de la coquille

Après ce rappel descriptif, je reviendrai aux questions posées au début de ce chapitre, concernant l'existence éventuelle d'une

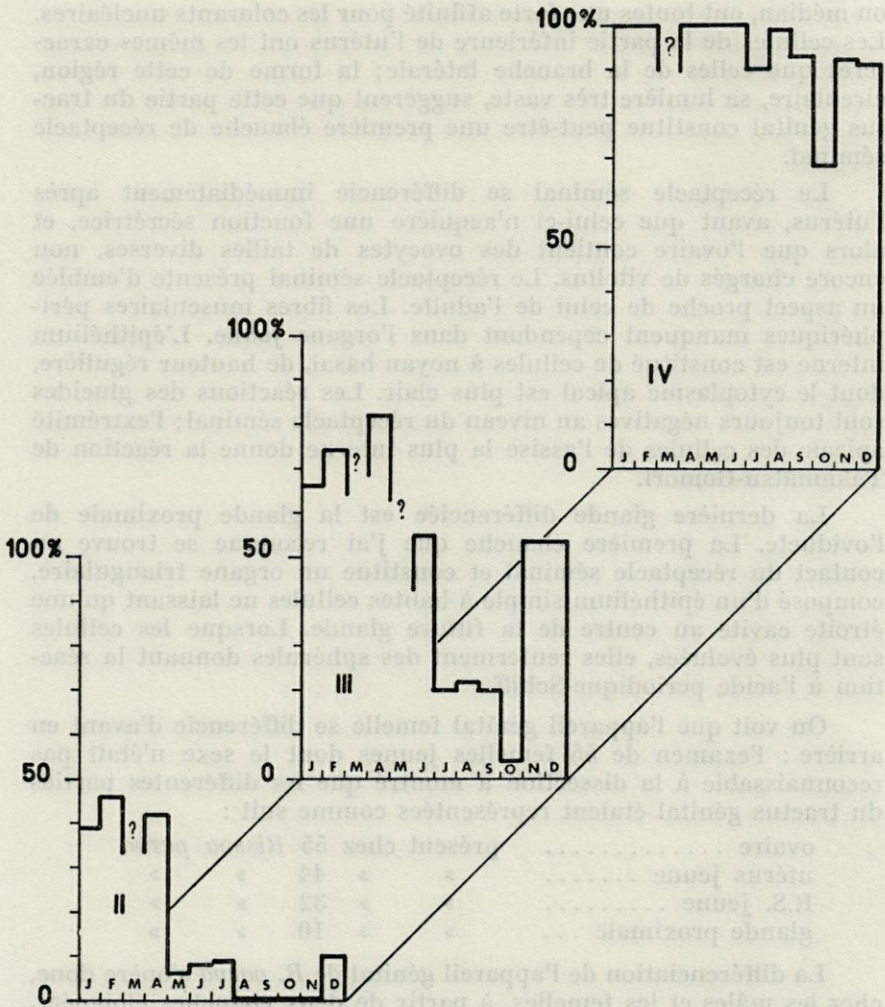


FIG. 3. — Histogrammes des fréquences des animaux sexuellement mûrs en fonction des mois dans les étapes de croissance II, III, IV.

corrélation entre le développement de l'appareil génital et la succession des étapes de croissance de la coquille.

1. — Dans un premier temps, j'ai cherché à établir si toutes les *Rissoa parva* dont la coquille porte un bourrelet terminal sont adultes. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai procédé à l'examen systématique de lots de 100 *Rissoa* choisies au hasard dans un échantillonnage provenant de récoltes mensuelles. Les animaux

étaient extraits de leur coquille, les mâles et les femelles dénombrés; j'ai compté tous les sujets dont le sexe était reconnaissable, quel que soit le développement de la gonade ou des annexes génitales. Les animaux immatures ont été fixés, coupés et utilisés pour l'étude du développement de l'appareil génital.

L'examen des animaux parvenus au stade IV a montré que les *R. parva* étaient toutes sexuellement mûres de janvier à juin (fig. 3), que 9 % d'entre elles étaient immatures en juillet, et que la proportion d'immatures augmentait d'octobre à décembre. On voit donc que :

— les *Rissoa parva* IV sont mûres en hiver et au printemps, mais que l'appareil génital est incomplètement développé en été et en automne. Or, la période de reproduction de *R. parva* à Roscoff est hivernale; je signalerai ici que les mâles et les femelles récoltés au printemps ont des gonades beaucoup moins volumineuses qu'en hiver; les annexes, pénis ou glande de la capsule, subissent une involution après la période de reproduction.

— le pourcentage de *R. parva* immatures est très élevé en octobre et assez important encore en décembre. L'étude microscopique de ces sujets montre cependant, pour la plupart d'entre eux, l'existence d'ébauches génitales qui se présentent à divers degrés de développement. Pour un certain nombre cependant, qui présentent une gonade indifférenciée, le sexe n'est pas reconnaissable.

J'ai observé un petit nombre de *Rissoa* parasitées au niveau de la gonade, qui était partiellement ou totalement remplacée par des Trématodes. Le nombre de parasites a été particulièrement élevé en 1963 : 2,5 % de *R. parva* au stade IV, dont le sexe était cependant reconnaissable d'après les organes annexes, ont alors présenté une infestation de la gonade et de la région proximale du tractus génital. Les parasites sont relativement actifs et quittent leur hôte dès que celui-ci est extrait de la coquille. Je n'ai jamais observé de parasites sur les animaux récoltés en été.

On voit que, mis à part quelques cas de régression de la gonade due à la présence de parasites, les *Rissoa parva* IV possèdent presque toujours un appareil génital développé; un tiers des sujets de la population étudiée s'est cependant révélé immature en automne; cette observation, répétée deux années, montre que le pourcentage élevé des animaux immatures récoltés à cette saison n'est pas fortuit. On observe, d'autre part, une proportion voisine de 10 % de sujets immatures en juillet, et un taux voisin en novembre-décembre. Or, nous avons vu que la population étudiée était entièrement renouvelée chaque année : elle se compose en juillet, de jeunes dont un grand nombre sont en cours de croissance. Les élevages et les relevés mensuels portant sur la composition de la population montrent que la croissance de la coquille est très rapide

pendant l'été. Il semble, d'après le nombre de sujets immatures que l'on trouve en automne parmi les *Rissoa* parvenues au stade IV, que la croissance de la coquille et l'organogenèse génitale sont dissociées et se déroulent selon un rythme différent, au moins pendant cette partie de l'année.

2. — Cette observation a été complétée par l'étude des *Rissoa* en cours de croissance; cette étude a montré que :

les *R. parva* en cours de croissance (étapes morphologiques II et III) peuvent présenter un appareil génital parfaitement développé,

le nombre de sujets immatures est relativement plus élevé lorsque la coquille se présente à l'étape II que lorsqu'elle est parvenue à l'étape III. Dans ce dernier groupe, le développement génital est fonction de la taille de la coquille. Le tableau suivant indique la répartition des immatures parmi 310 *R. parva* III de taille croissante; la taille est mesurée en unités micrométriques :

Classe de taille	Nombre d'immatures	Pourcentage d'immatures
300 - 399	95	97
400 - 499	105	68
500 - 599	32	61
600 - 699	3	

D'autre part, le pourcentage minimum d'immatures est observé de décembre à avril pour les sujets des deux classes II et III définies d'après l'aspect du péristome; pendant la même période, le pourcentage d'immatures est supérieur à 50 % pour les sujets parvenus à l'étape III; l'examen microscopique des immatures révèle une différence entre ces sujets en fonction de l'époque à laquelle les animaux sont récoltés : en hiver, au moment où le pourcentage d'immatures est minimum, on voit que ces *Rissoa* possèdent presque toutes des ébauches de tractus génital et que leur sexe est reconnaissable d'après l'étude des coupes histologiques. Au contraire, les individus récoltés en automne ne possèdent souvent qu'une gonade indifférenciée réduite à quelques gonocytes.

La comparaison des résultats obtenus après l'examen des *Rissoa* dont la coquille se présente aux étapes II, III et IV (fig. 3) montre que, pendant l'automne, les *R. parva* de toutes tailles et dont la coquille est parvenue à l'une quelconque de ces étapes, présentent un appareil génital incomplètement développé. On peut donc conclure que l'automne représente, pour la population étudiée, une période pendant laquelle le développement de l'appareil génital est ralenti.

En résumé, l'étude de l'appareil génital des *Rissoa* réparties en quatre classes d'après la morphologie de la coquille révèle que :

1) Il n'existe pas de corrélation absolue entre le développement de la coquille et celui de l'appareil génital. Pendant une grande partie de l'année, on observe cependant un parallélisme entre l'organogenèse génitale et l'aspect de la coquille : les individus appartenant à la classe IV sont tous pourvus d'un appareil génital mûr; à l'opposé, tous les individus de la classe II sont immatures, et ceux de la classe intermédiaire présentent un développement variable de l'appareil reproducteur.

2) Ce développement est influencé par des facteurs externes, saisonniers. Par rapport à la répartition type ci-dessus, on observe un ralentissement automnal de l'organogenèse génitale, et une accélération hivernale du développement de l'appareil reproducteur.

D'après la population de *R. parva* étudiée, on peut opposer les faits observés chez cette espèce à ceux qui ont été décrits chez *Trivia arctica* (PELSENEER, 1932) et chez *Purpura lapillus* (MOORE, 1937); ces espèces présentent une corrélation entre le développement génital et la croissance de la coquille. Une telle corrélation n'est d'ailleurs pas de règle chez les Gastéropodes aquatiques, comme le montrent les observations de RUSSELL (1909) sur *Patella*, celles de MOORE (1937) sur *Littorina*. Le développement génital des Littorines semble, comme celui de *Rissoa parva*, subir l'influence de facteurs externes : LINKE (1933) a décrit, chez *L. robusta* et *L. rudis*, la succession de phases de développement et de phases de régression, liées aux périodes de reproduction.

II. — Evolution de la structure du manteau

Le manteau de *R. parva* comprend, comme celui de tous les Gastéropodes, deux territoires : le premier, très étendu, représente la presque totalité de la surface du manteau. Il s'étend de l'attache du manteau à son extrémité libre, c'est-à-dire au bourrelet palléal (B.P.) et abrite plusieurs organes : la cténidie, l'osphradium, la glande hypobranchiale. Le manteau est peu épais dans cette région qui sera désignée par le terme de repli palléal ou surface générale du manteau. Le second territoire est constitué par le B.P., plus épais, qui comprend plusieurs types de tissus et qui est divisé longitudinalement en deux régions proximale et distale.

1. — *Le manteau jusqu'au B.P.*

Il est réduit, avant le bourrelet palléal, aux deux épithéliums inférieur et supérieur, avec leurs basales, et à un conjonctif fibreux qui occupe l'épaisseur comprise entre ces basales.

L'ÉPITHÉLIUM SUPÉRIEUR

Il est composé, dans le repli palléal, de cellules extrêmement basses, irrégulières, qui font place, dans le B.P., à des éléments cylindriques, possédant un noyau allongé. La disposition des tissus sous-jacents, fibres musculaires et conjonctives, donne lieu à la distinction d'un B.P. proximal, qui fait suite à la surface générale du manteau, et d'un B.P. distal. Dans la région proximale du B.P., les cellules épithéliales sont hautes et étroites. Des fibres musculaires longitudinales provoquent la contraction du manteau et principalement de la région supérieure du B.P. ; le manteau apparaît souvent replié au niveau du B.P. proximal par suite de cette contraction et les cellules de l'épithélium supérieur sont alors enchevêtrées ; on ne distingue que leur cytoplasme apical qui est souvent vacuolisé. Dans le B.P. distal, les fibres musculaires manquent et le bord libre du manteau ne subit pas de contraction. L'épithélium supérieur comprend des cellules de hauteur régulière, dont les extrémités sont quelquefois soudées par un film apical superficiel.

L'extrémité du manteau est divisée par un sillon, dessinant un pli externe et un pli interne revêtus par un épithélium dont les caractères sont respectivement ceux de l'épithélium supérieur et de l'épithélium inférieur du B.P.

L'ÉPITHÉLIUM INFÉRIEUR

Dans la région de l'attache du manteau, l'épithélium inférieur comprend des éléments cylindriques parmi lesquels se trouvent des cellules muqueuses dont le cytoplasme se colore en rouge intense dans la coloration de Unna-Pappenheim au vert de méthyle-pyronine (pH 4.7). Plus distalement, l'épithélium dessine quelques villosités peu profondes qui se continuent dans la partie proximale du B.P.. Les cellules épithéliales banales sont remplacées localement par un épithélium glandulaire dont le produit de sécrétion forme des plaquettes colorées diversement après la réaction à l'acide periodique-Schiff ou la réaction de Bauer, et qui sont bleues après un trichrome de Masson. L'épithélium inférieur du B.P. proximal est composé de cellules banales alternant avec des cellules muqueuses calici-

formes. Les éléments glandulaires disparaissent dans le B.P. distal dont les cellules cubiques sont recouvertes d'un film muqueux qui forme une sorte de « cuticule » à leur surface.

2. — *Le bourrelet palléal*

Le B.P. constitue la région la plus épaisse du manteau. Il est nettement séparé du reste du manteau par un fort accroissement de l'épaisseur comprise entre les épithéliums inférieur et supérieur; il comprend, outre les fibres musculaires et conjonctives longitudinales, des tissus qui lui sont propres : cellules glandulaires et tissu conjonctif à amœbocytes. La présence de ces tissus contribue à augmenter la hauteur du B.P., qui atteint trois ou quatre fois celle du reste du manteau.

Le B.P. est également défini par l'aspect des épithéliums qui acquièrent des caractères particuliers dans cette région.

Le bourrelet palléal lui-même présente une structure légèrement différente dans sa partie proximale, adjacente à la région médiane du manteau, et dans sa partie distale. Les épithéliums inférieur et supérieur sont morphologiquement différents dans ces deux régions. D'un bout à l'autre du B.P., une coupe sagittale montre une formation que j'appellerai la glande du bourrelet palléal. Elle est composée d'éléments allongés, à contours irrégulier. Les parois cellulaires se distinguent mal; la présence, dans le cytoplasme, de granulations colorées en violet ou en rouge par la fuchsine paraldéhyde, permet d'identifier ces cellules comme glandulaires. Les cellules sont disposées radialement autour d'une étroite lumière centrale. L'ensemble de la glande forme un organe quelque peu replié à l'intérieur du B.P. ; on distingue plusieurs lobes successifs qui occupent presque toute la surface du B.P. La photo 5, qui représente un coupe sagittale du B.P., montre l'agencement des cellules de la glande du B.P. Dans le B.P. distal, les cellules sont toutes orientées vers l'épithélium supérieur du manteau. Le cytoplasme apical des cellules glandulaires est étiré en une longue pointe ; l'ensemble des prolongements cytoplasmiques de plusieurs cellules évoque un paquet de fibres qui s'insinuent entre les épithéliums inférieur et supérieur du B.P.

L'extrémité superficielle de la glande est colorée en rouge par la fuchsine paraldéhyde alors que les sphérules intracellulaires sont colorées en violet avec plus ou moins d'intensité. Le produit de sécrétion s'accumule à l'extrémité superficielle de la glande et subit une modification qui rend possible la réaction franchement positive à la fuchsine paraldéhyde.

L'examen de coupes frontales montre une dissymétrie du B.P. dont le côté gauche diffère du reste par sa situation, sa structure et la présence de cellules glandulaires particulières (photo 4). L'attache du manteau se fait, de ce côté, à faible distance du B.P. D'autre part, l'épaisseur de cette région est supérieure à celle du reste du B.P. du fait de la présence de volumineuses cellules glandulaires alternant avec de hautes cellules de soutien et débouchant, sans canal évacuateur, à la face interne du B.P. Ces cellules diffèrent, par leurs caractères histochimiques, des cellules de la glande du B.P. Au-delà de ces éléments, l'épithélium inférieur, constitué de cellules cubiques, reprend un caractère plus banal. L'épithélium supérieur de l'extrémité du B.P. est composé de cellules identiques à celle de l'épithélium inférieur, cubiques et revêtues d'un film muqueux. En deçà, dans la partie proximale du B.P., l'épithélium supérieur est très bas, les limites cellulaires sont peu visibles. Ces deux caractères se retrouvent dans l'épithélium supérieur de la surface générale du manteau.

La description précédente est très voisine de celle de JOHANSSON (1939), concernant le manteau de *Rissoa inconspicua*; les caractères des épithéliums — cellules cubiques dans l'épithélium inférieur, cellules de hauteur variable dans l'épithélium supérieur — sont semblables. D'autre part, JOHANSSON décrit un complexe glandulaire dans le B.P. de *R. inconspicua* « Im Inneren des Mantelwulstes liegen, umgeben von Blutlakunen, Komplexe von Drüsenzellen zwischen den Bindegewebsfasern, welche die beiden Epithelschichten verbinden ».

Le même complexe glandulaire existe chez deux *Hydrobiidés*, *Lartetia* et *Bythinella* (SEIBOLD, 1904 ; BREGENZER, 1916).

La glande du B.P. présente donc des caractères proches dans différentes familles des *Rissoacea*.

Chez *R. parva*, l'importance relative des trois éléments du B.P., lacunes sanguines, fibres conjonctives et cellules glandulaires, peut être profondément modifiée chez des animaux d'âge différent.

MODIFICATIONS DU B.P. EN FONCTION DE L'ÂGE

Chez les très jeunes *R. parva*, dont la coquille se présente au stade I, le B.P. n'est pas beaucoup plus épais que le reste du manteau. La hauteur du manteau s'accroît progressivement et on n'observe pas, comme chez les animaux plus âgés, de cassure brusque à la limite des régions médiane et terminale. Les épithéliums inférieur et supérieur sont composés de cellules plus larges que hautes; l'épithélium inférieur n'est pas revêtu du film muqueux habituel. Entre les deux épithéliums se trouvent des cellules de petite taille,

à noyau relativement volumineux ; ces cellules ne sont pas disposées de façon particulière. Ce stade est antérieur à la formation de la glande du B.P. Il sera désigné par le chiffre 0.

Certaines *Rissoa*, dont la coquille ne porte toujours pas de côtes transversales, présentent un degré d'évolution un peu plus avancé : entre deux épithéliums composés de cellules basses, on voit, dans la région distale du manteau, qui peut déjà porter le nom de bourrelet palléal, deux catégories de cellules. Ces éléments diffèrent par leur taille, leur position et leur colorabilité : les cellules les plus profondes, proches de la région médiane du manteau, sont assez volumineuses, ovales et sont réunies au fond du B.P. ; leur cytoplasme est coloré en bleu pâle par le bleu d'aniline du trichrome de Masson et l'azan. Leur noyau est central et occupe environ le tiers de la surface cellulaire. Des cellules plus étroites, dont le cytoplasme apparaît en gris-bleu après un trichrome de Masson, en bleu ciel après un azan, sont situées dans la partie distale du B.P., au voisinage de l'épithélium supérieur. Certaines de ces cellules ont un noyau opaque, prenant mal tous les colorants, d'autres montrent un noyau bien coloré, à chromatine en très courts bâtonnets et grains, et un nucléole rouge à l'azan. La coloration par la fuchsine-paraldéhyde ne met pas de granulations de sécrétion en évidence dans les cellules de la future glande du B.P.

Ce stade, dans lequel la glande est constituée mais n'est pas encore fonctionnelle, sera désigné par le chiffre 1.

La manifestation de la fonction sécrétrice constitue l'étape 2 : la glande est alors développée, elle occupe presque tout le B.P., à l'exception de deux zones lacunaires situées dans le B.P. proximal et dans la partie inférieure du B.P. distal (photo 5). Dans le B.P. proximal, le conjonctif est composé d'amoebocytes à noyau volumineux et à réseau chromatique très dense. Distalement, le conjonctif est constitué par quelques petites lacunes dont les parois sont perpendiculaires aux épithéliums.

L'aspect 2 est celui que l'on observe le plus fréquemment chez des *Rissoa parva* de toutes tailles.

Enfin, dans une dernière étape, la glande du B.P. subit une involution au terme de laquelle les cellules glandulaires sont confinées à la partie distale du B.P. ; elles sont situées à mi-chemin des bords du manteau, dont elles sont séparées par des éléments fibreux (photo 6).

A ce stade, le B.P. est occupé par deux types de cellules libres (photo 13) : d'une part, de très nombreux amoebocytes qui se déplacent dans de vastes lacunes s'étendant d'un bord à l'autre du manteau et d'autre part, au voisinage de l'épithélium inférieur, un petit nombre de cellules libres, ovales, volumineuses. Le noyau est

volumineux, ovale ou sphérique et situé près des parois cellulaires; le nucléole n'est pas visible. On ne voit pas le cytoplasme de ces cellules peu chromophiles, mais on distingue quatre ou cinq enclaves non structurées, rappelant les concrétions des cellules excrétrices de la glande digestive. Je n'ai observé de telles cellules que chez des *Rissoa* dont la glande du B.P. était parvenue à un stade de régression avancé et dont le B.P. était envahi d'amoebocytes. La présence de ces éléments libres, corrélativement à la régression de la glande du B.P., suggère que ces cellules jouent un rôle dans la transformation du B.P. Il semble que les enclaves des cellules ovales proviennent de débris cellulaires et ces cellules peuvent être comparées à des macrophages. Elles rappellent singulièrement les figures de CHÉTAIL (1963) représentant des macrophages englobant des produits dégénératifs au cours de la dégénérescence nerveuse consécutive à la section du tentacule oculaire d'*Arion rufus*. Les cellules ovales du B.P. de *Rissoa parva* sont dépourvues de glucides A.P.S. positifs; on n'y distingue aucune inclusion colorable par les réactions des glucides ou les colorations topographiques usuelles. Elles semblent devoir participer au nettoyage du B.P. en incorporant les débris cellulaires provenant des cellules dégénératives.

Quant aux amoebocytes, nombreux dans le B.P., ils pourraient également jouer un rôle dans l'évacuation de déchets résultant de l'histolyse des cellules glandulaires. WAGGE (1951, 1955) a montré que les amoebocytes avaient un double rôle dans la régénération du test d'*H. aspersa* : ils exercent, d'une part, une action corrosive sur les régions intactes de la coquille, et d'autre part, ils déposent les matériaux absorbés — Ca, protéines — au niveau de la lésion.

La présence des « cellules ovoïdes » et des amoebocytes dans le B.P. au moment où la glande du B.P. est en régression pourrait s'expliquer par la participation de ces cellules à l'élimination des déchets provenant de l'histolyse des structures précédentes.

En résumé, la glande du B.P. présente un développement qui peut être divisé en quatre étapes : ébauche de la glande, glande organisée : non fonctionnelle, fonctionnelle, involutive.

Le passage de l'un à l'autre de ces aspects est progressif. La succession de ces étapes est, comme le montre le tableau 5, paral-

TABLEAU 5

Stade coquille	I	II	III	IV
Manteau :				
0	3			
1	3	47	32	1
2	1	11	23	32
3	0	0	3	24

lèle au déroulement des « stades » de croissance de la coquille définis au chapitre I. Ce tableau, établi d'après l'examen de 180 *Rissoa*, montre que la glande est différenciée précocement, dès le « stade » I, c'est-à-dire chez des animaux dont la coquille est lisse. Cependant, les quelques exemples de glande non différenciée proviennent tout de sujets à coquille lisse et il est possible que le développement de cette glande précède l'apparition des premières côtes.

Le rôle de la glande du B.P. sera discuté au chapitre III, après l'étude histochimique du manteau, mais on peut déjà remarquer que sa régression chez la moitié des sujets parvenus au stade IV est liée à l'arrêt de la croissance en longueur de la coquille. D'autre part, le plein développement de la glande est observé pendant les étapes II et III de la croissance de la coquille, c'est-à-dire pendant la période de construction des côtes.

Ces observations, jointes au fait que la croissance pondérale de la coquille se poursuit après la formation de la côte terminale, laissent présumer que la glande du B.P. est un agent de la croissance en longueur de la coquille.

DISCUSSION

La régression de la glande du B.P. chez des sujets parvenus au terme de leur croissance en longueur constitue un signe de sénilité : l'involution de la glande est observée sur deux catégories d'individus : un premier groupe comprend des animaux fixés en juillet, mais appartenant à la génération de l'année précédente; un second groupe est composé de *Rissoa* plus jeunes, récoltées et fixées en octobre. Or, nous avons vu que le début de l'automne représentait une période pendant laquelle la croissance et la régénération de la coquille étaient fortement ralenties. L'automne constitue, d'autre part, une période de repos génital. La convergence saisonnière de plusieurs phénomènes :

- dégénérescence de la glande du bourrelet palléal;
 - ralentissement de la croissance de la coquille et de sa régénération;
 - ralentissement de l'organogenèse génitale,
- évoque les préparatifs d'une hibernation.

Les *Rissoa* de tous âges subissent ce ralentissement général de leurs fonctions, qui est probablement dû à l'action de facteurs externes tels que la température, l'alimentation. Mais il est possible également que ces changements soient commandés par l'action d'un facteur humoral, endogène. On sait que différentes fonctions sont

commandées, chez les Mollusques, comme dans d'autres embranchements, par l'activité des cellules neurosécrétrices. LEVER *et al.* (1961) ont montré que le métabolisme de l'eau était étroitement lié au cycle de la neurosécrétion chez les Limnées. KRAUSE (1960) a étudié l'influence de ce même cycle sur l'hibernation d'*Helix*. LUBET (1956, 1959) a mis en évidence une corrélation entre la sexualité et la neurosécrétion chez les Lamellibranches. Van MOL (1960) a montré l'existence d'un rapport entre l'organogenèse génitale d'*Arion rufus* et le développement d'une « glande céphalique » voisine des ganglions cérébroïdes. D'autre part, GABE (1953a; 1954) a décrit des cellules neurosécrétrices dans les différents ganglions de nombreuses espèces de Prosobranches.

Il est possible qu'il existe, chez *R. parva*, une sécrétion des cellules nerveuses correspondant aux modifications décrites à propos de la structure du manteau et de la croissance de la coquille. La recherche d'une éventuelle neurosécrétion, pratiquée par la méthode de GABE (1953b) à la fuchsine paraldéhyde, fera l'objet d'une publication ultérieure.

RÉSUMÉ DU CHAPITRE II

1. — La formation d'un bourrelet terminal ne peut être considérée comme un caractère de maturité génitale de *R. parva* : à des coquilles morphologiquement « jeunes » peuvent correspondre des animaux mûrs et inversement, les coquilles « adultes » peuvent abriter des animaux dont le tractus génital est encore indifférencié. De plus, il est fort probable que des *Rissoa* sexuellement mûres soient encore capables de construire un bourrelet terminal, comme l'état de leur manteau l'indique.

2. — Il existe une corrélation entre le développement d'un complexe glandulaire situé dans le bourrelet palléal et les étapes de la croissance de la coquille : glande inorganisée au stade I, glande fonctionnelle aux stades II et III, glande en involution au stade IV.

La dégénérescence de ce complexe après la construction de la côte terminale constitue un signe de sénilité.

CHAPITRE III

ÉTUDE DE LA PÉRIODICITÉ DE L'ORNEMENTATION

Nous avons vu au chapitre I que, malgré la présence de côtes, *R. parva* doit être considérée comme appartenant au groupe de Prosobranches dont la croissance est continue, c'est-à-dire que l'accroissement en surface et en épaisseur est simultané (DRACH, 1953). Cependant, comme la différence entre les côtes et les sillons réside principalement dans l'importance du dépôt calcaire au moment de la construction d'une côte, il semble que l'accroissement en épaisseur doit subir des fluctuations périodiques pendant le deuxième stade de la croissance de la coquille (étapes II et III).

Je me suis efforcée, dans le présent chapitre, de vérifier s'il existe effectivement un rythme dans le métabolisme et l'utilisation du Ca qui pourrait rendre compte de l'épaississement observé au moment de la construction des côtes. Dans ce but, j'ai recherché, d'une part, quels étaient les sites du Ca et, d'autre part, quels étaient les mouvements du Ca dans l'animal. Les moyens utilisés pour aborder ces différents points appartiennent à deux types de méthodes :

- la première consiste en une étude statique d'histochimie classique comme la mise en évidence du Ca, des glucides et de l'activité phosphatasique alcaline;
- la seconde utilise le calcium 45 comme traceur.

1. — Etude des localisations du calcium

Chez les Gastéropodes, les principaux sites du Ca sont :

1. *La glande digestive* : on sait depuis les observations de BARFURTH (1881) qu'elle constitue, chez *Helix*, un organe de réserve du Ca et qu'elle s'appauvrit lors de la reprise saisonnière de la

croissance de la coquille. Plus récemment, WAGGE (1951) et ABO-LINŠ-KROGIS (1961) entre autres, ont observé l'épuisement des réserves de la glande digestive à la suite d'expériences de régénération.

2. *Le tissu conjonctif* : CUÉNOT (1892) a décrit d'importants dépôts de Ca dans le conjonctif des Pulmonés : ce calcium a une répartition extracellulaire ou se trouve dans les cellules de Leydig. La présence de Ca dans le tissu conjonctif des Gastéropodes a été signalée depuis par PELSENEER (1932), HAYASI (1938-1939), MANIGAULT (1939), FRETTER (1939), ABELOOS (1944), LANZA et MURA (1957), MC GEE RUSSELL (1958).

3. *Le tissu conjonctif du manteau* peut contenir du calcium chez *Helix* (PRENANT, 1924) et chez un murex (FROUTIN, 1937). La mise en évidence de Ca dans l'*épithélium palléal* est délicate. Elle oblige souvent les auteurs à utiliser des techniques particulières, comme la micro-incinération (MANIGAULT), l'observation au microscope à fluorescence (GUARDABASSI et PIACENZA, 1958), ou au microscope polarisant après formation d'un précipité d'oxalate de Ca (HAYASI).

Chez les Prosobranches, les localisations observées sont les mêmes à l'exception de la glande digestive qui ne constitue pas un site de réserve (MANIGAULT, in GRASSÉ, 1960; FRETTER et GRAHAM, 1962). Quelques Prosobranches donnent toutefois une réaction positive des cellules excrétrices de la glande digestive (FRETTER, 1939), mais le dépôt de Ca n'est alors jamais abondant.

J'ai pratiqué la recherche du calcium chez *R. parva* en tenant compte de l'étape à laquelle la coquille était parvenue au moment de la fixation de l'animal. J'ai donc étudié deux catégories d'animaux :

1. *R. parva* en cours de croissance; parmi ces dernières, j'ai distingué : les sujets qui construisaient un sillon (phase A) de ceux qui construisaient une côte (phase B).

2. *R. parva* parvenues au terme de la croissance en longueur (stade IV).

Méthodes :

FIXATION

J'ai utilisé des fixateurs usuels recommandés pour la conservation du calcium : alcool éthylique à 90°; alcool-chloroforme dans les propor-

tions 2/1 en volume. La fixation par ces deux liquides est de courte durée (1 à 2 heures). MC GEE RUSSELL (1958) préconise un nouveau mélange fixateur qui a l'avantage de mieux préserver les structures histologiques; il s'agit du mélange alcool absolu - formol neutre à parties égales. La durée de la fixation par ce mélange est d'une douzaine d'heures; je l'ai fait suivre d'un lavage à l'alcool à 70°.

Les réactions de détection du Ca sont effectuées suivant les méthodes mises au point par MC GEE RUSSELL. Elles comprennent :

1. — Les méthodes de substitution classiques de VON KOSSA et de STOELZNER employées sans coloration de fond afin d'éviter que le colorant cytoplasmique n'interfère avec le sulfure de cobalt ou le sel d'argent formés à l'issue de la réaction. Les noyaux sont colorés par la safranine ou, le plus souvent par le rouge nucléaire solide (Kernechtrot de Bayer, ou Nuclear Fast Red de Gurr). Le rouge solide est d'un usage commode pour des colorations de routine car il peut être employé d'une minute à plusieurs heures sans risque d'empatement. Il colore discrètement les cytoplasmes et donne des préparations très lisibles.

a. Dans la réaction de VON KOSSA (1901), on substitue l'argent au calcium. Le phosphate (ou carbonate) d'argent obtenu est révélé par exposition à la lumière qui provoque le noircissement des sels d'argent. Les résultats donnés par cette méthode sont irréguliers; j'ai eu recours à la variante de Gomori dans laquelle la mise en évidence de l'argent est effectuée grâce à un révélateur chimique, l'hydroquinone.

b. La méthode de STOELZNER au nitrate de cobalt et au sulfure d'ammonium donne des résultats plus constants et reproductibles. Je l'ai employée plus fréquemment que le procédé de VON KOSSA.

Ces deux techniques font apparaître des sphérules caractéristiques du phosphate ou du carbonate de calcium, comprenant un nodule noir excentrique entouré d'un anneau incolore.

La méthode de STOELZNER donne lieu, au niveau des glandes pédieuses, à une fausse réaction; les glandes se colorent plus ou moins intensément en brun-noir. Cette coloration persiste sur les coupes témoins décalcifiées (voir plus bas). Au contraire les sphérules noires disparaissent après la décalcification des coupes : les sites qui contiennent des sphérules calcaires sont alors d'un gris pâle et on peut voir subsister le contour des sphérules mais leur centre est invariablement décoloré.

Dans l'examen des coupes soumises à la réaction de Stoelzner, j'ai considéré comme « riches en Ca » toutes les *Rissoa* pour lesquelles une ou plusieurs coupes se sont avérées Stoelzner ou Von Kossa positives. Inversement les animaux pour lesquels aucune sphérule n'a été mise en évidence sont classés parmi les « pauvres en Ca ». Une évaluation plus précise de la teneur des tissus en Ca est délicate et il n'est pas possible de répartir les résultats en plus de trois cas : positif, fortement positif, négatif. Certaines coupes donnent une réaction douteuse et je n'en ai pas tenu compte dans une première approximation. Pour interpréter ces cas limites et pour les prévenir, j'ai modifié les temps classiques de la réaction de Stoelzner afin de savoir si, en prolongeant les deux traitements que comporte cette réaction, on pouvait uniformiser les résultats.

J'ai préparé des jeux de lames identiques qui ont subi la réaction de Stoelzner avec des temps croissants :

a. La durée du bain de sulfure d'ammonium, fixée classiquement à deux minutes, ne modifie pas l'aspect des sphérules de calcium.

b. Le traitement par le nitrate de cobalt à 2 p. cent est ordinairement opéré par un bain de 5 minutes. J'ai prolongé ce traitement jusqu'à 10 ou 20 minutes : l'examen des lames témoins montre que les coupes du premier groupe (5 minutes) sont moins riches en sphérules noires que les coupes qui séjournent 10 ou 20 minutes dans le nitrate de cobalt. Je n'ai pas observé de différence appréciable entre les coupes des second et troisièmes groupes. Il n'y a donc pas lieu de prolonger le traitement par la solution de nitrate de cobalt au-delà de 10 minutes, et j'ai par conséquent adopté cette durée pour le premier temps de la réaction de Stoelzner.

2. — J'ai appliqué les méthodes aux laques utilisant les colorants anthraquinoniques : alizarine, purpurine, rouge solide. Ces méthodes ont été mises au point par Mc GEE RUSSELL après une étude chimique et histologique des colorations obtenues en présence de sels de Ca. Elles s'utilisent toutes sans coloration de fond mais fournissent néanmoins des préparations de lecture facile.

a. J'ai utilisé couramment la méthode à l'alizarine (DAHL, 1952) revue par Mc GEE RUSSELL (1958), utilisant la formation, à pH 4,3, d'une laque d'alizarine. Le développement de la coloration est observé au microscope; les coupes colorées sont essorées au buvard, déshydratées à l'acétone et éclaircies au xylène. Les sphérules de Ca se détachent du fond au bout de 5 à 15 minutes. La technique de DAHL - Mc GEE RUSSELL fait apparaître des sphérules de Ca en rouge sur fond orange.

b. La technique au Ca Red, selon Mc GEE RUSSELL, est conduite de la même façon que la précédente, mais la coloration des tissus riches en Ca est beaucoup plus lente et l'emploi du rouge solide, préparé comme l'indique Mc GEE RUSSELL en lavant deux fois une solution aqueuse saturée donne lieu à des dépôts gênants pour l'observation microscopique. J'ai essayé de débarrasser le rouge solide des impuretés gênantes en centrifugeant la solution aqueuse saturée. Le colorant obtenu après ce traitement est beaucoup plus pur et donne des résultats aussi nets au niveau des sphérules calcaires.

c. La méthode à la purpurine (variante de Mc GEE RUSSELL) s'est avérée inférieure aux techniques précédentes en donnant des résultats irréguliers. De plus, cette méthode ne permet pas d'obtenir des préparations permanentes; je ne l'ai donc pas utilisée systématiquement.

d. J'ai également essayé la méthode de LILLIE à l'alizarine et celle de GRANDIS et MAININI à la purpurine. Ces deux techniques permettent de confirmer les données des méthodes correspondantes pratiquées selon Mc GEE RUSSELL.

3. — Mc GEE RUSSELL indique enfin une méthode fondée sur l'utilisation du rhodizonate de sodium et permettant la localisation cytotologique du Ca associé à d'autres métaux lourds. Cette dernière technique ne m'a pas fourni plus d'informations sur les sites du calcium que les méthodes aux laques ou les méthodes de substitution.

4. — J'ai enfin eu recours à la micro-incinération des coupes pour détecter le calcium organique, masqué et non décelable par les méthodes précédentes. Sur les coupes soumises à l'incinération et examinées sur fond noir se voient d'importants dépôts de cendres blanches à l'extérieur du sac viscéral et au-dessus de l'opercule. L'examen des coupes témoins montre que ces régions sont Stoelzner-positives. La micro-incinération confirme donc les résultats acquis par les méthodes usuelles, mais on ne peut en attendre plus de précision car, en dehors de ces amas de cendres que l'on sait correspondre à du Ca, il n'est guère possible d'identifier les cendres moins abondantes et on ne peut pas affirmer que les lignes plus ou moins blanches observées sur le pourtour de la tête traduisent la présence de calcium.

Contrôles : les coupes témoins ont été décalcifiées, soit par un traitement de 30 minutes dans une solution de citrate d'ammonium à 20 p. cent, soit par un bain de 5 minutes dans de l'acide trichloracétique à 5 p. cent, ce deuxième procédé jouant le rôle de test pour contrôler la première méthode de décalcification.

Résultats

A. — LOCALISATIONS

Les réactions pratiquées mettent en évidence des sphérules calcaires, qui disparaissent après traitement par un agent décalcifiant. Elles sont distribuées dans divers tissus conjonctifs, notamment les conjonctifs pédieux et viscéral.

1. — Dans le *conjonctif pédieux*, les méthodes de substitution et les méthodes aux laques font apparaître des sphérules localisées dans des cellules volumineuses. Celles-ci sont groupées ou isolées dans la région sus-operculaire du pied (photos nos 8, 9, 10), au niveau de l'attache du manteau et des tentacules. Après les colorations topographiques usuelles, les cellules de ce conjonctif semblent souvent vides et forment un tissu d'aspect « lacuneux ». Leur cytoplasme n'apparaît qu'au voisinage de la paroi cellulaire. Cette paroi n'est visible que pour les plus petites cellules. Le noyau, peu volumineux, pourvu d'un nucléole, occupe une position centrale ou juxta-pariétale; la chromatine est parfois disposée en courts bâtonnets radiaux, rappelant l'aspect « en roues de charrette » décrit par FROUTIN (1937).

Ces cellules, par quelques-uns de leurs caractères, taille, présence de Ca, répartition ubiquiste, aspect de leur cytoplasme, semblent s'apparenter aux cellules de Leydig décrites par CUÉNOT (1892), FROUTIN (1937), CHÉTAIL (1963), chez les Pulmonés.

Des cellules voisines peuvent être chargées en sphérules calcaires ou vides de ces enclaves. Les sphérules, de taille hétérogène,

sont le plus souvent très nombreuses dans une cellule : autour d'une sphère centrale volumineuse, on peut apercevoir des éléments de petite taille. Les sphérules sont constituées par un « noyau » coloré en noir après les réactions de Stoelzner, de Von Kossa et entouré d'une étroite zone claire. Dans certains cas, la réaction ne révèle pas franchement le nodule central et les sphérules n'apparaissent que grâce à leur forte réfringence (photo 10).

REMARQUE. — Caractères des cellules contenant du calcium : chez un même animal, certaines de ces cellules paraissent vides ou du moins, ne prennent aucune coloration : parmi les cellules dont le contenu est colorable, les réactions des glucides permettent de distinguer deux catégories d'éléments d'après leurs affinités tinctoriales : les unes sont colorées par le bleu alcian, par la fuchsine paraldéhyde, et sont métachromatiques après coloration par le bleu de toluidine tamponné à pH 5.3; les autres renferment du glycogène mis en évidence par la coloration au carmin de Best suivie de la contre-épreuve de la digestion salivaire; leur contenu est APS-positif. Sur une même coupe, l'aspect des cellules est variable : certaines contiennent des sphères relativement volumineuses, très chromophiles, et très nombreuses; d'autres ne renferment pas de sphérules mais un réseau irrégulier à mailles serrées, moins chromophile que les sphérules des cellules précédentes (photo 7).

L'examen des cellules qui ne renferment pas de glucides montre autour du noyau ou entre le noyau et une des parois cellulaires un contenu floconneux représentant vraisemblablement un reste de cytoplasme qui est généralement repoussé contre les parois par la masse des réserves glucidiques ou calciques. Ces cellules possèdent donc une fonction glandulaire ou une fonction de réserve, manifestée par la présence de glycogène et de mucopolysaccharides acides alcian-positifs, par l'accumulation, pendant une partie du cycle A B, de sphérules de Ca. La recherche du fer s'est avérée négative au niveau de ces cellules qui ne contiennent pas de lipides osmiophiles.

2. — Le *conjonctif viscéral* : la seconde zone où l'on observe ces sphérules calcaires est constituée par le tissu conjonctif à amœbocytes qui suit les contours des différents organes du sac viscéral et occupe l'espace libre entre ces organes et le manteau qui les recouvre. Les sphérules de Ca semblent avoir, dans ce tissu, une localisation extracellulaire; CUÉNOT (1892) a observé une telle répartition du Ca dans le conjonctif des Pulmonés terrestres et aquatiques.

3. — Le *manteau* et la *glande digestive* de *R. parva* sont dépourvus de Ca histochimiquement décelable. Il faut souligner ici, contrairement à ce que l'on observe chez d'autres espèces, l'absence

de Ca dans l'ensemble du manteau. WAGGE (1951) insiste sur la réaction négative de l'épithélium palléal d'*Helix aspersa*. Ces réactions négatives dans la glande digestive et le manteau soulèvent le problème du calcium masqué qui a conduit certains auteurs (BEVELANDER, 1951, 1952; JODREY, 1953) à utiliser le radio-calcium.

B. — CYCLE DU CALCIUM DANS LE TISSU CONJONCTIF

Les tissus conjonctifs pédieux et viscéral présentent des réactions positives pour les animaux du groupe A :

— Sur 46 sujets, 41 ont donné une réaction positive pour les deux conjonctifs pédieux et viscéral, 1 a donné des réactions positives peu intenses au niveau de ces deux conjonctifs, et 4 enfin ont donné une réaction entièrement négative.

— Les animaux en phase B sont, statistiquement, plus pauvres en Ca : un peu plus du tiers des *Rissoa* testées se sont révélées négatives à toutes les réactions pratiquées. Dans une note préliminaire (GOSTAN, 1961), je signalais que 10 B sur 27 étudiées étaient dépourvues de sphérules calcaires. Ce taux (37 %) s'est maintenu après l'étude de 65 sujets en phase B :

23 sont Ca négatives pour les deux tissus conjonctifs

41 renferment du Ca dans les deux tissus conjonctifs

1 renferme du Ca dans le conjonctif viscéral seul, le conjonctif pédieux donnant une réaction négative.

On voit que si les *R. parva* A sont en grande majorité riches en sphérules calcaires, une forte proportion de sujets en phase B se montre dépourvue de Ca.

Les dépôts calcaires *deviennent permanents* après la construction de la côte terminale : 50 *R. parva* IV examinées se sont révélées riches en sphérules de Ca.

Le tableau suivant résume ces observations :

Coquille	Nombre	Ca +	Ca —
A	45	41	4
B	65	41	24
IV	50	50	0

C) DISCUSSION

Rôle du calcium du tissu conjonctif

L'abondance du calcium pendant la phase A et la pauvreté relative en Ca chez les *R. parva* B, suggèrent l'existence d'un cycle

comportant l'accumulation du Ca pendant la phase A et son épuisement au moment de la construction d'une côte; le Ca accumulé chez les *R. parva* A et les *R. parva* IV constituerait un produit de réserve. Dans cette interprétation, il apparaît que seul le tiers de la phase B est consacré pleinement à la construction de la côte; il m'a semblé intéressant de rechercher à quel moment précis se situait l'utilisation complète du Ca présent dans le tissu conjonctif.

L'observation des *Rissoa* au moment de la construction d'une côte permet de distinguer trois temps désignés par les symboles B1, B2 et B3.

B1 : le bord externe du péristome se soulève et dessine l'ébauche de la côte.

B2 : cette ébauche s'accroît en longueur tandis que commence l'épaississement de la nouvelle côte.

B3 : le comblement de la côte se poursuit et, au voisinage de la suture commence le nouvel allongement de la coquille qui se poursuivra en phase A.

Les côtes sont obliques par rapport au bord du péristome; la distance qui sépare le sommet d'une côte du bord libre du péristome est plus grande au niveau de la suture qu'à la base de la coquille. Les trois étapes B1, B2, B3 se chevauchent donc le long d'une côte. Cependant, l'étape B2 semble constituer une apogée dans la formation des côtes; il est tentant de penser que cette étape comporte l'épuisement des réserves de Ca du tissu conjonctif et que les 37 % d'individus dépourvus de Ca sont parvenus à la phase B2.

Les résultats des réactions de Stoelzner et du Ca Red appliquées à des *R. parva* classées en fonction de ces étapes sont rapportés dans le tableau suivant :

B1	11 +	3 —
B2	8 +	4 —
B3	4 +	2 —

On voit qu'aucune corrélation ne se dégage entre les trois divisions considérées et la présence de Ca dans le tissu conjonctif.

RÉSUMÉ

L'étude histochimique du calcium chez *R. parva* a montré que :

1. Les sels de Ca sont localisés exclusivement dans les tissus conjonctifs viscéral, pédieux et dans les conjonctifs situés au niveau de l'attache du manteau et des tentacules.

2. L'accumulation du Ca dans ces tissus évolue en fonction du cycle de construction des côtes : les sujets en phase A sont toujours riches en Ca; dans un tiers des sujets en phase B, le Ca du tissu conjonctif ne peut plus être mis en évidence. Cette observation pourrait confirmer une mobilisation importante du Ca, mobilisation nécessitée par l'allongement et la construction simultanée d'une côte.

3. Les dépôts de Ca du conjonctif sont permanents chez les sujets parvenus au terme de leur croissance en longueur (stade IV).

Les observations précédentes : situation du Ca dans un tissu classiquement considéré, chez les Mollusques, comme un tissu de réserve (BARGETON, 1942; CUÉNOT, 1892; LUBET, 1959; PRENANT, 1922), disparition dans certains cas, de ce calcium, incitent à penser qu'il existe un mouvement vers la coquille à partir de ces réserves.

Les rôles du glycogène et de la phosphatase alcaline dans la calcification étant importants, j'ai entrepris la recherche de ces composés dans les mêmes conditions que celle du Ca, sur des animaux classés d'après l'état de leur coquille en phase A, phase B ou stade IV.

2. — Etude des localisations des Polysaccharides

Les Polysaccharides jouent un rôle important dans les phénomènes de calcification chez les Vertébrés et les Invertébrés. Le glycogène, d'une part, les mucopolysaccharides acides (acide chondroïtine sulfurique) sont abondants au niveau des matrices de différents tissus devant être minéralisés : cartilage osseux, dents, organes otolithiques (BELANGER, 1960), écailles des Poissons (WALLIN, 1956), tégument des Crustacés (TRAVIS, 1960). Chez les Vertébrés, le glycogène, présent avant la minéralisation, disparaît à mesure que la calcification se poursuit (SOGNNAES, 1960). Il constituerait, grâce à son hydrolyse enzymatique, une source d'énergie utilisée pour la calcification des matrices organiques. TRAVIS signale la permanence du glycogène dans le tégument calcifié des Crustacés, caractère qui oppose les modalités de la calcification du squelette tégumentaire des Crustacés à celles de l'ossification par exemple.

La présence de glycogène et de mucopolysaccharides acides (MPA) dans le manteau des Mollusques a été observée par BEEDHAM (1958), TUZET, MANIER et GRAS (1958), KADO (1953), et interprétée par GUARDABASSI et PIACENZA (1958) comme une preuve de l'activité du manteau dans la construction de la coquille de *Helix pomatia*.

Il était donc intéressant de connaître les sites du glycogène et des mucopolysaccharides acides et neutres chez *R. parva* et d'étudier leur évolution au cours du cycle de construction des côtes.

Techniques

Les techniques mises en œuvre pour la détection des glucides sont, après fixation par les liquides de Gendre, de Helly, de Bouin, de Halmi et de Carnoy :

la réaction de Bauer et la réaction au carmin de Best avec contre-épreuve de la digestion salivaire, pour la mise en évidence du glycogène;

la réaction à l'acide periodique-Schiff (APS) selon McMANUS et selon LILLIE, employée seule ou combinée à la réaction de Stoelzner pour la détection simultanée des mucopolysaccharides neutre et du Ca. La réaction de l'APS a été combinée d'autre part à la réaction de Takamatsu-Gomori pour la mise en évidence des activités phosphatasiques alcalines (ACKERMAN, 1958);

la coloration par le bleu alcian suivie d'une coloration nucléaire au rouge solide ou de la réaction à l'APS, selon la technique de MOWRY (1956).

Résultats

A. — RÉPARTITION DES POLYSACCHARIDES

1) Glycogène

Le glycogène est réparti dans le tégument, paroi du corps, épithélium supérieur du manteau, dans les conjonctifs sous-jacents, le cartilage radulaire, la paroi stomacale, la glande digestive, le rein, les ganglions nerveux. Il est assez abondant dans les conjonctifs à cellules fixes, volumineuses, décrites précédemment, situées à la partie sus-operculaire du pied et entre les fibres musculaires. En raison de l'importance prépondérante du manteau dans la construction de la coquille, je décrirai de façon plus précise la répartition du glycogène dans les différents tissus qui le composent :

l'épithélium supérieur renferme, sur presque toute sa longueur, du glycogène; seule la région terminale de l'épithélium supérieur, c'est-à-dire l'épithélium supérieur du bourrelet palléal, en est dépourvue. Le glycogène peut être réparti dans toute la hauteur cellulaire ou confiné à la partie basale des cellules;

le conjonctif sous-épithélial est également riche en glycogène.

Dans ces deux tissus, une coupe sagittale du manteau montre l'existence d'un gradient de réactivité aux réactions de Bauer, Best

et à l'APS : la quantité de glycogène, très élevée dans l'épithélium supérieur et le conjonctif de la région médiane du manteau, diminue progressivement en direction du B.P.

Les tissus du bourrelet palléal, épithélium ou cellules glandulaires internes, sont négatifs aux différentes réactions mises en œuvre pour la détection du glycogène. La réaction de Bauer est positive au niveau de l'épithélium inférieur du B.P. et du reste du manteau mais l'épreuve de la digestion salivaire est sans effet sur la réaction.

On peut donc distinguer deux grandes régions dans le manteau :

la partie supérieure du manteau est riche en glycogène sauf dans le bourrelet palléal;

au contraire, la partie inférieure du manteau et le B.P. en sont dépourvus.

2) *Mucopolysaccharides*

Les réactions de détection des MPA sont positives au niveau des cellules muqueuses réparties dans la paroi du corps, en particulier dans l'épithélium du pied, dans les glandes salivaires, les glandes muqueuses antérieure et pariétale, la glande digestive, les cellules muqueuses des parois œsophagienne et intestinale; les glandes annexes de l'appareil génital femelle, l'utérus en particulier, sont riches en glucides. Dans les conjonctifs à glycogène et sphères calcaires, on observe également la présence de MPA : les cellules sont mêlées aux cellules riches en glycogène (photo n° 7).

La glande hypobranchiale, les cellules glandulaires à sécrétion en plaquettes du bord inférieur du manteau, la « cuticule » revêtant l'épithélium inférieur, sont colorées par le bleu alcian. La basale de l'épithélium inférieur est colorée par la fuchsine paraldéhyde (FP). Enfin, les formations glandulaires du B.P. donnent diversement les réactions des MPA : les cellules sécrétrices du B.P. droit, proche de l'attache du manteau, sont toujours colorées intensément et de façon diffuse. Les cellules de la glande du B.P. ont une réaction variable qui peut être APS positive ou FP positive; elles sont rarement colorées par le bleu alcian. La réaction à l'APS fait apparaître une coloration uniforme parfois limitée à la région supérieure des cellules; la FP colore leur cytoplasme en violet pâle et les granules de sécrétion en violet foncé. L'extrémité de la glande du B.P. prend alors une coloration rouge vif qui semble indiquer une évolution du produit de sécrétion parvenu à la surface du manteau. La coloration rouge après la FP est limitée exclusivement à cette région du manteau, située à la limite des épithéliums inférieur et supérieur; cette même partie du manteau est plus intensément marquée

par ^{45}Ca . L'épithélium supérieur du B.P. contient parfois des granulations violettes réparties dans la moitié apicale du cytoplasme. Enfin, les amœbocytes de la région proximale du B.P. sont APS positifs, la réaction colorant uniformément le cytoplasme; ils ne sont pas colorés par le bleu alcian.

B. — EVOLUTION DE LA TENEUR EN GLUCIDES

L'étude de la répartition des polysaccharides montre que, chez presque tous les sujets étudiés, la réaction de l'épithélium inférieur et des cellules glandulaires de la région du B.P. proche de l'attache varie peu. Au contraire, les tissus de la zone supérieure du manteau et la glande du B.P. donnent assez souvent des réactions négatives. Il était intéressant de préciser si la distribution des réactions positives de ces tissus présentait un rapport avec les phases du cycle de construction des côtes.

J'ai pratiqué les différentes méthodes de détection des polysaccharides dans le manteau des trois groupes de *R. parva* respectivement en phase A ou B, et chez des animaux parvenus au stade IV. Les résultats de ces réactions sont consignés dans la figure 4.

Discussion

La répartition des glucides dans le manteau de *R. parva* est comparable à celle qui a été décrite chez plusieurs espèces de Gastéropodes ou de Lamellibranches. BEVELANDER et BENZER (1948) observent des cellules muqueuses dans la région distale du manteau de quelques Lamellibranches. BEEDHAM (1958) signale en particulier la localisation du glycogène dans l'épithélium supérieur de la surface générale du manteau et l'existence d'un gradient glyco-génique décroissant vers l'extrémité du manteau. La distribution du glycogène chez les espèces étudiées par BEEDHAM est identique à celle de *R. parva* en ce qui concerne la richesse de l'épithélium supérieur, la différence entre l'épithélium supérieur « général » et celui du B.P.; la répartition intracellulaire du glycogène, uniforme ou limitée à la base des cellules, est également observée chez les Lamellibranches, chez *Helix pomatia* (KADO, 1953; TUZET, MANIER et GRAS, 1958; GUARDABASSI et PIACENZA, 1958) et semble être générale. La présence de glycogène dans le conjonctif sous-épithélial est aussi mentionnée par les mêmes auteurs.

On considère actuellement que le glycogène présent dans les tissus subissant ou participant à un phénomène de calcification

libère, par hydrolyse, de l'énergie qui est utilisée pour la synthèse des mucopolysaccharides acides de la trame organique des tissus calcifiés; l'hydrolyse du glycogène est accomplie grâce à l'action de la phosphatase alcaline, qui est également abondante dans les tissus en cours de calcification. TRAVIS (1960) voit dans le glycogène du tégument des Crustacés un substrat pour l'action de la phosphatase alcaline : « glycogen is only one of the necessary constituents involved in a whole substrate-enzyme complex during synthesis, elaboration, and calcification of organic matrices both in Crustacea and Vertebrata ».

Dans cette perspective, la recherche de l'activité phosphatasique alcaline constituait le complément logique de l'étude des Polysaccharides.

RÉSUMÉ

Les réactions des Polysaccharides mettent en évidence une ségrégation des mucopolysaccharides acides qui sont localisés dans le bourrelet palléal, et du glycogène, qui est réparti dans l'épithélium supérieur de la surface générale du manteau et le tissu conjonctif sous-jacent.

L'abondance des glucides du manteau varie en fonction de la croissance de la coquille : le manteau des *R. parva* au stade IV est plus riche en polysaccharides que celui des *Rissoa* jeunes en cours de croissance, mais n'accuse pas de variations de la teneur en glucides pendant les phases A et B.

La quantité de glucides dans les cellules du conjonctif pédieux ne semble pas être modifiée au cours de cette même croissance.

En conclusion, on peut retenir que, dans le manteau de *R. parva*, deux régions se distinguent par leur comportement vis-à-vis des réactions du glycogène d'une part, des mucopolysaccharides acides d'autre part. L'épithélium palléal et le conjonctif sous-jacent sont riches en glycogène, tandis que le complexe glandulaire du B.P. contient des musopolysaccharides acides.

On sait, d'après les travaux de MOYNIER DE VILLEPOIX (1892), RANSON (1952), BEVELANDER (1955), BEEDHAM (1958), chez les Lamellibranches, qu'une partie du bourrelet palléal est responsable de la formation du périostracum et de la couche des prismes, et que, au contraire, l'épithélium de la surface générale est en relation directe avec l'épaississement de la coquille. Chez *R. parva*, l'observation de différences histochimiques, ajoutée à une différenciation morphologique (chapitre II) entre les deux parties de l'épithélium supérieur du manteau semble indiquer que la formation de la coquille s'opère d'une façon analogue à celle qui a été observée chez

les Lamellibranches. Les travaux de MANIGAULT (1939) ont mis en évidence une corrélation entre l'activité phosphatasique alcaline et la construction de la coquille des Mollusques.

Ces données m'ont conduite à rechercher, chez *R. parva*, quels étaient les tissus qui manifestaient cette activité.

3. — Etude de l'activité phosphatasique alcaline

La phosphomonoestérase alcaline intervient dans l'ossification et dans la calcification des tissus des Invertébrés, coquille des Mollusques, tégument des Crustacés. Depuis les travaux de ROBISON (1923) et ceux de MANIGAULT (1939) sur les Mollusques, de nombreuses publications ont été consacrées au rôle joué par la phosphatase alcaline dans les tissus en voie de calcification.

ROCHE (1949), dans une revue des données sur l'activité phosphatasique dans le métabolisme du calcium, rappelle que chez la Sardine (*Clupea pilchardus*) « les écailles, très pauvres en phosphatases pendant la saison froide, deviennent environ vingt fois plus riches en enzyme dès le printemps, puis reprennent progressivement une activité phosphomonoestérasique alcaline très faible pendant l'été et l'automne. Or la vitesse de développement des écailles suit très sensiblement le même rythme que le taux de la phosphatase ». La croissance des os somatiques est également accompagnée d'une nette augmentation de cette activité; une forte activité phosphatasique alcaline caractérise les périodes de calcification des dents des Sélaciens. D'une manière générale, l'apparition d'une activité phosphatasique alcaline coïncide avec l'accumulation d'éléments minéraux.

Cette augmentation de l'activité enzymatique se produit chez les Mollusques, aux moments de croissance active de la coquille. Elle correspond également à certaines étapes du cycle d'intermue chez les Crustacés. Les couches extérieures du tégument s'enrichissent en phosphatase alcaline au moment de l'exuviation, moment où le liquide exuvial est alcalin (pH 9.4), (DENNELL, in WATERMAN, 1960).

MANIGAULT (1939) a montré, en utilisant des méthodes biochimiques, que l'activité phosphatasique alcaline de *Helix* et de *Haliotis* était maximale pendant les périodes de croissance de la coquille, croissance saisonnière. Plus récemment, GUARDABASSI et PIACENZA, dans une étude critique sur le rôle du manteau dans la construction de la coquille de *Helix pomatia*, ont démontré que l'épithélium supérieur du manteau était le siège d'une activité phosphatasique

alcaline intense chez l'animal amputé d'un fragment de coquille et qui le régénère. La présence de la phosphatase alcaline dans le manteau de ces espèces caractérise ainsi les périodes de croissance de la coquille.

Dans le cas de *R. parva*, chez qui la périodicité de la croissance se traduit morphologiquement par l'existence de côtes transversales, il était intéressant de rechercher si, à cette périodicité correspondait une variation de l'activité enzymatique du manteau et des autres tissus concernés par la construction de la coquille. J'ai opéré la recherche de la phosphatase alcaline sur 43 animaux à des stades divers de la croissance et du cycle de construction des côtes. La petite taille des *Rissoa* permet de ne pas limiter au manteau les coupes histologiques destinées à cette recherche, et en particulier d'étudier l'activité enzymatique des tissus conjonctifs qui sont le lieu de stockage du calcium pendant les périodes de croissance en longueur mais non en épaisseur (phase A) de la coquille.

Méthodes

Les animaux destinés à la pratique de la réaction de Gomori-Takamatsu ont été traités par la méthode de congélation-dissolution telle qu'elle est décrite dans le manuel d'histochimie de LISON (1960) et conseillée par GUARDABASI et PIACENZA (1958). Les animaux sont congelés dans le mélange carboglace-alcool éthylique à 90°, maintenu à la température de — 80 °C. Pour immerger les pièces dans le mélange et s'assurer une congélation rapide, j'ai confectionné de petits godets de « Sopalu », feuille d'aluminium très mince. Les godets sont placés à l'extrémité d'une longue tige du même « papier » d'aluminium; le refroidissement rapide de l'aluminium assure une congélation rapide des animaux qui sont collés instantanément à la feuille d'aluminium par de fins cristaux de glace. On les maintient dans ce bain à — 80° pendant cinq à dix minutes, après quoi les pièces sont transférées dans des pots à tare contenant de l'alcool absolu préalablement refroidi par le mélange carboglace-alcool. On laisse alors ces pots dans le mélange réfrigérant jusqu'à son réchauffement à la température ambiante. Le reste de la déshydratation est pratiqué rapidement, par deux bains d'alcool absolu de 30 minutes, suivis de trois bains de benzène de moins de dix minutes chacun. Le séjour à l'étuve est réduit à deux heures. Dès l'inclusion, les pièces sont mises à la glacière, à 4 °C, où elles demeurent jusqu'à la confection des coupes.

Le reste de l'opération est accompli le lendemain de la fixation suivant les prescriptions de LISON (1960), afin de réduire le plus possible la perte d'activité enzymatique. Toujours dans ce but, le séchage des coupes a été opéré à 4 °C : les lames sont rangées dans une boîte à préparations dans laquelle on place de l'actigel; les boîtes sont conservées à la glacière pendant trois à quatre heures, durée suffisante pour que les coupes soient bien sèches. Les coupes à 5 μ sont déparaffinées sans être chauffées.

J'ai préparé des jeux de lames identiques destinées à subir :

a) la réaction de Gomori, comportant l'incubation des coupes dans le substrat tamponné à pH 9.5 par addition de véronal sodique (traitement 1);

b) des réactions témoins permettant d'inhiber l'hydrolyse du substrat par l'enzyme, et qui sont :

la réaction de Gomori après destruction de l'enzyme par la chaleur : les lames sont exposées à la vapeur d'eau bouillante pendant quelques minutes (traitement 2);

la réaction de Gomori après traitement par un inhibiteur de l'activité phosphatasique : les auteurs recommandent l'action du complexon III « à faible concentration »; j'ai essayé d'obtenir cette inhibition de l'activité phosphatasique par traitement d'une heure à 37 °C dans une solution de complexon III à 4 pour cent avant l'incubation; ce traitement s'est avéré insuffisant pour provoquer l'inhibition de l'hydrolyse du glycérophosphate de sodium par la phosphatase alcaline (traitement 3);

la réaction de Gomori avec incubation dans une solution ne contenant pas de glycérophosphate de sodium (traitement 4).

c) La mise en évidence du calcium endogène a été pratiquée par la méthode de Stoelzner (traitement 5) complétée par la réaction témoin pratiquée après décalcification. La décalcification a été opérée soit par un bain de 30 minutes dans une solution de citrate d'ammonium à 10 pour cent, soit par un traitement de 15 minutes dans la solution de Greep, Fischer et Morse (1948), (traitements 5 et 6).

d) La méthode de Gomori a été complétée par la recherche du fer figuré, selon ARVY et GABE (1949), et par la recherche du fer seul comme réaction témoin. Ces deux réactions constituent les traitements 7 et 8.

e) Enfin, j'ai pratiqué la recherche simultanée de l'activité phosphatasique alcaline et des polysaccharides, selon la méthode d'ACKERMAN (1958), (traitement 9).

La recherche du fer s'étant avérée négative, les traitements 7 et 8 ont été abandonnés après quelques essais.

La réaction de Gomori (traitement 1) a été pratiquée sur trois lames, qui ont subi : la réaction de Gomori sans coloration de fond; la réaction de Gomori suivie d'une coloration nucléaire au rouge solide; la réaction de Gomori suivie d'une coloration de fond au P.I.C.

J'ai fixé 43 *R. parva* à des stades différents; les animaux au même stade ont été groupés par cinq dans un même bloc.

Les coupes correspondent donc régulièrement à plusieurs individus, ce qui assure la standardisation des réactions appliquées.

Résultats

On distingue sur les coupes traitées par la méthode de Gomori deux catégories de plages colorées en noir :

a) les premières sont uniformément colorées;

b) les autres comportent un réseau de sphérules plus ou moins

volumineuses, qui sont les sphérules de calcium mises en évidence par le traitement au nitrate de cobalt et au sulfure d'ammonium. Seules ces sphérules sont colorées après la réaction de Stoelzner (traitement 7).

Parmi les plages colorées de manière uniforme par le dépôt de sulfure de cobalt, toutes ne correspondent pas à des tissus ayant une activité phosphatasique alcaline; les traitements 2, 3, 4, qui inhibent tous l'activité de l'enzyme, et le traitement 5, comportant l'incubation dans une solution dépourvue de substrat, permettent d'éliminer ces réactions parasites.

La réaction de Gomori a permis de mettre en évidence une activité phosphatasique alcaline dans différents organes du tube digestif, de l'appareil génital et dans le manteau.

A. — LOCALISATIONS

Tube digestif

a) *Œsophage, estomac, intestin* : une activité phosphatasique alcaline intense caractérise les parois stomacale et intestinale. L'enzyme est mis en évidence dans la moitié apicale des cellules et, dans l'estomac, sur les couches muqueuses qui revêtent l'intérieur de la paroi, c'est-à-dire le « bouclier » contre lequel vient buter le stylet cristallin. La région ciliée de la paroi stomacale se révèle Gomori-négative. Le typhlosome comprend deux régions de réactions opposées, brusquement séparées. La répartition de l'activité phosphatasique dans la paroi de l'estomac de *R. parva* est analogue à celle que GABE et PRENANT (1949) ont décrite chez *Acanthochites fascicularis* : « les bandes ciliées de l'épithélium gastrique sont dépourvues de phosphatase. Les régions non ciliées donnent fortement la réaction; comme dans le cas de l'œsophage, la réaction est localisée au pôle apical de la cellule ».

La paroi intestinale donne également la réaction de Gomori; une réaction positive a été observée chez le Chiton par GABE et PRENANT, qui l'interprètent comme liée à la fonction d'absorption de la paroi intestinale.

Le rôle de la phosphatase alcaline dans l'absorption semble admis actuellement, mais a été contesté. CAPURRO et ZACCHEO (1953) estiment que la présence topographique de l'enzyme dans les épithéliums digestifs ne prouve pas sa contribution à l'absorption.

b) *Glande digestive* : la glande digestive de *R. parva* comprend deux catégories de cellules : les cellules excrétrices et les cellules

digestives (GOSTAN, 1960). La hauteur très différente de ces éléments donne à la lumière des tubules digestifs un contour irrégulier; les cellules excrétrices sont basses et larges, presque triangulaires en coupe; elles possèdent un volumineux noyau central sphérique, à chromatine disposée en bâtonnets et un nucléole central (photos 17, 19).

La réaction du cytoplasme apical des cellules excrétrices est intensément positive, alors que le cytoplasme basal est Gomori-négatif (photo 18). Le noyau présente une coloration noire suggérant une activité phosphatasique alcaline, activité dont la réalité dans les noyaux est controversée. Sur les coupes soumises au traitement 9 (Gomori-APS), la réaction du noyau est très atténuée alors que le cytoplasme apical conserve sa réaction positive. Les cellules excrétrices ont une réaction négative après le traitement 4, c'est-à-dire après la réaction témoin dans laquelle l'incubation se fait dans une solution dépourvue de glycérophosphate.

Les cellules digestives de *R. parva* ont les mêmes caractères que les éléments correspondants de *Helix pomatia* tels qu'ils ont été décrits par BILLET et MCGEE RUSSELL (1955), par ROSENBAUM et DITZION (1963), et que les cellules A de la glande digestive de *Patella* (PUGH, 1963).

Ce sont des éléments longs et étroits, dont la partie distale est légèrement renflée et dépasse dans la lumière des tubules digestifs. Ces cellules, riches en inclusions glucidiques, ont un noyau basal sphérique pauvre en chromatine. Elles donnent parfois une réaction Gomori-positive discrète, localisée au noyau et à certaines granulations et vacuoles.

La présence de la phosphatase alcaline dans la glande digestive des Gastéropodes a été signalée pour quelques espèces (*Helix*, *Haliotis*) mais elle n'est cependant pas de règle dans l'embranchement des Mollusques : GABE et PRENANT (1949b) ont constaté que la réaction de Gomori-Takamatsu était négative dans la glande digestive d'*Acanthochites fascicularis*. Les Pterotracheidae (GABE, 1952) présentent quatre catégories de cellules digestives, dont l'une est Gomori-positive.

Tractus génital

a) *Gonades* : les animaux étudiés, dont la gonade était peu développée, ont donné une réaction Gomori-négative.

O v a i r e : les noyaux sont colorés en gris après la réaction de Gomori, mais la coloration persiste sur les coupes témoins, montrant qu'elle n'est pas due à la présence de l'enzyme dans les noyaux des ovocytes.

Testicule : les noyaux des cellules mâles, à l'exception des spermatozoïdes, donnent discrètement la réaction de Takamatsu-Gomori.

L'activité phosphatasique alcaline des cellules germinales est variable. GENESI (1955) signale une réaction Gomori-positive des ovocytes de Patelle et de Fissurelle. *Acanthochites fascicularis* présente une réaction positive du nucléole des ovocytes et, dans le testicule, une réaction négative des spermatozoïdes mais une réaction positive des spermatogonies, spermatocytes et spermatides (GABE et PRENANT, 1949b).

ARVY (1957), dans une revue sur les phosphatases rappelle que « la présence de la phosphomonoestérase alcaline a été observée dans les nucléoles des ovocytes de divers Invertébrés; mais (que l'enzyme) manque dans la plupart des cytoplasmes oocytaires étudiés à ce point de vue ».

b) *Tractus génital femelle :* Les différents tronçons de l'oviducte et des glandes annexes de l'appareil génital femelle présentent, après le traitement 1, une étroite bande noire en bordure de la lumière, indiquant une activité phosphatasique alcaline limitée à la région apicale des cellules glandulaires.

c) *Tractus génital mâle :* le pénis et le canal déférent sont Gomori-négatifs.

Manteau

La réaction de Gomori-Takamatsu est positive au niveau des différents tissus qui constituent le manteau :

l'épithélium supérieur et une partie de l'épithélium inférieur; les cellules glandulaires du bourrelet palléal.

1. *L'épithélium supérieur* donne une réaction positive qui est restreinte à la partie apicale des cellules. La réaction est également positive sur le film superficiel qui recouvre les cellules épithéliales (photo 11).

L'activité phosphatasique décelée par la méthode Gomori est souvent limitée à une partie de l'épithélium palléal : on observe le plus fréquemment une réaction positive de l'épithélium supérieur de la surface générale du manteau; parfois au contraire, la réaction intéresse l'épithélium supérieur du B.P. proximal. Sur toutes les *Rissoa* dont l'épithélium a montré une activité phosphatasique alcaline, 2 seulement ont donné la réaction pour l'ensemble de l'épithélium supérieur. Je considérerai donc les deux fractions de cet

épithélium comme deux tissus différents (cf. description du manteau, chapitre II).

2. *Les cellules glandulaires* du bourrelet palléal sont Gomori positives dans quelques cas. Leur activité phosphatasique présente un gradient d'intensité, allant des cellules les plus profondes aux cellules les plus superficielles, qui donnent une réaction très intense. La réaction positive du complexe glandulaire peut coïncider (dans 2 *Rissoa* seulement) avec la réaction positive de l'épithélium supérieur du bourrelet palléal (photo 12).

3. *L'épithélium inférieur* est le plus souvent Gomori-négatif, ou donne une réaction positive limitée à quelques cellules voisines de la région de l'attache du manteau et à la région distale. *Le conjonctif sous-épithélial* s'est montré dépourvu d'activité phosphatasique alcaline chez tous les animaux étudiés.

4. Il faut remarquer que certaines *R. parva* (en général pendant la phase A) ont une réaction négative pour tous les tissus du manteau.

B. — CYCLE DE L'ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE ALCALINE

La répartition des sites Gomori-positifs dans le manteau de *R. parva*, répartition étudiée de la même manière que celle du Ca et des polysaccharides est résumée dans les figures 4 et 5. Le diagramme de la figure 4 a été construit d'après les résultats de la méthode de Takamatsu-Gomori, appliquée à 43 *R. parva*.

a) Au niveau de *l'épithélium supérieur* : la surface générale du manteau donne une réaction Gomori-positive chez les sujets dont la coquille est en cours de croissance (photo n° 11), la réaction semblant être indifférente à l'étape A ou B du cycle de construction des côtes : en effet, sur 13 individus à l'étape A, 6 ont donné la réaction de Gomori et sur 13 sujets à l'étape B, 8 ont donné cette réaction. Sur les 26 individus examinés, 14 se sont avérés dépourvus d'activité phosphomonoestérasique alcaline au niveau de l'épithélium supérieur.

L'activité phosphatasique alcaline persiste pendant la construction de la côte terminale. Lorsque la construction de cette côte est achevée, la réaction Gomori-positive de l'épithélium supérieur est fortement atténuée chez 2 individus, les 7 autres ayant une réaction négative. L'épithélium supérieur du B.P. distal montre, contrairement à l'épithélium externe de la surface générale, une réaction Gomori positive chez 2 individus sur 9.

1

Tissus du manteau	A	B	IV
Epithélium supérieur			
Conjonctif sous-épithélial			
Complexe gland. B.P.			
Epithélium inférieur B.P.	Cellules muqueuses réparties entre les cellules épithéliales banales		

2

Epithélium supérieur			
Epithélium supérieur B.P.			
Complexe glandulaire B.P.			
Epithélium inférieur B.P.			

FIG. 4. — Répartitions comparées des polysaccharides (1) et de l'activité phosphatasique alcaline (2) dans les tissus du manteau de *R. parva* :

- 1) Polysaccharides : en noir, le glycogène; en hâchures, les M.P.A.; en pointillés, les réactions de faible intensité; en blanc, les réactions négatives.
- 2) Phosphatase alcaline : en noir, réaction Gomori positive; en pointillés, réaction de faible intensité; en blanc, réaction négative.

La longueur totale des rectangles est proportionnelle au nombre d'animaux examinés.

b) Au niveau de l'épithélium supérieur du B.P. distal, on observe toujours une réaction négative chez les *R. parva* A, mais trois sujets sur 14 dont la coquille se présente en phase B, montrent une activité phosphatasique alcaline dans cette fraction de l'épithélium supérieur (photo 12).

c) Au niveau de la glande du B.P., la réaction de Gomori est le plus souvent négative chez les *R. parva* jeunes; quelques *R. parva* A donnent une réaction très discrète, un petit nombre de

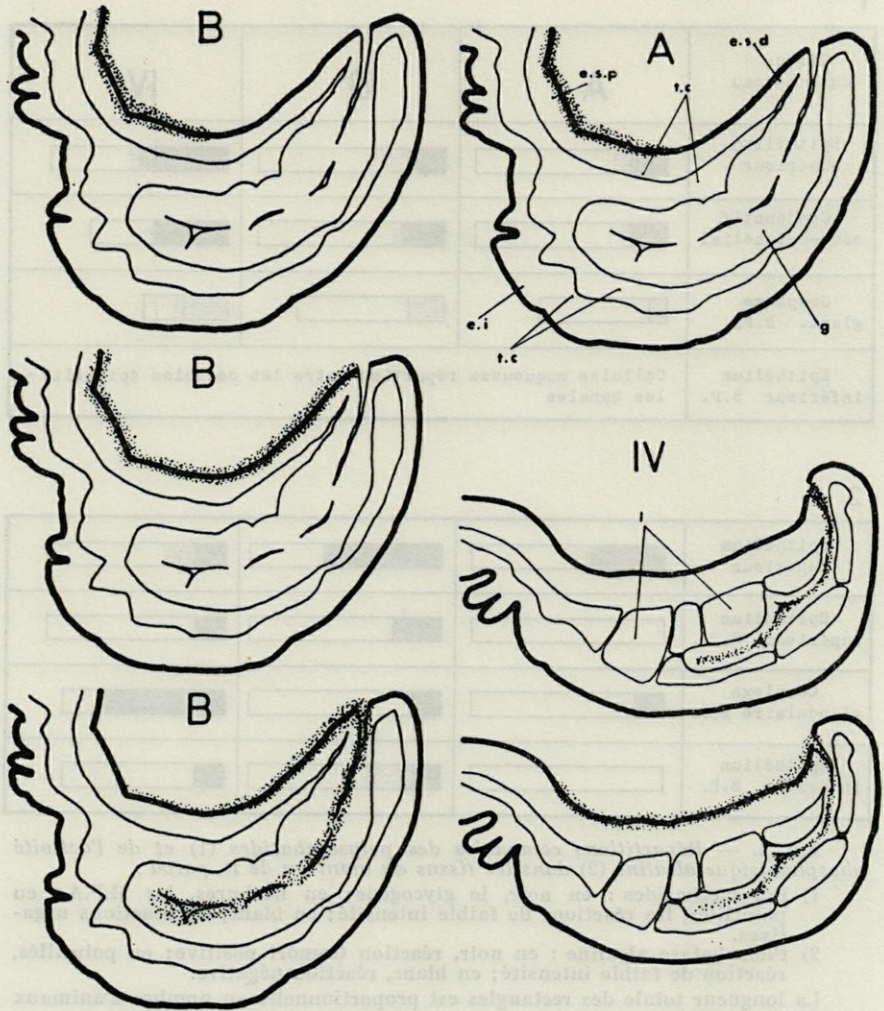


FIG. 5. — Répartition de l'activité phosphatasique alcaline dans le manteau de *R. parva* aux phases A et B et au stade IV : e.s.d, épithélium supérieur distal; e.s.p., épithélium supérieur proximal; g, glande du B.P.; e.i., épithélium inférieur; l., lacunes du conjonctif; t.c., tissu conjonctif.

R. parva B donnent une réaction franchement positive, mais pour la plupart, les A et les B sont dépourvues d'activité phosphatasique alcaline dans cette région du manteau. Au contraire, la glande du B.P. s'est révélée Gomori-positive chez la plupart des sujets au stade IV (photo 12).

En résumé, les figures 4 et 5 montrent que les sujets les plus pauvres en phosphatase alcaline sont en phase A. L'activité phosphatasique est confinée, chez ces animaux, à l'épithélium supérieur de la surface générale. D'autre part, les sujets dont le manteau s'est avéré le plus souvent Gomori-positif, sont répartis parmi les B et les IV. L'activité phosphatasique est localisée, chez les IV, à l'extrémité libre du manteau. Les *R. parva* B et, parmi les sujets du stade IV, ceux dont la côte terminale est inachevée, accusent une répartition plus ubiquiste de l'activité phosphomonoestérasique alcaline.

L'épithélium inférieur donne la réaction de Gomori chez un petit nombre d'animaux, mais de façon trop épisodique pour être rattachée à l'activité de formation de la coquille. On peut cependant remarquer qu'elle est toujours négative chez les animaux en phase A. Quand la réaction est positive, elle n'intéresse que l'épithélium inférieur distal et la région de l'attache du manteau. Le vert de méthyle - pyronine, employé à pH 4.7, confère aux cellules de cette région, longues et étroites, une coloration orange.

Résumé des observations sur l'activité phosphatasique alcaline.

Dans le tube digestif, une partie de la paroi stomacale, la paroi intestinale, la partie apicale des cellules excrétrices de la glande digestive, présentent une activité phosphatasique alcaline intense.

Dans le tractus génital femelle, seule la région apicale des cellules glandulaires des glandes annexes donne une discrète réaction positive. Le tractus génital mâle demeure Gomori négatif.

Dans le manteau, l'activité phosphatasique alcaline atteint son apogée chez les *R. parva* en phase B. On observe, d'autre part, une opposition entre la localisation, surtout épithéliale, de l'activité enzymatique chez les jeunes et sa localisation glandulaire chez les *Rissoa* parvenues au stade IV. Les deux territoires constitués par l'épithélium supérieur du manteau et par la glande du B.P. semblent se partager dans le temps les fonctions caractérisées par l'activité de la phosphatase alcaline.

Comparaison entre les localisations de l'activité phosphatasique alcaline dans le manteau de R. parva et d'autres espèces

a) *L'épithélium supérieur* : la localisation apicale de l'activité enzymatique dans les cellules de l'épithélium supérieur du manteau de *R. parva* est identique à celle qui est décrite par KADO (1954) pour cinq espèces de Lamellibranches, par LOVE et FROMMHAGEN (1953) pour *Mactra solidissima*, par GUARDABASSI et PIACENZA (1958) pour *Helix pomatia*, par GENESI (1955) chez *Patella* et *Fissurella*, mais non chez *Mytilus* où l'abondance des pigments mélaniques

rend difficile l'examen des coupes après la réaction de Gomori. BEEDHAM (1958) observe également une réaction négative de l'épithélium externe de *Mytilus*. Il signale au contraire une activité phosphatasique alcaline intense de l'épithélium palléal d'*Anodonta*, de *Cardium* et d'*Ostrea*. L'activité est maximale dans la région apicale des cellules. BOURNE (1943) constate que l'épithélium supérieur du manteau de *Mytilus* et de *Calliostoma* donne la réaction de Gomori.

Enfin, WAGGE (1951), travaillant sur *Helix aspersa* décrit la réaction négative de l'épithélium supérieur du manteau, résultat qui est controversé pour cette espèce.

La localisation de l'activité phosphatasique alcaline au pôle apical des cellules se retrouve dans le tégument des Crustacés TRAVIS, 1960).

La réaction Gomori-positive de l'épithélium palléal de *R. parva* est, comme nous l'avons vu, limitée à une partie de ce tissu. La même distinction de deux régions dans l'épithélium palléal est mentionnée par quelques auteurs :

KADO (1954) cite la réaction négative des hautes cellules de l'épithélium distal. BEEDHAM, au contraire, observe une réaction intense du pli externe du manteau de *Cardium edule*, *Anodonta cygnea*; la réaction décroît rapidement le long de l'épithélium de la surface générale.

GUARDABASSI et PIACENZA ne font pas allusion à une réaction partielle de l'épithélium palléal d'*Helix pomatia*.

La division de l'épithélium supérieur du manteau en deux zones définies par leurs caractères histochimiques semble donc être valable pour certaines espèces. BEEDHAM remarque d'ailleurs que les dissemblances histochimiques vont de pair avec une différenciation morphologique.

Nous avons vu que l'épithélium supérieur de *R. parva* est irrégulier : composé, dans la région médiane, de cellules très basses, il comprend des éléments cylindriques de hauteur régulière dans la région subterminale; ces éléments font place, dans la partie distale du B.P., à des cellules cubiques analogues à celles de l'épithélium inférieur. L'épithélium supérieur du bourrelet palléal distal est recouvert d'un film qui soude les extrémités des cellules. Or, le changement observé pour la réaction de Gomori coïncide avec cette frontière morphologique.

b) *Le conjonctif sous-épithélial* : la réaction négative observée chez *R. parva* confirme les résultats de GUARDABASSI et PIACENZA (1958), de KADO (1954) et de BEEDHAM (1958). Ces auteurs ont

constaté que la réaction de Gomori présentait, dans le manteau des Mollusques, une localisation inverse de celle du glycogène. La réaction McMANUS-positive du conjonctif sous-épithélial de *R. parva* correspond également à une zone Gomori-négative.

c) *La glande du bourrelet palléal* : l'activité phosphatasique de cette région du manteau n'a, à ma connaissance, pas été signalée dans les travaux concernant le manteau des Mollusques.

Discussion

Dans quelle mesure les résultats précédents confirment-ils l'existence d'un rythme dans le métabolisme et l'utilisation du Ca, rythme qui pourrait rendre compte de l'épaississement observé au moment de la construction des côtes ?

Avant de répondre à cette question, je rappellerai comment le rôle de la phosphatase alcaline est interprété dans la littérature.

1. — RÔLE DE LA PHOSPHOMONOESTÉRASE ALCALINE DANS LA CALCIFICATION

Différentes interprétations ont été proposées au sujet du rôle joué par la phosphatase alcaline dans la calcification. Pour certains auteurs, la présence de la phosphatase dans les tissus qui prennent part à la calcification ne prouve pas que l'enzyme intervienne à un moment quelconque dans les différentes réactions qui aboutissent au dépôt des sels de calcium. Nous verrons plus bas que BEVELANDER et coll. ont repris les données de MANIGAULT sur la relation entre l'activité phosphatasique du manteau et la croissance de la coquille, relation qui, selon ces auteurs, n'avait été que suggérée mais non prouvée.

Sans nier le rôle de la phosphatase dans les tissus calcifiés, de nombreux auteurs se sont attachés à l'interpréter à la lumière des connaissances acquises sur la participation de l'enzyme à des processus différents, ou dans des tissus qui ne subissent pas de calcification. Je citerai successivement les hypothèses concernant l'intervention de la phosphomonoestérase : dans les synthèses protidiques, et en particulier dans la synthèse de la conchyoline, dans les échanges de Ca (entre l'animal et le milieu d'une part, entre les tissus et la coquille d'autre part), enfin, dans la levée d'une inhibition de la calcification.

a. — *Rôle dans la synthèse de la conchyoline* : l'intervention de la phosphatase alcaline dans la synthèse des protéines a été signalée dans des espèces et des tissus très divers. ROCHE (1949) rappelle que « la formation des protéines, tant au cours du développement embryonnaire que dans des processus de régénération ou de sécrétion, est toujours accompagnée d'une activité phosphatase pouvant être liée à la participation de nucléoprotéides à cette synthèse ». BRACHET (1941), a mis en évidence le rôle des ribonucléines dans les synthèses protidiques. De nombreuses publications font état de la localisation simultanée de la phosphatase alcaline et de l'ARN dans des tissus participant à la synthèse de protéines. BRADFIELD (1951) a montré que la phosphatase est associée à la présence d'ARN dans les glandes séricigènes. BURSTONE (1960) confirme le rôle joué par l'enzyme dans l'élaboration de la matrice osseuse ou dentaire.

Dans le cas des Mollusques, on observe classiquement (KADO, 1954; BEEDHAM, 1958; GUARDABASSI et PIACENZA, 1958) la coïncidence des sites de l'ARN et de l'activité phosphatase alcaline. Au contraire, les mêmes auteurs font remarquer une opposition entre les localisations de l'enzyme et du glycogène. Même dans l'épithélium palléal où les réactions du glycogène et de la phosphatase alcaline sont positives, les territoires cellulaires respectivement intéressés ne coïncident pas, le glycogène étant basal, l'activité phosphatase apicale. Depuis BRACHET (1945) on explique le voisinage régulièrement constaté de la phosphatase alcaline et du glycogène par l'activité glycolytique de l'enzyme. L'identité des localisations de l'ARN et de la phosphatase alcaline dans les tissus en cours de différenciation est interprétée d'une manière analogue (BRADFIELD, 1951).

TRAVIS (1960) met l'accent sur la présence simultanée du glycogène et de la phosphatase alcaline qui constituent, dans le tégument des Crustacés, un complexe enzyme-substrat fournissant à la fois les composés et l'énergie nécessaires à la synthèse des protéines structurales du tégument. On sait que la phosphatase alcaline intervient dans l'hydrolyse, la phosphorylation des polysaccharides du manteau. WILBUR *et al.* (1957, 1960) inhibent la phosphorylation de ces composés par l'action du dinitrophénol et observent un arrêt de calcification chez *Crassostrea*.

En résumé, la présence simultanée de la phosphatase alcaline et de polysaccharides implique l'existence d'un processus de synthèse organique.

b. — *Absorption et transport* : une activité phosphatase observée en l'absence de polysaccharides correspond à une dégradation de molécules précédant la traversée des épithéliums; une

activité phosphatasique alcaline est observée au niveau des régions du tube digestif spécialisées dans l'absorption (BOURNE, 1943; GABE et PRENANT, 1949), de certaines parties du tube contourné du rein ou des organes homologues des Invertébrés : protonéphridies des Némertes ou des Planaires Triclades (DANIELLI et PANTIN, 1951), tubes de MALPIGHI (ARVY, 1957). A l'échelle histologique, on observe dans tous ces tissus une correspondance entre l'activité phosphatasique alcaline et une particularité morphologique, par exemple, l'existence d'une bordure en brosse. Dans les cellules, les corps de Golgi constituent le site électif de l'activité phosphatasique alcaline (MOOG et WENGER, 1952; ARVY, 1957; CHASE, 1963). L'activité phosphatasique alcaline des épithéliums excréteurs ou digestifs est étendue par KADO (1954) à l'absorption du Ca de l'eau de mer par l'épithélium du manteau d'un Lamellibranche d'eau douce.

Les données sur l'activité phosphomonoestérasique alcaline dans le transport des ions ou des molécules sont résumées par ARVY (1957) : « ce rôle est suggéré par l'abondance de l'enzyme en des points où de toute évidence se font d'importants échanges... Depuis les premières observations de TAKAMATSU-GOMORI (1938-1940), tous les chercheurs ont remarqué une localisation préférentielle de cet enzyme en des points où des transferts de molécules prédominent ».

c. — Enfin, certains voient la phosphatase alcaline comme une enzyme capable de lever une inhibition de la calcification. MARTIN, SCHIFFMANN *et al.*, dans une expérience sur la calcification *in vitro* de l'aorte, concluent : « some agent present in serum, an inhibitor of mineralization, is destroyed by the enzyme ».

2. — CHEZ *Rissoa parva*

L'étude de la répartition des polysaccharides et de l'activité phosphatasique alcaline dans le manteau a mis en évidence une distinction entre les deux régions de l'épithélium palléal constituées par l'épithélium supérieur du B.P. et celui de la surface générale : dans ces deux parties de l'épithélium supérieur, la réaction de Gomori est tour à tour positive. La réaction positive de l'épithélium supérieur distal est souvent associée à une réaction identique du complexe glandulaire du B.P.

La répartition de l'activité phosphatasique alcaline dans ces deux territoires est différente chez les *R. parva* en cours de croissance où elle intéresse l'épithélium supérieur de la surface générale du manteau et chez les animaux parvenus au stade IV où elle est limitée essentiellement au B.P. On peut donc penser que l'activité phosphatasique alcaline de l'épithélium supérieur général est liée

à la croissance de la coquille — synthèse de conchyoline et transport de Ca — et que cet épithélium est responsable de l'épaississement des côtes et des sillons récemment construits. La disparition de l'activité enzymatique chez les *R. parva* IV confirme indirectement le rôle de l'épithélium palléal.

S'il existe des fluctuations dans l'apport de Ca à la coquille pendant la phase B de la croissance, on pourrait s'attendre à ce que l'épithélium supérieur manifeste une périodicité de son activité enzymatique : or, la figure 4 montre que la fréquence des réactions Gomori positives chez les *R. parva* A est pratiquement identique à celle que l'on observe chez les B. La périodicité de la construction des côtes n'apparaît pas au travers de l'activité phosphatasique alcaline de l'épithélium supérieur du manteau.

Cependant, l'activité phosphatasique alcaline du B.P. n'apparaît qu'en phase B et devient maximale au stade IV. La coïncidence entre cette manifestation et la construction des côtes ou du bourrelet terminal suggère que le B.P. est l'agent de l'apport supplémentaire de Ca au moment de la construction des côtes.

Ce rôle est confirmé par la répartition du glycogène. La figure 4 montre que la fréquence des sujets riches en glycogène est plus élevée chez les animaux parvenus au stade IV : cette abondance serait consécutive à la disparition de la phosphatase alcaline; inversement, la pauvreté relative en glycogène des animaux en cours de croissance s'expliquerait par une glycolyse importante.

En conclusion de l'étude des sites du calcium, je me proposais de vérifier si la disparition du Ca de certains animaux en phase B pouvait correspondre à une modification histochimique du manteau. L'examen successif, chez les mêmes sujets, de coupes traitées par la méthode Gomori et par la réaction de Stoelzner montre qu'il n'est pas possible d'établir une corrélation entre l'activité phosphatasique alcaline du manteau et la présence ou l'absence de Ca dans les tissus conjonctifs.

RÉSUMÉ

Les résultats de l'application des méthodes de détection du Ca, des polysaccharides et de l'activité phosphatasique alcaline sont en résumé, les suivants :

1. Les sels de Ca sont localisés exclusivement dans les tissus conjonctifs pédieux et viscéral;
2. L'accumulation de Ca dans ces tissus évolue en fonction de la construction des côtes;
3. Les dépôts de Ca du tissu conjonctif sont permanents chez les *Rissoa* parvenues au stade IV;

4. Les réactions des polysaccharides ont mis en évidence une ségrégation des mucopolysaccharides, qui sont localisées dans le B.P., et du glycogène, qui est réparti dans l'épithélium supérieur de la surface générale du manteau;

5. L'abondance des glucides du manteau varie en fonction de la croissance de la coquille;

6. Postérieurement à l'allongement initial dû à l'activité du bourrelet palléal, la croissance de la coquille jeune (étapes I, II, III) se fait sous le contrôle de l'épithélium supérieur de la surface générale. A cette activité vient parfois s'ajouter celle de la glande du B.P. au moment de la construction des côtes. L'activité de la glande du B.P. devient prépondérante pendant l'épaississement de la coquille « adulte ».

Les variations de l'activité phosphatasique alcaline du manteau n'ont pas permis d'expliquer directement l'épuisement périodique du Ca des tissus conjonctifs. La paroi du corps et du manteau en contact avec le milieu extérieur ne présente pas une activité phosphatasique intense. Seul l'épithélium inférieur de quelques *R. parva* B et IV est partiellement Gomori positif, dans ses régions distale et proximale. Il est possible que ces régions Gomori-positives soient des points d'absorption du calcium (KADO, 1954).

Pour vérifier cette hypothèse et pour étudier le devenir du Ca des tissus conjonctifs, j'ai utilisé la méthode des traceurs radioactifs.

2. — Autoradiographie : utilisation de ^{45}Ca comme traceur

Technique

J'ai utilisé la méthode de Doniach et Pelc selon BOYD (1955) avec des plaques Kodak AR 10. Les *Rissoa* traitées par le calcium 45 sont fixées à l'alcool 95° après un rinçage à l'eau de mer ordinaire ayant pour but d'éliminer l'excès de Ca adsorbé sur le mucus recouvrant les parois du corps. Les coupes à 6 μ sont collées sur des lames préparées spécialement pour l'autoradiographie. Les lames déparaffinées et hydratées sont longuement rincées à l'eau distillée avant d'être recouvertes de l'émulsion pelliculable ou « stripping film ». L'exposition de l'émulsion dure deux semaines : les lames sont rangées dans des boîtes à préparations garnies d'actigel; ces boîtes sont disposées dans une caisse de bois ou de carton noir, étanche à la lumière, et placées en chambre froide (4 à 6 °C). La durée de l'exposition est choisie d'après les données bibliographiques; les auteurs qui pratiquent la technique autoradiographique avec un émetteur beta mou (^{35}S ; ^{14}C ; ^{45}Ca) indiquent souvent

une durée d'exposition de deux à quatre semaines; une exposition prolongée a l'inconvénient d'augmenter la densité du voile de fond.

Pour le développement, j'ai utilisé le révélateur Kodak D 19 b, dilué de son volume d'eau distillée; le fixage a été réalisé par une solution d'hyposulfite de sodium à 15 pour cent, solution dont l'emploi est recommandé par Boyd (1955). Développement, rinçage et fixage ont été effectués dans des boîtes de Laveran pour éviter que la pellicule, gonflée au moment du développement, ne se déplace.

Les lames fixées et rincées ont été colorées par le rouge nucléaire solide. J'ai essayé d'utiliser d'autres colorants : le jaune de méthanile, le bleu céleste, l'hématoxyline et ses variantes employés après le fixage; le jaune de méthanile ne colore que les cytoplasmes et les préparations sont ainsi beaucoup moins lisibles qu'après une coloration nucléaire; les autres colorants basiques que j'ai essayés ne conviennent pas pour des coupes intéressantes des organes très divers, comme le sont les coupes d'un animal entier; en effet, certains de ces organes sont trop intensément colorés, ce qui rend l'examen des ARG^{mes} plus délicat; ainsi, le bleu céleste, conseillé par Boyd, a l'inconvénient de donner une coloration métachromatique plus ou moins violette au niveau du conjonctif pédieux, risquant ainsi de gêner l'examen d'un éventuel autoradiogramme (ARG) à ce niveau; l'hématoxyline confère aux coupes une teinte proche du noir, et les ARG^{mes} ne sont pas suffisamment contrastés; le rouge solide s'est avéré le meilleur colorant et je l'ai employé de manière systématique en veillant à ne pas prolonger la coloration au-delà d'une minute; la gélatine portant l'émulsion est colorée en même temps que les coupes et il est nécessaire d'équilibrer les deux colorations pour que l'examen des préparations soit aisé. La gélatine doit être très légèrement teintée et les coupes doivent ressortir en rouge sur fond clair.

Après la coloration, les lames sont rincées à l'eau distillée, essorées légèrement et rangées horizontalement dans des boîtes à préparations contenant 100 à 200 g d'« actigel ». La déshydratation est effectuée de façon ménagée, pendant 12 à 24 heures, à la température du laboratoire. Les lames sèches sont éclaircies au xylène et montées au DePeX.

Expériences avec ⁴⁵Ca

Le calcium marqué a été ajouté à l'eau de mer dans laquelle étaient placées des *Rissoa*. Cette méthode est utilisée fréquemment pour l'étude de la pénétration des radio-éléments chez les animaux marins (ROCHE et col. 1960a, 1960b, 1963). Le premier problème posé par l'utilisation de ⁴⁵Ca dans ces conditions est le choix de l'activité de l'eau de mer d'élevage. J'ai pratiqué ce choix d'après les données de différents auteurs :

BEVELANDER et NAKAHARA (1960), étudiant la pénétration du calcium 45 dans l'œuf et la larve d'oursin adoptent une activité

de 100 μ Ci/ml d'EM. NAKANO, OKAZAKI et col. (1963), travaillant également sur l'œuf d'oursin, utilisent une activité beaucoup plus faible : 0,1 et 1 μ Ci de ^{45}Ca par ml d'eau de mer; SCHURR et STAMPER (1962) emploient ^{85}Sr et ^{45}Ca de façon à obtenir 10^{-4} μ Ci par ml d'EM où ils expérimentent sur *Cambarus longulus*. JODREY (1953) utilise ^{45}Ca pour étudier le dépôt de calcium dans la coquille des Lamellibranches sur des réparations manteau-coquille : l'activité de l'EM est de 3 à 6 μ Ci/litre, soit de 3 à 10^{-3} μ Ci/ml. La gamme de radioactivité de l'eau de mer additionnée de ^{45}Ca s'étend de 10^{-3} à 100 μ Ci par ml, dans le cas où les sujets sont immergés quelques heures dans l'eau radioactive, ou pour des préparations *in vitro* et des œufs ou des larves de petite taille.

Dans le cas où un élevage prolongé est réalisé, sur des Lamellibranches par exemple, BEEDHAM et TRUEMAN (1958) soumettent les animaux à un séjour dans une eau contenant de 200 μCi à 1 millicurie par ml, le radio-élément étant l'iode 131. J. ROCHE et col. (1960) emploient ^{131}I et l'ajoutent à l'EM de façon à obtenir une activité de 300 microcuries par ml pour élever des Moules, et 135 microcuries par ml pour un élevage de Bryozoaires. Enfin, BOROUGHS *et al.* emploient 612 $\mu\text{Ci/ml}$ EM dans un travail sur la pénétration de ^{90}Sr chez *Artemia salina*. D'une manière générale, les activités utilisées dans le cas d'élevages prolongés sont supérieures à celles qui sont employées pour des expériences de courte durée, la seconde variable étant la taille des animaux sur lesquels est faite l'expérimentation. Lorsque le radio-élément employé est de courte période, il est renouvelé fréquemment et ajusté à son activité d'origine.

J'ai pratiqué trois séries d'essais en ajoutant à un millilitre d'eau de mer une quantité de calcium donnant une activité finale de 0,1 - 1 - 10 microcuries par millilitre :

Activité de l'eau de mer égale à 0,1 $\mu\text{Ci/ml}$: cette activité a été obtenue en utilisant du $^{45}\text{CaCO}_3$ de faible activité; ce carbonate était transformé en chlorure par addition d' HCl 12 M; le poids de calcium ajouté à l'eau de mer constituait le facteur critique. L'eau de mer contient 400 mg de Ca par litre, et pour ne pas trop augmenter cette concentration, j'ai dû préparer des solutions ayant une activité de 0,1 microcurie par ml, soit une activité analogue à celle qu'utilisent NAKANO, OKAZAKI et IWAMATSU (1963) pour des œufs d'oursin. Cette activité s'étant révélée insuffisante pour fournir des images autoradiographiques, j'ai été conduite à l'accroître. Pour cela, deux solutions se présentaient : la préparation d'une eau de mer artificielle sans calcium ou l'utilisation de ^{45}Ca de haute activité spécifique.

Les *R. parva* placées dans de l'eau de mer artificielle sans calcium, préparée selon la formule d'OKAZAKI (1956) se rétractent

dans leur coquille et tombent au fond du cristalliseur. Elles ont le même comportement après un délai plus ou moins long, lorsque cette eau de mer est mélangée en proportions variables à de l'eau de mer naturelle. L'utilisation d'eau de mer artificielle n'est donc pas souhaitable pour des expériences d'une certaine durée.

J'ai donc été conduite à l'emploi de ^{45}Ca de haute activité spécifique, soit environ 1 millicurie par milligramme.

J'ai laissé séjourner des *Rissoa* un mois dans l'eau de mer à $2\ \mu\text{Ci/ml}$; 4 à 48 h dans l'EM à $10\ \mu\text{Ci/ml}$, et dans ces deux expériences, certains sujets ont été fixés immédiatement au sortir de l'eau de mer radioactive, tandis que d'autres ont été laissés 2 à 5 jours dans une eau ordinaire, renouvelée plusieurs fois au cours des premières heures, à des fins de rinçage.

Résultats

A) Difficultés rencontrées pour l'interprétation des autogrammes

L'image apparaissant après développement est composée : du voile de fond, de l'autochémoigramme (Boyd, 1949) et de l'autoradiogramme proprement dit. Pour éliminer les images parasites du voile de fond et de l'autochémoigramme, on doit préparer des lames témoins sur lesquelles sont disposées des coupes provenant de sujets qui n'ont jamais été en contact avec un radio-élément. Le voile de fond est d'autant plus important que les plaques sensibles sont de fabrication ancienne, et on utilise donc des plaques de fabrication récente. La lumière de la chambre noire où son effectués le « pelliculage » et le développement de l'émulsion doit être rouge et peu intense : j'ai utilisé un écran Kodak Wratten n° 2, la source de lumière étant disposée à 1,50 m du plan de travail.

L'autochémoigramme se présente différemment suivant la nature du tissu qui provoque sa formation :

- les glandes pédieuses donnent un chémoigramme très dense;
- les spermatozoïdes, mais non les cellules mâles plus jeunes, donnent au contraire des images composées de grains d'Ag réduit isolés (1 grain par spz.). Cet autochémoigramme se retrouve dans les voies génitales lorsqu'elles renferment des spermatozoïdes;
- des grains d'Ag isolés peuvent également suivre le contour du pied, de la cténide. Ils sont plus volumineux que ceux qui composent les traces et résultent vraisemblablement de la « fusion » de plusieurs grains voisins.

Ces grains « chimiques » se distinguent des traces par leur distribution : ils sont disposés sans ordre apparent, alors que les traces dues aux électrons émis par le calcium 45 ont une forme caractéristique, légèrement infléchie à l'extrémité. Elles sont courtes, comme toujours

dans le cas des rayonnements beta peu énergiques, et comprennent le plus souvent sept grains de plus en plus rapprochés.

Une autre catégorie d'images indépendantes de la présence de radioéléments est composée de points extrêmement ténus, formant un grisé qui borde la paroi œsophagienne, le conjonctif viscéral et parfois l'épithélium inférieur du manteau, les dents radulaires. Enfin, on observe sur quelques coupes des amas compacts en quelque sorte « surimposés », colorés en noir ou en divers tons de brun; ces amas sont localisés au bourrelet palléal, au fond du sillon qui sépare le manteau de la tête, aux contours du sac viscéral et à la « cuticule » de la paroi stomacale.

Ces artefacts ne se produisent pas toujours sur les préparations témoins et certaines figures observées sur les lames destinées à l'autoradiographie prêtent à confusion : en particulier, on voit sur certaines coupes de volumineuses taches noires dont le centre est absolument opaque; il faut examiner les bords de ces taches pour savoir si elles correspondent à un radio- ou à un chémogramme; la disposition des grains d'argent à la périphérie de ces amas permet de reconnaître la nature des images.

L'émulsion risque de se déplacer au cours du développement et les images qu'elle porte ne sont alors plus superposées aux coupes; l'autoradiogramme et les chémogrammes sont déplacés en même temps, mais certaines figures sont toujours solidaires des coupes : les masses compactes visibles sur le bourrelet palléal, la cténidie et le conjonctif viscéral appartiennent à cette dernière catégorie et on ne doit pas se méprendre sur leur origine.

Ces réserves étant faites, voyons quels ont été les résultats des expériences pratiquées sur *Rissoa parva*.

B) Observations

1) Essais dans une eau de mer dont l'activité est de 0,1 microcurie/ml

Dans une première expérience, l'eau de mer naturelle était additionnée de ^{45}Ca de faible activité spécifique et présentait une activité de 0,1 microcurie par ml, la concentration en Ca atteignant 110 % de la normale. J'ai placé des animaux dans 100 ml d'eau de mer radio-active et les ai fixés après 1, 2, 4 et 8 jours, la fixation étant précédée de plusieurs rinçages à l'eau de mer.

Les coupes provenant de ces *Rissoa* n'ayant fourni aucun autoradiogramme, j'ai été conduite à l'emploi de calcium 45 de haute activité spécifique, soit environ 1 millicurie par mg.

2) Essais dans une eau de mer de forte activité :

Le calcium est livré sous forme de chlorure. L'activité de 1 ml de $^{45}\text{CaCl}_2$ est de 2 millicuries. Cette formule permet, de plus, de

conserver à l'eau de mer une concentration normale en calcium. L'addition de 0,5 ml de chlorure de calcium radio-actif à 100 ml d'eau de mer donne une activité finale de 10 microcuries par millilitre.

J'ai laissé séjourner des *Rissoa* : un mois dans de l'eau de mer à 2 microcuries/ml; de quelques heures à deux jours dans de l'eau de mer à 10 microcuries par millilitre.

a) Les animaux conservés dans l'eau de mer à 2 microcuries par ml, pendant des périodes atteignant 4 semaines ont donné des autoradiogrammes diffus, et certaines n'ont montré aucune accumulation de calcium marqué; dans le cas le plus défavorable, les organes digestifs ont seuls été marqués. La localisation des images dans le tube digestif et principalement dans la lumière de ses différents organes (intestin, glande digestive) suggère que le calcium des *Rissoa parva* est d'origine alimentaire.

b) 10 microcuries par ml EM : après 4 h d'immersion dans l'eau de mer à 10 microcuries par ml, on note un autoradiogramme correspondant aux parois du pied et de la cavité palléale. Cependant, la radioactivité est surtout extérieure aux tissus et provient d'une adsorption de ^{45}Ca par le mucus revêtant les parois. Aussi cette contamination ne peut être considérée comme une localisation sélective du calcium. Le manteau et les organes internes ne sont pas marqués, à l'exception de l'intestin postérieur dont le contenu est radio-actif.

Après 18 h, l'autoradiogramme montre un début de pénétration du calcium marqué. Sont contaminés : le contenu de la glande digestive (photo n° 16), la paroi intestinale et, dans le manteau, la glande du bourrelet palléal; l'épithélium supérieur du manteau est dépourvu de ^{45}Ca ; le conjonctif pédieux et le conjonctif viscéral ne donnent pas d'autoradiogramme.

Après 48 h d'immersion, les images autoradiographiques reproduisent, avec plus d'intensité, les précédentes : le tube digestif dans son ensemble donne un autoradiogramme (ARG), le muscle columellaire est discrètement marqué; le manteau contient du calcium en faible quantité dans l'épithélium supérieur et dans les cellules glandulaires du B.P. Les traces sont plus denses distalement et la limite des épithéliums inférieur et supérieur est fortement marquée. Dans le tégument et dans les cellules glandulaires du B.P., la densité des traces est fonction de celle des cellules. On n'observe pas de traces dans les conjonctifs pédieux et viscéral.

Dans l'expérience précédente, les *Rissoa* étaient fixées, après quelques rinçages, au sortir de l'eau de mer radioactive. Afin de

mettre en évidence le déplacement éventuel du calcium dans les tissus, j'ai laissé quelques animaux en eau de mer non marquée.

3) 48 h en eau de mer ordinaire

Les autoradiogrammes montrent alors que le tube digestif n'est plus contaminé dans son ensemble, la paroi stomacale ne présente plus de traces, la paroi oesophagienne semble marquée plus discrètement ; l'intestin et la glande digestive sont toujours fortement contaminés : le calcium ne semble pas être localisé électivement dans les deux catégories de cellules de la glande digestive ; la densité des traces est homogène dans ces deux types d'éléments et dans la lumière des tubules ; on remarque cependant une concentration plus forte des traces à la limite des lobes voisins ; la base de l'épithélium digestif et le conjonctif interlobulaire sont plus riches en Ca que le reste de la glande.

Une deuxième différence doit être signalée au niveau du manteau : l'épithélium supérieur ne fournit plus d'autoradiogramme bien défini ; le B.P. semble moins riche en ^{45}Ca mais une estimation plus précise ne peut être faite étant donnée la quantité relativement faible de calcium fixé par la glande du B.P.

Enfin, le muscle columellaire donne toujours un autoradiogramme diffus, tandis que les conjonctifs à sphérules calcaires ne sont pas marqués.

En résumé, l'addition du traceur de haute activité spécifique à l'eau de mer naturelle présente l'avantage de ne pas modifier la concentration du Ca total et de pratiquer un élevage qui ne perturbe pas la vie des *Rissoa* ; l'utilisation de ^{45}Ca dans ces conditions paraît la plus satisfaisante pour observer l'incorporation du calcium dans les tissus de *R. parva*. Il s'est avéré que l'activité de l'eau de mer doit être égale au moins à 10 microcuries par ml pour que les autoradiogrammes des différents tissus et en particulier du manteau soient bien définis.

Les autoradiogrammes obtenus à partir d'animaux qui ont séjourné 4 heures dans l'eau de mer radio-active sont diffus. Par la suite, les organes sont marqués avec une intensité variable :

la glande digestive et l'intestin sont les organes les plus riches en ^{45}Ca ;

le calcium pénètre dans le manteau après son adsorption par l'épithélium inférieur ;

le tégument est plus ou moins contaminé suivant sa densité cellulaire ;

les conjonctifs pédieux, viscéral, de l'attache du manteau ou des tentacules n'ont pas été contaminés après 48 heures.

DISCUSSION

A. — ABSORPTION DU CALCIUM

L'absorption du Ca de l'eau de mer par les Invertébrés est un fait classiquement reconnu. ROBERTSON (1941) a montré, dans une revue sur le métabolisme du calcium chez les Invertébrés, que « direct absorption of calcium is possible in most and perhaps all aquatic invertebrates, and is probably the more important of two sources of this element for skeleton formation. This absorption may take place only at well defined intervals in the life cycle, as is the case in Crustacea ». ROBERTSON rappelle les observations de BOYCOTT (1936), et celles de MORISSON (1932), selon lesquelles les espèces de Mollusques qui vivent dans une eau « dure » ont des coquilles plus lourdes et plus volumineuses que celles qui vivent en eau douce ; ROBERTSON attribue cette différence de taille à l'absorption du Ca, qui est plus abondant en eau de mer qu'en eau douce.

Les travaux de SCHOFFENIELS (1951), de WILBUR, JODREY *et al.*, de BEVELANDER (1951-1952) ont montré que du calcium 45 ajouté à l'eau était rapidement absorbé par les Lamellibranches et incorporé à la coquille.

L'absorption du ^{45}Ca dans le cas de *R. parva* se fait par tout le tégument, mais plus particulièrement par l'épithélium du manteau : dans un premier temps, le calcium est adsorbé en grande quantité par l'épithélium inférieur, puis il gagne la glande du B.P. et l'épithélium supérieur.

FRETTER (1952) signale que les autoradiogrammes d'*Helix*, *Arion* et *Agriolimax* jeunes sont plus denses que ceux des sujets adultes. Chez *R. parva*, les régions où l'épithélium superficiel est composé de cellules cylindriques donnent lieu à la formation d'un autoradiogramme plus dense que les régions où le même épithélium est constitué de cellules cubiques. De même, on remarque que dans les tubules de la glande digestive et dans la glande du B.P., la densité des traces est plus importante en regard du noyau. FRETTER a pu vérifier que ^{32}P s'accumule dans les noyaux. WAGGE (1951, 1955) signale la localisation intranucléaire du calcium dans les amœbocytes d'*Helix aspersa*. D'après l'analogie des observations concernant *R. parva* avec celles de WAGGE et de FRETTER, on peut penser que le calcium marqué est également localisé, chez *R. parva*, dans les noyaux.

L'absorption dans des sites autres que le manteau, par exemple dans les parois du pied et du mufle, n'est pas propre à *R. parva* :

SCHOFFENIELS (1951), après avoir effectué des mesures de vitesse de pénétration de ^{45}Ca chez l'Anodonte, a observé que le pied est le point de passage le plus important.

A la voie directe de l'absorption du calcium par le manteau et le tégument, j'ai vérifié s'il s'ajoutait une assimilation par la voie alimentaire. Dans ce but, des *Rissoa* ont reçu comme nourriture des Algues calcaires contaminées par immersion dans l'eau de mer à 10 microcuries de ^{45}Ca par ml. Les *Rissoa* sont elles-mêmes placées dans de l'eau non radio-active. Fixées au bout de six jours, elles présentent des débris d'algues dans l'estomac, mais ne montrent pas de contamination de la paroi stomacale; aucun autre organe n'est marqué.

Cette expérience prouve que l'autoradiogramme toujours observé dans les parois du tube digestif n'a pas pour origine une alimentation solide, mais qu'il est dû à une assimilation digestive du Ca de l'eau de mer.

B. — TRANSPORT ET RÉPARTITION

HIRATA (1953) a mis au point une technique d'étude dans laquelle les rôles du manteau et des autres organes dans l'apport des éléments nécessaires à la construction de la coquille sont dissociés par l'utilisation d'une préparation « manteau-coquille » comprenant une des valves et le manteau, les autres organes étant supprimés. HIRATA, puis JODREY (1953), ont montré, grâce à cette technique, que le manteau était capable d'assurer, dans ces conditions, le dépôt de calcaire et de conchyoline dans la valve à laquelle il est attaché, mais que cet apport constituait alors seulement 1/9 du dépôt effectué dans un même temps par un animal entier. La quantité de Ca directement absorbée par le manteau est donc insuffisante pour permettre la croissance normale de la coquille. Une quantité importante est transportée dans le manteau à partir d'autres organes.

Chez les Pulmonés terrestres, une notable fraction du calcium utilisé pour la croissance ou la régénération de la coquille provient de la glande digestive (BARFURTH, 1881; WAGGE, 1951; ABOLINŠ-KROGIS, 1961, 1963). ABOLINŠ-KROGIS a décrit l'extrusion de calcium et de différentes particules à travers la paroi basale des cellules de la glande digestive d'*Helix pomatia* et leur passage dans le conjonctif adjacent.

D'autre part, FRETTER (1952) a observé la pénétration de ^{32}P dans la glande digestive, son accumulation au niveau des cellules calcaires et son passage par les cellules digestives d'où il se rend dans le sang.

Dans le cas de *R. parva*, l'accumulation de ^{45}Ca observée à la périphérie des tubules digestifs et sa répartition diffuse dans le muscle sont à rapprocher des observations de JODREY (1953) sur l'insuffisance de l'absorption du calcium par le manteau pour les besoins de la croissance de la coquille.

On peut remarquer ici que le traceur n'a pas pénétré dans les tissus conjonctifs à sphérules calcaires, ce qui montre la stabilité, dans ces tissus, du calcium histochimiquement décelable. Il semblerait donc que le taux de renouvellement ou « turnover » des sphérules est faible et que l'apport de ce calcium au manteau est problématique. Cette observation confirmerait les données de CUÉNOT (1892) et de MANIGAULT (1939), quant à la nature de déchet du Ca du tissu conjonctif.

Une deuxième contradiction est observée entre les résultats apportés par les méthodes histochimiques et ceux des expériences faites avec ^{45}Ca : la présence de calcium marqué dans la glande digestive et dans le manteau. On peut penser, par conséquent, que dans ces organes, le calcium est lié à des protéines. Nous avons vu que, chez les *R. parva* fixées 48 heures après leur sortie de l'eau de mer radio-active, l'épithélium supérieur du manteau est fortement appauvri en ^{45}Ca . Au contraire, la glande du bourrelet palléal conserve encore une certaine radio-activité. Cette observation, jointe au fait que le calcium du manteau est masqué, et que l'épithélium palléal présente une activité phosphatasique alcaline intense, permet de penser que le calcium 45 traverse l'épithélium supérieur du manteau pour être incorporé à la coquille.

RÉSUMÉ

Des expériences utilisant ^{45}Ca comme traceur ont permis d'observer la pénétration du radio-élément ajouté à l'eau de mer. Les organes marqués avec une intensité variable sont, par ordre décroissant : la glande digestive, l'intestin, le manteau.

Ces organes sont habituellement négatifs vis-à-vis des réactions du calcium. On n'a pas pu, inversement, mettre en évidence un renouvellement du calcium des tissus conjonctifs.

Enfin, le calcium marqué ne séjourne pas longtemps dans l'épithélium supérieur du manteau. Étant donnée l'activité phosphatasique alcaline remarquée au niveau de cet épithélium, il est probable que le calcium traverse l'épithélium supérieur pour être utilisé à la construction de la coquille.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Ce travail concerne l'étude de la morphogénèse de la coquille d'un Gastéropode, *Rissoa parva* Da Costa. La coquille de *R. parva* est ornée, sur une partie de sa longueur, de côtes transversales et comprend une côte terminale particulière. Je me suis intéressée, d'une part, aux aspects cycliques de la construction des côtes, et, d'autre part, aux conditions de l'arrêt de la croissance, matérialisé par la formation de la côte terminale.

L'étude biologique de *R. parva* m'a permis de constater que :

- 1) la croissance de la coquille s'effectue suivant un mode continu, sans marquer de ralentissement au moment de la construction des côtes; 2) la formation de la côte terminale, survenant quatre à cinq mois après la métamorphose, est suivie d'un épaississement de la coquille, qui subit alors un accroissement pondéral important; 3) le développement de la coquille subit l'influence de facteurs externes : l'été constitue la saison déterminante pour la croissance de cette espèce annuelle; au contraire, la croissance et la régénération de la coquille sont fortement ralenties en automne.

L'étude du développement de l'appareil génital, réalisée en fonction des étapes de croissance de la coquille, a montré que :

- 1) l'acquisition de la maturité sexuelle et la construction de la côte terminale sont deux phénomènes indépendants : les sujets « bordés » peuvent présenter un tractus génital indifférencié; inversement, un certain nombre d'animaux en cours de croissance sont sexuellement mûrs; 2) les formes à développement génital accéléré apparaissent en hiver. Le plus fort pourcentage d'immatures est observé en automne. L'influence des facteurs saisonniers est donc déterminante pour l'ensemble du développement de *Rissoa parva*.

Parallèlement aux étapes du développement de la coquille, j'ai observé la différenciation d'un complexe glandulaire dans le bourrelet palléal :

a) le manteau des individus jeunes, à coquille lisse, possède un bourrelet palléal peu épais; b) pendant toute la période de construction des côtes, le bourrelet palléal, très développé, renferme

un complexe glandulaire qui débouche à la limite des épithéliums inférieur et supérieur du manteau; *c*) ce complexe, dont le produit de sécrétion est un mucopolysaccharide acide, subit une involution après la fin de la croissance en longueur de la coquille; *d*) au terme de cette dégénérescence, le bourrelet palléal des *R. parva* du stade IV (porteuses de la côte terminale), présente une structure lacuneuse et renferme de nombreux amœbocytes. Le complexe glandulaire du bourrelet palléal est fonctionnel pendant la période d'accroissement comportant la construction périodique des côtes et pendant une partie de la période d'accroissement en épaisseur. Sa dégénérescence chez un certain nombre d'animaux dont la croissance est achevée constitue un signe de sénilité.

L'étude des aspects cycliques de la formation de la coquille a comporté la recherche systématique, en fonction des phases de croissance, du calcium, des glucides et de l'activité phosphatasique alcaline :

1. La présence de calcium a été décelée dans les tissus conjonctifs viscéral et pédieux, et au niveau de l'attache du manteau ou des tentacules. Le calcium est réparti, sous forme de sphérules réfringentes, dans de volumineuses cellules évoquant les cellules de Leydig. Dans le conjonctif viscéral, les sphérules calcaires semblent être extracellulaires. Les méthodes histochimiques n'ont pas permis de révéler la présence de Ca dans le manteau et dans la glande digestive. L'utilisation de ^{45}Ca montre que le traceur pénètre cependant dans ces organes : il s'agit donc vraisemblablement de calcium masqué, appartenant à un complexe organique.

2. L'étude de la répartition des glucides a mis en évidence une accumulation de glycogène et de mucoprotéines au niveau des cellules conjonctives contenant du calcium, confirmant ainsi la fonction de réserve du tissu conjonctif. D'autre part, les réactions des polysaccharides ont permis de reconnaître une spécialisation des tissus du manteau : l'épithélium supérieur de la surface générale et le conjonctif sous-jacent renferment du glycogène. L'épithélium supérieur et les cellules glandulaires du bourrelet palléal sont riches en mucopolysaccharides acides.

3. La spécialisation de ces régions apparaît également en ce qui concerne la répartition de l'activité phosphatasique alcaline : la réaction de Gomori-Takamatsu est tour à tour positive au niveau de l'épithélium supérieur du repli palléal ou dans les cellules glandulaires du bourrelet palléal.

De l'étude réalisée en fonction des différentes phases de croissance de la coquille, il est apparu que : *a*) les *R. parva* classées en phase A (bord externe du péristome mince) ou au stade IV (côte terminale) sont toujours riches en Ca, tandis que les tissus conjonctifs d'un tiers des sujets en phase B (bord externe du péristome

épais) sont dépourvus de sphérules calcaires; b) l'abondance des glucides dans le manteau est maximale chez les animaux parvenus au stade IV; c) l'activité phosphatasique alcaline qui intéresse différents tissus du manteau chez les *R. parva* B, est limitée, pour les sujets en phase A, à l'épithélium supérieur de la surface générale et, pour les individus parvenus au stade IV, au bourrelet palléal. La présence simultanée de glycogène ou de mucopolysaccharides acides et de la phosphatase alcaline traduisant une activité synthétique, les réactions pratiquées permettent de conclure que tout l'épithélium supérieur du manteau et le bourrelet palléal participent à l'élaboration de la coquille de *R. parva*.

Le bourrelet palléal est habituellement considéré comme responsable de l'accroissement en longueur de la coquille. Mes observations concernant son évolution morphologique, jointes aux résultats des réactions histochimiques, confirment, chez *Rissoa parva*, ce rôle du bourrelet palléal. Mais, de plus, chez cette espèce, il s'est avéré que le bourrelet palléal prend part également à la croissance du test en épaisseur.

L'épithélium palléal présente aussi un cycle d'activité phosphatasique alcaline, mais ce cycle ne pouvant être mis en parallèle avec la périodicité de l'ornementation, on ne peut décider si cette activité est liée plus particulièrement à l'un des deux types d'accroissement.

D'une façon générale, les recherches de corrélations entre l'activité de différents tissus et la périodicité de construction des côtes n'ont pas permis de dégager un organe électif qui puisse être immanquablement considéré comme l'agent responsable de l'ornementation de la coquille de *R. parva*. Cependant, à travers la complexité de l'activité du manteau, le bourrelet palléal, de par son complexe glandulaire, apparaît comme un des premiers sites impliqués dans l'élaboration des côtes.

RÉSUMÉ

Ce travail est consacré à l'étude de la morphogenèse de la coquille de *Rissoa parva* Da Costa. *R. parva* est une espèce annuelle, vivant dans la zone intercotidale. Sa coquille présente des côtes transversales et une côte terminale plus épaisse.

Les observations réalisées sur des récoltes et sur des élevages ont montré que la durée moyenne de la période de croissance est de 3 à 4 mois et que la croissance s'effectue selon un mode continu, sans ralentissement au moment de la construction des côtes.

L'étude du développement de l'appareil génital, conduite en fonction des étapes de croissance de la coquille, a permis de conclure à l'absence d'une corrélation entre ces deux aspects du développement de *R. parva* : après l'arrêt de la croissance, l'appareil génital peut être complètement développé ou au contraire indifférencié. Le développement de l'appareil génital est plus rapide en hiver qu'en été. Le tractus génital est construit à partir de deux ébauches distinctes, celle de la gonade et celle du pénis ou de l'utérus.

La seconde partie de ce travail comporte l'étude morphologique et histochimique du manteau en liaison avec les étapes de croissance de la coquille. Il existe une corrélation entre le développement d'un complexe glandulaire situé dans le bourrelet palléal et les étapes de croissance de la coquille : glande inorganisée au stade I (coquille lisse), glande fonctionnelle pendant la période de construction des côtes, glande en involution après la construction de la côte terminale (stade IV). La dégénérescence de ce complexe au stade IV constitue un signe de sénilité.

Parallèlement au cycle de construction des côtes, j'ai étudié la répartition du Ca, des glucides et de l'activité phosphatasique alcaline. Le tissu conjonctif du pied, composé de volumineuses cellules fixes, est un site de réserve du calcium et de polysaccharides acides et neutres. Des expériences utilisant le calcium marqué ont montré que le calcium du tissu conjonctif pédieux et viscéral présentait un taux de renouvellement très faible, voire nul. Au contraire, le calcium du manteau et de la glande digestive, appartenant à un complexe organique, est rapidement renouvelé. Le manteau renferme du glycogène dans l'épithélium palléal. La présence de glycogène, jointe à une activité phosphatasique alcaline, traduit l'existence de fonctions de synthèse : l'épithélium palléal des individus en cours

de croissance présente ces caractères, qui disparaissent une fois la croissance en longueur achevée. L'activité phosphatasique alcaline est limitée, chez les sujets porteurs de la côte terminale, au bourrelet palléal. L'épaississement de la coquille après la fin de la croissance en longueur est dû à l'activité synthétique du bourrelet palléal. La régression du complexe glandulaire du bourrelet palléal traduit vraisemblablement la fin de l'évolution du manteau et la perte de ses fonctions synthétiques.

SUMMARY

This work deals with the shell-morphogenesis of *Rissoa parva* Da Costa. *R. parva* is an annual species living by the sea-shore. Its shell bears transverse ribs and a thicker labial rib.

The observations made on animals in nature and in the laboratory showed that shell-growth takes about 3 to 4 months and is a continuous process, without slowing down at the time of rib formation.

There is no correlation between sexual maturity and the stages of shell-development; the genital system can be fully developed or undifferentiated when shell-growth is finished. The development of the genital system is faster in winter than in summer. The genital tractus derives from two embryonic structures, the gonad and the penis or the capsule gland.

The second part of this work deals with the morphology and histochemistry of the mantle, relative to the stages of shell-development. There is a correlation between the development of a glandular complex in the mantle edge and the stages of shell development: the gland is unorganized during stage I (ribless shell), functional during the period of rib formation (stages II and III) and degenerates after the labial rib is formed. The degeneration of this gland in stage IV is a mark of senility.

I have studied histochemically the sites of Ca, polysaccharides and alkaline phosphatase activity throughout the cycle of rib formation. The connective tissue of the foot, composed of large, not wandering cells, is a reserve - site for Ca and for neutral and/or acid polysaccharide. Experiments with ^{45}Ca have shown that the Ca spherules in the connective tissue have a very low turnover rate. On the other hand, Ca in the digestive gland and in the mantle, which forms part of an organic complex, has a high turnover rate. The mantle contains glycogen in the outer epithelium. The presence of glycogen, together with alkaline phosphatase activity indicates synthetic activity. The general outer surface epithelium has these

characters in young animals but not in the older ones, whose shell-growth is complete. Alkaline phosphatase activity is then limited to the mantle edge. Shell-thickening which takes place in old animals is due to the synthetic activity of the mantle edge. The disappearance of the glandular complex might indicate the end of mantle evolution and the loss of its synthetic functions.

BIBLIOGRAPHIE

- ABELOOS, M., 1944. Recherches expérimentales sur la croissance. La croissance des Mollusques Arionidés. *Bull. biol. Fr. Belg.*, 78 : 215-76.
- ABOLINŠ-KROGIS, A., 1961. The histochemistry of the hepatopancreas of *Helix pomatia* (L.) in relation to the regeneration of the shell. *Ark. Zool. Sverige*, 13 (2-3) : 159-201.
- ABOLINŠ-KROGIS, A., 1963a. Some features of the chemical composition of isolated cytoplasmic inclusions from the cells of the hepatopancreas of *Helix pomatia* (L.). *Ark. Zool. Sverige*, 15 (28) : 393-429.
- ABOLINŠ-KROGIS, A., 1963b. The morphological and chemical basis of the initiation of calcification in the regenerating shell of *Helix pomatia* (L.). *Acta Univ. Uppsal.*, 20 : 1-22.
- ACKERMAN, G.A., 1958. A combined alkaline phosphatase - PAS staining method. *Stain Technol., USA*, 33 (6) : 269-71.
- ANKEL, W.E., 1936. Prosobranchia. In GRIMPE (G.) und WAGLER (E.) : Die Tierwelt der Nord- und Ostsee, IX. Leipzig, Akad. Verlagsgesellschaft.
- ARVY, L., 1957. Les techniques actuelles d'histoencyzmologie. *Biol. med. Fr.*, 46 (2) : 141-238.
- ARVY, L., 1962. L'ABC de la pratique histoencyzmologique. *Laval Med.*, 33 : 708-816.
- ARVY, L., et M. GABE, 1949. Mise en évidence simultanée du fer figuré et de la phosphatase alcaline sur coupes à la paraffine. *Bull. histol. appl. et tech. microscop.*, 26 (9) : 189-91.
- BARFURTH, D., 1881. Der Kalk in der Leber der Heliciden und seine Bedeutung. *Zool. Anz.*, IV : 20-23.
- BARGETON, M., 1942. Les variations saisonnières du tissu conjonctif vésiculeux de l'huître. *Bull. biol. Fr. Belg.*, 76 (2) : 175-91.
- BEEDHAM, G.E., 1958. Observations on the mantle of the Lamellibranchia. *Quart. J. micr. Sci. G.B.*, 99 (2) : 181-97.
- BELANGER, L.F., 1960. Development, structure and composition of the otolithic organs in the Rat. In SOGGNAES, R.F. : Calcification in biological systems. *Amer. Assoc. Advance. Sci.*, 64 : 151-62.
- BELL, L.G.E., 1952. The application of freezing and drying techniques in cytology. *Internation. Rev. Cytol.*, 1 : 35-64.
- BEVELANDER, G., 1951. Calcification in molluscs : I. The localization of Ca^{45} and P^{32} in the mantle and regenerating shell. *Biol. Bull.*, 101 : 197-98.
- BEVELANDER, G., 1952. Calcification in molluscs. III. Intake and deposition of Ca^{45} and P^{32} in relation to shell formation. *Biol. Bull.*, 102 : 9-15.
- BEVELANDER, G., 1953. Interrelations between protein elaboration and calcification in molluscs. *Anat. Rec. USA*, 117 : 568.

- BEVELANDER, G. and P. BENZER, 1948. Calcification in marine molluscs. *Biol. Bull.*, **94** : 176-83.
- BEVELANDER, G. and H. NAKAHARA, 1960. Development of the sand-dollar (*Echinarachnius parma*). In SOGGNAES, R.F.: Calcification in biological systems. *Amer. Assoc. Advance. Sci.*, **64** : 41-56.
- BILLET, F. and S.M. Mc GEE RUSSELL, 1955. The histochemical localization of beta-glucuronidase in the digestive gland of the roman snail, *Helix pomatia*. *Quart. J. micr. Sci. G.B.*, **96** : 35-48.
- BOURNE, G., 1943. The distribution of alkaline phosphatase in various tissues. *Quart. J. exper. Physiol. G.B.*, **32** : 1-21.
- BOYCOTT, A.E., 1936. The habitats of freshwater Mollusca in Britain. *J. Anim. Ecol.*, **5** : 116-86.
- BOYD, G.A., 1955. Autoradiography in biology and medicine. Acad. Press, N.Y.
- BRACHET, J., 1941. La détection histochimique et le microdosage des acides pentosenucléiques. *Enzymologia*, **10** : 87-96.
- BRADFIELD, J.R.G., 1951. Phosphatases and nucleic acids in silk glands : cytochemical aspects of fibrillar protein secretion. *Quart. J. micr. Sci., G.B.*, **92** : 87-112.
- BREGENZER, A., 1916. Anatomie und Histologie von *Bythinella dunkeri*. *Zool. Jahrb. Abt. Anat. Ontog.*, **39** : 237-93.
- BUCQUOY, E., P. DAUTZENBERG et G.F. DOLLFUS, 1882. Les Mollusques marins du Roussillon.
- BURSTONE, M.S., 1960. Hydrolytic enzymes in dentinogenesis and osteogenesis. In SOGGNAES, R.F. : Calcification in biological systems. *Amer. Assoc. Advance. Sci.*, **64** : 217-43.
- CAPURRO, G.M.S. e D. ZACCHEO, 1953. Ricerche sulla presenza di fosfatasi alcalina in tessuti ed organi di Molluschi (*Octopus vulgaris*). *Boll. Soc. it. Biol. sper.*, **29** : 382-85.
- CHASE, W.H., 1963. The demonstration of alkaline phosphatase activity in frozen-dried mouse gut in the electron microscope. *J. Histochem. Cytochem.*, **11** (1) : 96-101.
- CHÉTAIL, M., 1963. Etude de la régénération du tentacule oculaire chez un Arionidae (*Arion rufus* L.) et un Limacidae (*Agriolimax agrestis* L.). *Arch. Anat. micr. Morphol. expér.*, **51** (1) : 129-203.
- CORNET, R. et I. MARCHE-MARCHAD, 1951. Inventaire de la faune marine de Roscoff. *Travaux de la Station biologique de Roscoff*, suppl. 5.
- CUÉNOT, L., 1892. Etudes physiologiques sur les Gastéropodes pulmonés. *Arch. Biol.*, **12** : 683-734.
- DAHL, L.K., 1952. A simple and sensitive histochemical method for calcium. *Proc. Soc. exper. Biol., N.Y.*, **80** : 474-79.
- DANIELLI, J.F. and C.F.A. PANTIN, 1950. Alkaline phosphatase in protonephridia of terrestrial Nemertines and Planarians. *Quart. J. micr. Sci., G.B.*, **91** (2) : 209-14.
- DONIACH, L., and S.R. PELC, 1950. Autoradiographic technique. *Brit. J. Radiol.*, **23** : 184-92.
- DRACH, P., 1956. Divers types de croissance des Gastéropodes Proso-branches. Proc. XIV Int. Congress Zool., Copenhagen, 1953.
- FRETTER, V., 1939. The structure and function of the alimentary canal of some Tectibranch Molluscs, with a note on excretion. *Trans. roy. Soc., Edinburgh*, **59** (3) : 599-646.
- FRETTER, V., 1948. The structure and life history of some minute Proso-branches of rock pools. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, **27** (3) : 597-632.
- FRETTER, V., 1952. Experiments with ³²P and ¹³¹I on species of *Helix*, *Arion*, and *Agriolimax*. *Quart. J. micr. Sci.*, **93** (2) : 133-47.

- FRETTER, V., and A. GRAHAM, 1962. British Prosobranch Molluscs. Ray Society, London.
- FROUTIN, G.H., 1937. Contribution à l'étude du tissu conjonctif des Mollusques et plus particulièrement des Lamellibranches et des Gastéropodes. *Arch. Zool. expér. gén.*, Paris, 30 : 7-163.
- GABE, M., 1952. Contribution à l'étude histologique de l'appareil digestif des Pterotracheidae (Hétéropodes). *Cellule, Belg.*, 54 : 363-96.
- GABE, M., 1953a. Particularités morphologiques des cellules neurosécrétrices chez quelques Prosobranches monotocardes. *C.R. Ac. Sci., Fr.*, 236 : 323-25.
- GABE, M., 1953b. Sur quelques applications de la coloration par la fuch-sine paraldéhyde. *Bull. Micr. appl., Fr.*, 2 (3) : 153-62.
- GABE, M., 1954. La neurosécrétion chez les Invertébrés. *Année biol. Fr.*, (3), 30 : 6-62.
- GABE, M. et M. PRENANT, 1949a. Données histologiques sur le tissu conjonctif des Polyplacophores. *Arch. Anat. micr. Morphol. expér. Fr.*, 38 (1) : 65-78.
- GABE, M. et M. PRENANT, 1949b. Données histochimiques sur les phosphatases alcalines chez *Acanthochites fascicularis*. *Experientia, Suisse*, 5 (12) : 476-77.
- GENESI, M., 1955. Localizzazione delle fosfatasi acida ed alcalina e di sostanze Schiff positive in Lamellibranchi e Gasteropodi marini, *Mytilus, Patella, Fissurella*. *Riv. Biol., N.S.*, 47 (1) : 97-106.
- GOSTAN, G., 1958. Corrélation entre la croissance de la coquille d'un Prosobranch (*Rissoa parva* Da Costa) et le développement des organes internes. *C.R. Ac. Sci., Fr.*, 247 : 2193-95.
- GOSTAN, G., 1960. Répartition des polysaccharides chez *Rissoa parva* (Gastéropode Prosobranch). *Bull. Soc. zool. Fr.*, 85, 181-88.
- GOSTAN, G., 1961. Les réserves de calcium au cours de la croissance de la coquille de *Rissoa parva* (Gastéropode Prosobranch). *C.R. Ac. Sci. Fr.*, 252 : 1869-70.
- GRASSÉ, P.P., 1960. *Traité de Zoologie*, Masson, Paris, vol. V (2), Mollusques.
- GREEP, R.O., C. FISCHER and A. MORSE, 1948. Alkaline phosphatase in odontogenesis and osteogenesis and its histochemical demonstration after demineralization. *J. Amer. Dent. Assoc.*, 36, 427-42.
- GUARDABASSI, A. et M.L. PIACENZA, 1958. Le manteau de l'escargot *Helix pomatia*. Etude cytologique et histochimique. *Arch. Anat. micr. Morphol. expér.*, 47 (1) : 25-46.
- HAYASI, K., 1938. Detection of calcium in molluscan mantles. I. *Anodonta* and *Cristaria*. *Annot. Zool. Jap.*, 17 : 95-103.
- HAYASI, K., 1939. Detection of calcium in molluscan mantles. II. *Euhadra calluzona amaliae* Kobelt. *Annot. Zool. Jap.*, 18 : 1-7.
- HIRATA, A., 1953. Studies on shell formation. II. A mantle-shell preparation for in vitro studies. *Biol. Bull.*, 104 (3) : 394-97.
- JEFFREYS, J.G., 1867. *British Mollusca*, IV. London.
- JODREY, L., 1953. Studies on shell formation. III. Measurement of Ca deposition in shell and calcium turnover in mantle tissue using the mantle-shell preparation and Ca^{45} . *Biol. Bull.*, 104 : 398-407.
- JOHANSSON, J., 1939. Anatomische Studien über die Gastropodenfamilien *Rissoidae* und *Littorinidae*. *Zool. Bidr. Uppsala*, 18, 287-396.

- KADO, Y., 1953. Distribution of polysaccharides in mantle tissues of *Venerupis semidecussata*. *J. Sci. Hiroshima Univ. Zool.*, **14**, 259-264.
- KADO, Y., 1954. The distribution of alkaline phosphatase in mantle tissue of Bivalves. *J. Sci. Hiroshima Univ. Zool.*, **15**: 183-88.
- KRAUSE, E., 1960. Untersuchungen über die Neurosekretion im Schlundring von *Helix pomatia* L. *Z. Zellforsch. mikr. Anat. Dtsch.*, **51** (6) : 748-76.
- LANZA, B. e E. MURA, 1957. Dicalcificazione e ricalcificazione della limacca *Milax gagates* Draparnaud. *Monit. zool. ital.*, **64** (3) : 149-56.
- LEBOUR, M.V., 1934. Rissoid larvae as food for the young herring. The eggs and larvae of the Plymouth Rissoidae. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, **19** (2) : 523-39.
- LEVER, J., M. KOK, E. MEULEMAN and J. JOOSSE, 1961. On the location of Gomori-positive neurosecretory cells in the central ganglia of *Lymnaea stagnalis*. *Kkl. Nederl. Acad. Wetensch. Amster.*, **64** (5) : 640-47.
- LINKE, O., 1933. Morphologie und Physiologie des Genitalapparatus des Nordsee-littorinen. *Wiss. Meeresuntersuch. Abt. Heligol. N.F.*, **19** (5) : 1-60.
- LISON, L., 1960. Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes. Gauthier-Villars, Paris.
- LOVE, R. and L.H. FROMMHAGEN, 1953. Histochemical studies on the clam, *Macra solidissima*. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **83**: 838-44.
- LUBET, P., 1956. Effets de l'ablation des centres nerveux sur l'émission des gamètes chez *Mytilus edulis* L. et *Chlamys varia* L., Mollusques, Lamellibranches. *Ann. Sci. nat.*, 11^e série, **18** (2) : 175-83.
- LUBET, P., 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés. *Revue Trav. Inst. Pêches marit.*, **23** (4) : 395-547.
- MC GEE RUSSELL, S.M., 1954. A cytological study of the tissues concerned with the secretion of shell in the snail *Helix*. D. phil. Thesis, Univ. Oxford; cité par FRETTER et GRAHAM, 1962.
- MC GEE RUSSELL, S.M., 1957. Tissues for assessing histochemical methods for calcium. *Quart. J. micr. Sci. G.B.*, **98** (1) : 1-8.
- MC GEE RUSSELL, S.M., 1958. Histochemical methods for calcium. *J. Histochem. Cytochem.*, **7**: 22-42.
- MANIGAUULT, P., 1939. Recherches sur le calcaire chez les Mollusques. Phosphatase et précipitation calcique. Histochimie du calcium. *Ann. Inst. Océanogr.*, **18**: 331-426.
- MARONEY, S.P. Jr, A.A. BARBER and K.M. WILBUR, 1957. Studies on shell formation. VI : The effects of dinitrophenol on mantle respiration and shell deposition. *Biol. Bull.*, **112** (1) : 92-96.
- MARTIN, G.R., E. SCHIFFMANN, H.A. BLADEN, and M. NYLEN, 1963. Chemical and morphological studies of the *in vitro* calcification of the aorta. *J. Cell Biology*, **16** (2) : 243-52.
- MOOG, F., and E.L. WENGER, 1952. The occurrence of a neutral mucopolysaccharide at sites of high alkaline phosphatase activity. *Amer. J. Anat.*, **90**: 339-77.
- MOORE, H.B., 1936. The biology of *Purpura lapillus*. *J. mar. biol. Assoc. U.K.*, **21** (1), 61-68.
- MOORE, H.B., 1937. The biology of *Littorina littorea*. *J. mar. biol. Assoc. U.K.*, **21** (2) : 721-42.
- MORRISON, J.P.E., 1932. A report on the Mollusca of the northeastern Wisconsin District. *Trans. Wis. Acad. Sci. Arts Lett.*, **27**: 359-96.

- MOWRY, R.W., 1956. Alcian blue techniques for the histochemical study of acidic carbohydrates. *J. Histochem. Cytochem.*, 4: 407.
- MOWRY, R.W., 1960. Revised method producing improved coloration of acidic polysaccharides with Alcian Blue 8GX supplied currently. *J. Histochem. Cytochem.*, 8: 323-24.
- MOYNIER DE VILLEPOIX, R., 1892. Recherches sur la formation de la coquille des Mollusques. *J. de l'Anat. et de la Physiol.*, 28: 461-515 et 582-674.
- NAKANO, E., K. OKAZAKI and T. IWAMATSU, 1963. Accumulation of radioactive calcium in larvae of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Biol. Bull.*, 125 (1) : 125-32.
- OKAZAKI, K., 1956. Skeleton formation of sea urchin larvae. I: Effect of Ca concentration of the medium. *Biol. Bull.*, 110 (3) : 320-33.
- PELSENEER, P., 1932. La métamorphose pré-adulte des Cypreidae. *Bull. biol. Fr. Belg.*, 66 (2) : 149-63.
- PRENANT, M., 1922. Recherches sur le parenchyme des Plathelminthes. Essai d'histologie comparée. *Arch. Zool. expér. gén.*, V : 180 p.
- PRENANT, M., 1924. Contribution à l'étude cytologique du calcaire. I : Quelques formations calcaires du conjonctif chez les Gastéropodes. *Bull. biol. Fr. Belg.*, 58 : 331-78.
- PUGH, D., 1963. The cytology of the digestive and salivary glands of the limpet, *Patella*. *Quart. J. micr. Sci.*, 104 (1) : 23-38.
- RANSON, G., 1952. Les huîtres et le calcaire. Calcaire et substratum organique chez les mollusques et quelques autres invertébrés marins. *C.R. Ac. Sci.*, 234 : 1485-87.
- ROBERTSON, J.D., 1941. The function and metabolism of calcium in the invertebrata. *Biol. Rev.*, 16 : 106-33.
- ROBISON, R., 1923. The possible significance of hexose phosphate esters in ossification. *Biochem. J.*, 17 : 286-93.
- ROCHE, J., 1947. Les phosphatases dans le métabolisme du calcium. *Ann. nutr. aliment.*, 1 (1) : 1-30.
- ROCHE, J., S. ANDRÉ et I. COVELLI, 1960. Sur la fixation de l'iode par la moule (*Mytilus galloprovincialis*) et la nature des combinaisons iodées élaborées. *C.R. Soc. Biol., Fr.*, 154 (12) : 2201-06.
- ROCHE, J., S. ANDRÉ et I. COVELLI, 1963. Sur la fixation et l'assimilation de l'iode ¹³¹I par un Bryozoaire, *Bugula neritina*. *C.R. Soc. Biol. Fr.*, 156 (11) : 1817-22.
- ROCHE, J., S. ANDRÉ et G. SALVATORE, 1960. Métabolisme de l'iode ¹³¹I et formation de la scléroprotéine iodée (gorgonine) du squelette corné chez *Eunicella verrucosa* Pallas. *Comp. Biochem. Physiol., G.B.*, 1, 286-92.
- RUSSELL, E.S., 1909. On the shell-growth of the limpet *Patella vulgata*. *Proc. Zool. Soc. London*, 235-53.
- SCHOFFENIELS, E., 1951. Mise en évidence par l'utilisation du radio-calcium, d'un mécanisme d'absorption du calcium à partir du milieu extérieur chez l'Anodonte. *Arch. Internat. Physiol.*, 58 (4) : 467-72.
- SCHURR, J.M. and M.N. STAMPER, 1962. Model for the accumulation of Sr and Ca by recently molted crayfish, *Cambarus longulus longirostris* Ort. *Limnol. Oceanogr.*, 7 (4) : 474-77.
- SEIBOLD, W., 1904. Anatomie von *Vitrella Quenstedtii* Wiedersheim. *Jahres. Verein. vaterl. Naturk. Württemberg*, 198-225.

- SMIDT, E., 1938. Notes on the reproduction and rate of growth in *Rissoa membranacea* Adams (Gastropoda Prosobranchia) in the Sound. *Vidensk. Medd. Naturh. Foren. Kbh.*, 102 : 169-81.
- SOGGNAES, R.F., 1960. Calcification in biological systems. *Amer. Assoc. Advance. Sci.*, 64.
- STARMÜHLNER, F., 1955. Zur Molluskenfauna des Felslittorals und submariner Höhlen am Capo di Sorrento. *Osterr. Zool. Zeitschr.*, 6 (1/2) : 127-249.
- THIELE, J., 1931. Handbuch des Systematischen Weichtierkunde. Jena.
- THORSON, G., 1946. Reproduction and larval development of Danish marine bottom invertebrates. C.A. Reitzels forlag, Kobenhavn.
- TOURAINÉ, E., 1953. Le développement de l'appareil reproducteur mâle de *Nucella lapillus* L. Dipl. Etudes Sup. Paris.
- TRAVIS, D.F., 1960. Matrix and mineral deposition in skeletal structures of the Decapod Crustacea. In SOGNAES : Calcification in biological systems. *Amer. Assoc. Advance. Sci.*, 64 : 57-116.
- TUZET, O., J.F. MANIER et J. GRAS, 1959. Localisation du glycogène dans le manteau de quelques Lamellibranches. *Bull. Inst. Océanogr. Monaco*, 1153 : 1-9.
- VAN MOL, J.J., 1960. Etude histologique de la glande céphalique au cours de la croissance chez *Arion rufus* L. *Ann. Soc. r. Belg.*, 91 (1) : 45-55.
- WAELE, A. DE, 1930. Le sang d'*Anodonta cygnea* et la formation de la coquille. *Nouv. Mém. Cl. Sci. Acad. roy. Belg.*, 2^e série, 10 : 1-51.
- WAGGE, L.E., 1951. The activity of amoebocytes and of alkaline phosphatase during the regeneration of the shell in the snail, *Helix aspersa*. *Quart. J. micr. Sci. G.B.*, 92 (3) : 307-21.
- WAGGE, L.E., 1955. Amoebocytes. *Internat. Rev. Cytology*, 4 : 31-78.
- WALLIN, O., 1956. Mucopolysaccharides and the calcification of the scale of the roach *Leuciscus rutilus*. *Quart. J. micr. Sci., G.B.*, 97 : 329-32.
- WATERMAN, T.H., 1960. The physiology of Crustacea. Academic Press, N.Y.
- WAUTIER, J., M. PAVANS DE CECCATTY, M. RICHARDOT, B. BUISSON et M.L. HERNANDEZ, 1961. Note sur les complexes neuro-endocriniens de *Gundlachia* sp. (Mollusque Ancyliidae). *Bull. mens. Soc. Linn. Lyon*, 30 (4) : 79-87.
- WAUTIER, J., M. PAVANS DE CECCATTY, M. RICHARDOT, B. BUISSON et M.L. HERNANDEZ, 1962a. Les étapes de la croissance chez *Gundlachia* sp. (Moll. Ancyliidae). *Bull. mens. Soc. Linn. Lyon*, 31 (3) : 70-73.
- WAUTIER, J., M. PAVANS DE CECCATTY, M. RICHARDOT, B. BUISSON et M.L. HERNANDEZ, 1962b. Histo-physiologie des corrélations neuro-hormonales lors du cycle sexuel de *Gundlachia* sp. *Bull. mens. Soc. Linn. Lyon*, 31 (3) : 84-92.
- WILBUR, K.M., 1960. Shell structure and mineralization in Molluscs. In SOGNAES, R.F. : Calcification in biological systems. *Amer. Assoc. Advance. Sci.*, 64 : 15-39.

Reçu le 10 avril 1965.

SWARTZ, E. 1932. Notes on the reproduction and rate of growth in *Rissoa* (*Planorbis*) *parva* Adams (Gastropoda: Prosobranchia) in the Sound. Vidensk. Medd. Naturh. Foren. København, 102: 109-21.

SOOGAARD, H.F. 1950. Calcification in biological systems. Amer. Assoc. Advanc. Sci., 54.

STERNBERGER, E. 1955. Zur Molluskenfauna des Felsittorals und sub-littoralen Höhlen am Cap de Sorente. Gastrop. Gesell. Schweiz, 8 (1/2): 127-240.

THOMAS, J. 1931. Handbuch des Systematischen Weichtierkunde. Jena.

THOMSON, G. 1910. Reproduction and larval development of Danish marine bottom invertebrates. C.A. Reitzels forlag, København.

TOUSSAINT, E. 1933. Le développement de l'appareil reproducteur mâle de *Nucca tubulus* L. (Hapl. Études Sup. Paris).

TRAVIS, H.F. 1950. Matrix and mineral deposition in skeletal structures of the Prosobranch *Gastropoda*. In SOOGAARD: Calcification in biological systems. Amer. Assoc. Advanc. Sci., 54: 57-116.

TRUET, O., J.E. MARIN et J. GAS. 1950. Localisation du glycogène dans le manteau de quelques Lamellibranches. Bull. Inst. Océanogr. Monaco, 1133: 1-9.

VAN MOL, J.J. 1900. Étude histologique de la glande céphalique au cours de la croissance chez *Acteon tufus* L. Ann. Soc. r. Belg., 31 (1): 45-55.

WATERS, A. DE. 1930. Le sang d'*Acteon tufus* L. et la formation de sa coquille. Nouv. Mém. Cl. Sci. Acad. roy. Belg., 2 série, 10: 1-51.

WATSON, J.E. 1951. The activity of amoebocytes and of alkaline phosphatase during the regeneration of the shell in the snail, *Helix aspersa*. Quart. J. micr. Sci. G.B., 92 (2): 307-21.

WATSON, J.E. 1952. Amoebocytes. Internat. Rev. Cytology, 1: 31-78.

WATSON, O. 1938. Mucopolysaccharides and the calcification of the shell of the roach *Lepomis carolinus*. Quart. J. micr. Sci. G.B., 87: 129-32.

WATSON, T.H. 1960. The physiology of *Gastropoda*. Academic Press, N.Y.

WATSON, J., M. PAVANIS DE CECATTY, M. RICHARDOT, B. BEISSON et M.L. HANCAUX. 1951. Note sur les complexes neuro-musculaires de *Gastropoda* sp. (*Mollusca*: Anchyridae). Bull. mens. Soc. Linn. Lyon, 33 (3): 79-82.

WATSON, J., M. PAVANIS DE CECATTY, M. RICHARDOT, B. BEISSON et M.L. HANCAUX. 1952a. Les étapes de la croissance chez *Gastropoda* sp. (*Moll. Anchyridae*). Bull. mens. Soc. Linn. Lyon, 31 (2): 74-77.

WATSON, J., M. PAVANIS DE CECATTY, M. RICHARDOT, B. BEISSON et M.L. HANCAUX. 1952b. Histologie des corrélations neuro-musculaires lors du cycle sexuel de *Gastropoda* sp. Bull. mens. Soc. Linn. Lyon, 31 (3): 81-92.

WATSON, J. 1950. Shell structure and mineralization in *Mollusca*.

PLANCHE I

- PHOTO 3. — *Rissoa parva*, stade IV : coupe parasagittale montrant le manteau, la cavité palléale (pénis, cténidie), la tête où se voient le cartilage radulaire (c.r.), l'oesophage (oe.), les ganglions nerveux, l'otocyste (ot.), les glandes salivaires (s.), la glande pariétale (p.). Coloration *in toto* par l'alizarine; $\times 150$.
- PHOTO 4. — Bourrelet palléal de *R. parva* au stade III; remarquer : a) les cellules glandulaires (g.) débouchant à la face intérieure du bourrelet palléal, b) l'épithélium distal composé de cellules basses. Bouin alcoolique, hémalum -picro-indigo carmin; $\times 500$.

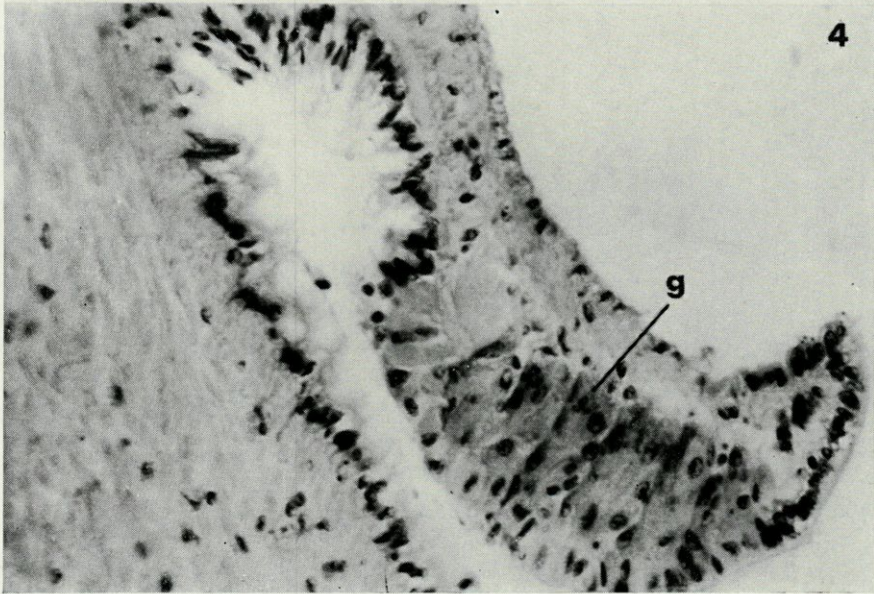
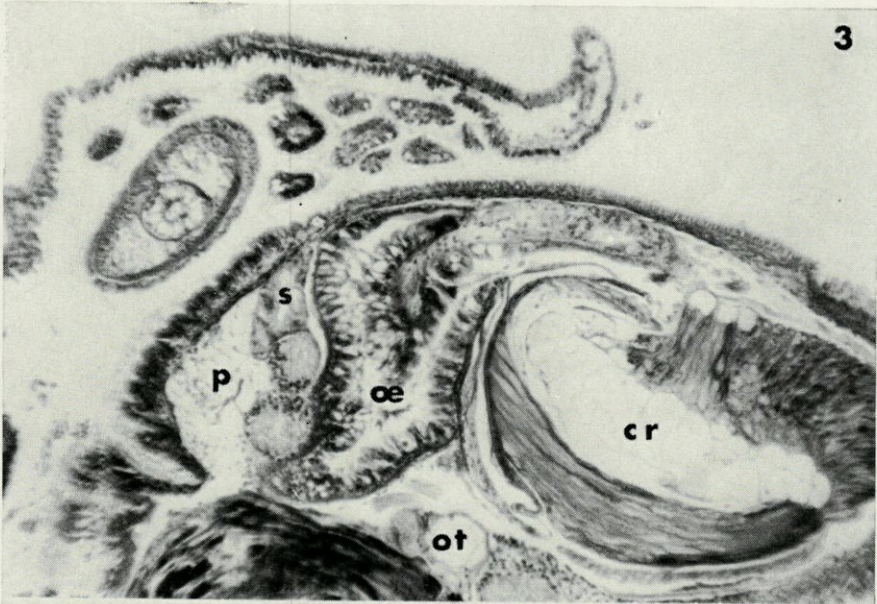


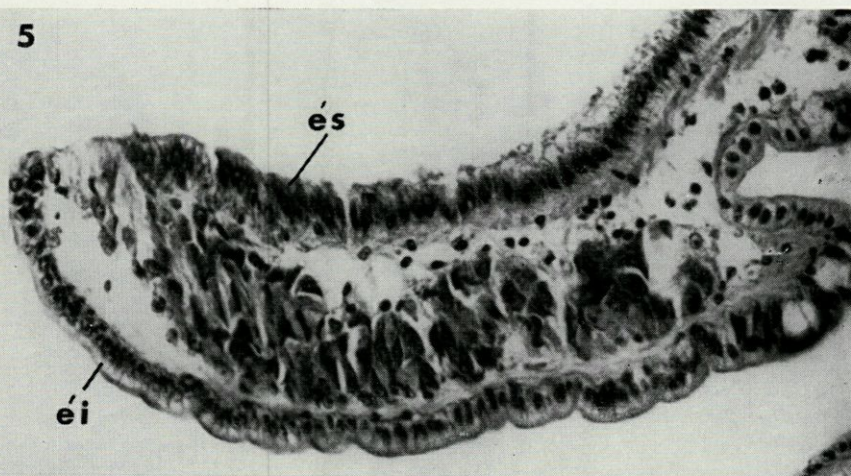
PLANCHE II

PHOTO 5. — Bourrelet palléal montrant le développement des formations glandulaires, l'épithélium supérieur (é.s.) composé de hautes cellules, l'épithélium inférieur (é.i.) à cellules basses, revêtues d'un film muqueux. Gendre, carmin de Best - trioxyhématéine de Hansen; $\times 400$.

PHOTO 6. — Bourrelet palléal au stade IV : noter la réduction de la glande du B.P. (mêmes légendes que pour la photo 5); coloration in toto par l'alizarine; $\times 500$.

PHOTO 7. — Conjonctif pédieux : cellules à mucopolysaccharides acides ou neutres. Halmi, méthode Mowry à l'APS - bleu alcian; $\times 1000$.

5



6



7

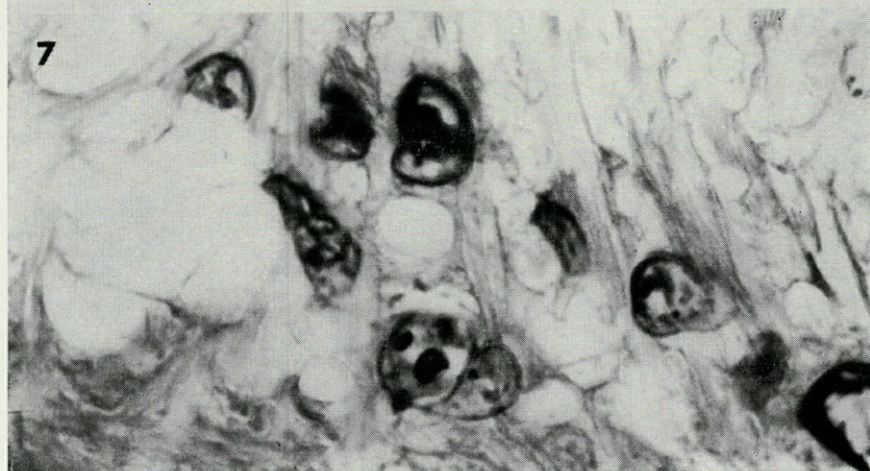


PLANCHE III

PHOTO 8. — Région postérieure du pied, mise en évidence du calcium dans des cellules groupées au-dessus de l'opercule (—). La coupe parasagittale montre un ganglion nerveux (g.n.) et, en noir, une partie des glandes pédiées muqueuses. Alcool-chloroforme, réaction de Stoelzner; $\times 200$.

PHOTO 9. — Coupe témoin, décalcifiée; le contenu des cellules à calcium est coloré en gris (—); $\times 200$.

PHOTO 10. — Détail des cellules calcaires; à droite, le muscle (m.). Alcool-chloroforme, réaction de Stoelzner; $\times 1\ 540$.

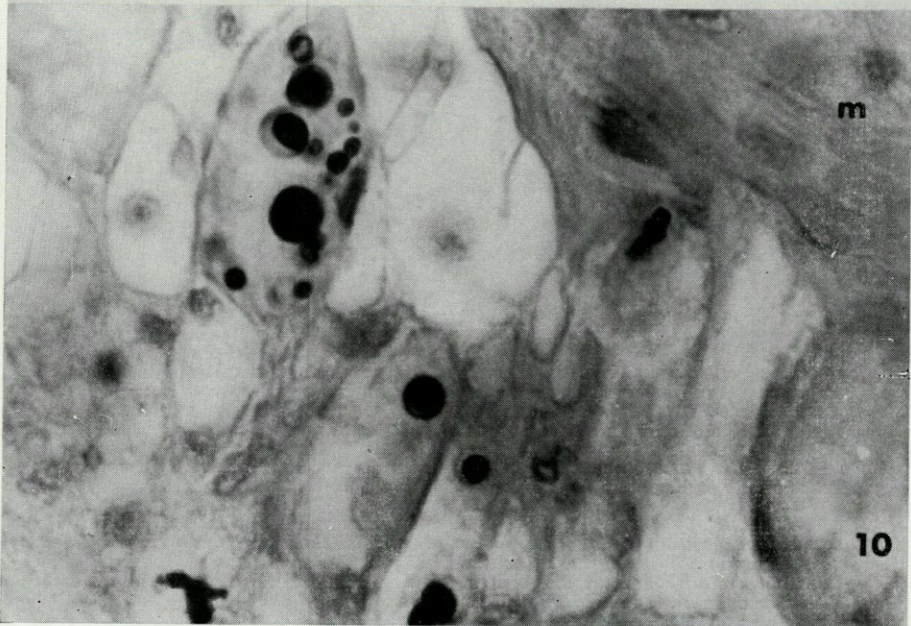
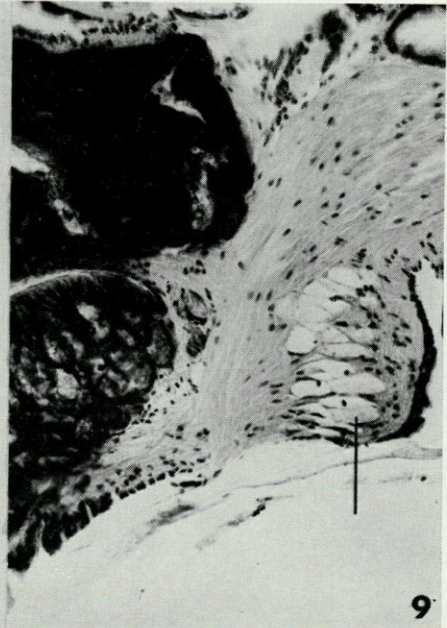
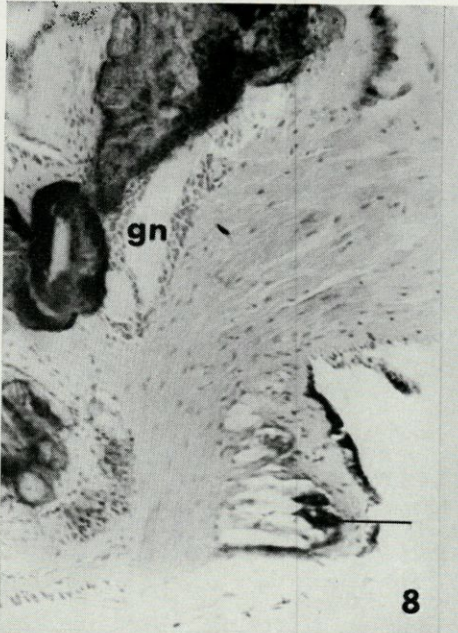


PLANCHE IV

PHOTO 11. — Coupe sagittale du manteau, montrant la répartition de l'activité phosphatasique alcaline dans l'épithélium supérieur (*R. parva* B); la glande du bourrelet palléal (G.) donne une réaction négative. Congélation-dissolution, réaction de Takamatsu-Gomori; $\times 715$.

PHOTO 12. — *R. parva*, phase B; la glande du bourrelet palléal (G.) donne la réaction de Takamatsu-Gomori; $\times 650$.

PHOTO 13. — *R. parva*, stade IV : partie du bourrelet palléal (cf. photo 6); remarquer les nombreux amœbocytes (a.), la cellule à enclaves (ce.), au voisinage de l'épithélium inférieur (é.i.); noter la forme des cellules de l'épithélium inférieur et les hautes cellules de l'épithélium supérieur (é.s.). Helly, bleu alcian - rouge solide; $\times 930$.

11

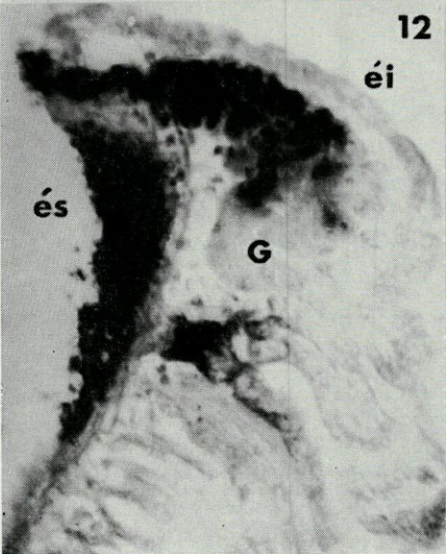


12

éi

és

G



13

ce

éi

a

és

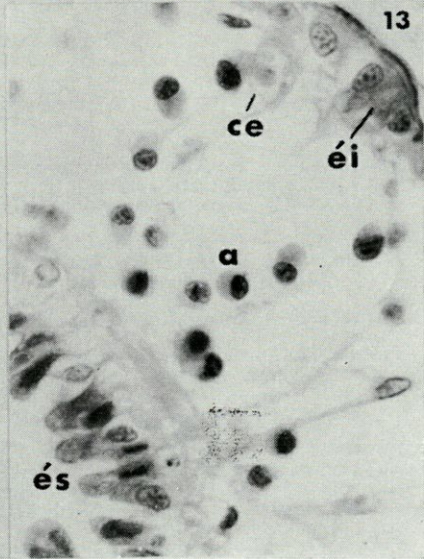


PLANCHE V

PHOTO 14. — *R. parva*, femelle mûre; coupe parasagittale montrant l'utérus (u.), le réceptacle séminal (r.s.), le rectum (r.), la glande hypobranchiale (hy.), la cavité palléale (c.p.). Bouin, trichrome de Masson; $\times 125$.

PHOTO 15. — *R. parva*, coupe du pénis intéressant la région glandulaire (g.) du canal déférent; en haut, la glande hypobranchiale (hy.). Bouin, trichrome de Masson; $\times 315$.

PHOTO 16. — Autoradiographie de la glande digestive; $\times 240$.

PHOTO 17. — Glande digestive : remarquer l'aspect des cellules excrétrices, larges, très chromophiles (E.), les cellules digestives (d.) à cytoplasme clair, vacuolisées dans la moitié apicale. Champy, fuchsine d'Altmann, différenciation à l'alcool pieriqué (Altmann); $\times 285$.

PHOTO 18. — Détail de la glande digestive : le cytoplasme apical des cellules excrétrices (e.) présente une activité phosphatasique alcaline intense; les cellules digestives, à droite, renferment des granulations APS-positives basales (gr.). Congélation - dissolution, méthode d'Ackerman; $\times 590$.

PHOTO 19. — Détail de la microphotographie 17; remarquer les globules osmio-philés à la base des cellules excrétrices et les noyaux (n.) volumineux à nucléole central; $\times 1100$.

