

LOCALISATION ULTRASTRUCTURALE DU CALCIUM ENDOGENE DANS DES ELECTRORECEPTEURS CUTANES DE POISSONS TELEOSTEENS

Reçu le 12/12/2001 – Accepté le 30/06/2002

Résumé

Le calcium a été identifié à l'échelle ultrastructurale par la méthode de Probst [1] dans trois électrorécepteurs cutanés spécifiques du système de la ligne latérale de poissons téléostéens : l'organe ampullaire et l'organe de type B ou Gymnarchomaste chez *Gymnarchus niloticus* (Gymnarchidae) et l'organe tubéreux chez *Apteronotus leptorhynchus* (Gymnotidae). Dans ces organes sensoriels, le calcium endogène qui se présente sous forme de précipités denses aux électrons, est localisé dans des organites cytoplasmiques des cellules sensorielles et dans la fibre nerveuse afférente. Il est absent dans le "cleft" synaptique et peu concentré dans les cellules accessoires. Dans les cellules sensorielles, on trouve ces dépôts dans les vésicules synaptiques, surtout celles situées au voisinage des rubans synaptiques, dans les saccules du réticulum endoplasmique et entre les feuillettes de la membrane nucléaire. Dans les mitochondries peu de dépôts sont présents et le diamètre des granulations est plus petit que celui observé dans les autres structures cellulaires. Dans la fibre nerveuse, de fines granulations sont présentes dans les saccules de réticulum, dans les neurotubules et les mitochondries. Les dépôts les plus importants sont situés entre les feuillettes de la gaine de myéline.

Mot clés: calcium, électrorécepteurs, réticulum endoplasmique, vésicules synaptiques, gaine de myéline, terminaisons nerveuses.

Abstract

The ultrastructural distribution of calcium in cutaneous electroreceptor organs was investigated using cytochemical method of Probst [1]. Calcium was studied in the ampullary electroreceptor, the type B electroreceptor organ (or gymnarchomast) of *Gymnarchus niloticus* (Gymnarchidae) and in tuberous organ of *Apteronotus leptorhynchus* (Gymnotidae). The calcium precipitates were localized in the intracellular compartments of sensory cells and in the afferent nerve fiber. The accessory cells contained small amounts of precipitate. The sensory cells contained the electron dense deposits in the synaptic vesicles mainly in those near synaptic ribbons, inside the vacuoles of the endoplasmic reticulum and between the layers of the nuclear membrane. Very few deposits with small diameter were found in mitochondria. Precipitates were also found inside the axon of the afferent nerve and between the layers of the myelin sheath. The synaptic cleft appeared to contain no calcium.

Keywords: Calcium, cutaneous electroreceptor organs, endoplasmic reticular, synaptic vesicles, myelin sheath, afferent nerve.

A.B. DJEBAR

Département des
Sciences de la Mer
Université d'Annaba
24000 Algérie

J.P. DENIZOT

C.N.R.S.
Institut Alfred Fessard
Gif sur Yvette
91198 Cedex, France

ملخص

لقد تمت دراسة موقع وتوزيع البنية الدقيقة للكالسيوم الأصلي عند ثلاثة أنواع من المستقبلات الكهربائية الجلدية الخاصة بجهاز الخط الجانبي. تم التعرف على الكالسيوم بواسطة طريقة بروسست [1]. داخل مختلف الأعضاء الحسية المدروسة، الرواسب الكثيفة للألكترونات تقع أساسيا داخل العضيات السيتوبلازمية للخلايا الحسية، داخل الليف العصبي الجالب. نسجل غيابهم في الفراغات الموجودة بين الخلايا العصبية وقتهم إن لم نقل غيابهم كذلك داخل الخلايا الثانوية. على مستوى الخلايا الحسية، نجد هذه الرواسب داخل الحويصلات الفراغية خاصة تلك المتوضعة بجانب الأشرطة الفراغية داخل تجويفات الشبكة الأندوبلازمية وبين وريقات الخلاف النووي. يوجد عند قليل من هذه الرواسب داخل الميتوكوندري، وقطر الحبيبات أقل من تلك الموجودة داخل البنيات الخلوية الأخرى. داخل الليف العصبي، توجد حبيبات دقيقة على مستوى تجويفات الشبكة الأندوبلازمية وبتركيو ضعيفة داخل الأنايبب العصبية والميتوكوندري. الرواسب المهمة توجد بين وريقات عند الميالين.

الكلمات المفتاحية: كالسيوم، مستقبلات كهربائية، الشبكة الأندوبلازمية، حويصلات فراغية، نهايات عصبية.

Un grand nombre de fonctions métaboliques cellulaires sont sous la dépendance des ions calcium. Dans le système nerveux, ils modulent les processus de synthèse métabolique, mais aussi de libération des neurotransmetteurs [2].

Sous leur forme libre, les ions calcium sont détectables à l'échelle ultrastructurale par des méthodes cytochimiques utilisant des réactifs comme le pyroantimonate [3] ou l'oxalate [4] et [5]. Bien souvent ces techniques nécessitent l'utilisation de milieux enrichis par de fortes concentrations en chlorure de calcium [5-10] de façon à éviter le déplacement du calcium intracellulaire au cours de la fixation. Par conséquent, ce procédé permet difficilement de différencier le calcium endogène du calcium exogène introduit au cours de la fixation. Nous avons donc utilisé la méthode cytochimique mise au point par Probst [1], qui consiste en une fixation par le glutaraldéhyde suivie d'une postfixation dans un complexe composé de tétraoxyde d'osmium et de bichromate de potassium, sans addition de calcium.

Dans les organes sensoriels de la ligne latérale des poissons, de nombreux travaux démontrent que les ions calcium sont impliqués dans la transmission du stimulus vers la fibre nerveuse afférente. Ainsi, des canaux calciques voltage- dépendants ont été décrits dans la membrane basale des cellules sensorielles (membrane présynaptique) de l'ampoule de Lorenzini chez la Raie [11-15] et des cellules sensorielles de l'organe ampullaire de *Plotosus angularis* [16-18]. En outre, le potentiel généré par les cellules sensorielles des électrorécepteurs cutanés peut être

complètement aboli par des agents inhibiteurs des conducteurs potassique ou calcique [19] alors que la tétrodontoxine, qui bloque les canaux sodium-dépendants, n'a pas d'effet [19,20].

Nous avons étudié à l'échelle ultrastructurale la localisation et la répartition du calcium dans trois types d'organes sensoriels cutanés sensibles aux stimuli électriques: l'organe ampullaire, l'organe de type B ou gymnarchomaste de *Gymnarchus niloticus* (Gymnarchidae) et dans l'organe tubéreux d'*Apteronotus leptorhynchus* (Gymnotidae). Pour confirmer que les précipités denses aux électrons présents entre les feuillettes de la gaine de myéline correspondent bien à du calcium, nous avons dosé cet ion par perte d'énergie.

Nos résultats indiquent que pour ces trois types d'électrorécepteurs, le calcium est localisé principalement dans le cytoplasme des cellules sensorielles et dans les fibres nerveuses afférentes; en revanche, il est absent ou à très faible concentration dans le cytoplasme des cellules accessoires. Ces résultats anatomiques, ainsi que les données électrophysiologiques [11-18], montrent que les cellules sensorielles des électrorécepteurs ont développé un métabolisme calcique particulièrement important.

MATERIEL ET METHODES

Technique

L'expérience est réalisée sur deux électrorécepteurs cutanés: l'organe ampullaire, l'organe de type B ou gymnarchomaste de *Gymnarchus niloticus* (Gymnarchidae) et dans l'organe tubéreux d'*Apteronotus leptorhynchus* (Gymnotidae).

Après anesthésie des poissons par une solution de 0,01 % de MS 222 (Sandoz), des fragments d'épiderme de 3 mm² de la lèvre supérieure de *Gymnarchus niloticus* et de l'épiderme de la tête pour *Apteronotus leptorhynchus* sont prélevés et fixés par immersion dans une solution de glutaraldéhyde de 2 à 4 % dans du tampon phosphate 0,05M à pH 7,4 pendant 12 heures à 4°C [1]. Après plusieurs lavages dans du tampon phosphate, ces fragments sont postfixés pendant 2h à 4°C dans une solution de 1% d'acide osmique additionnée de 2,5% de bichromate de potassium et de 0,85 % de chlorure de sodium. Une fois lavés soigneusement pendant 1 heure dans du tampon phosphate puis déshydratés pendant 30 min, les prélèvements sont inclus dans le Spurr [21]. Le repérage des électrorécepteurs se fait sur des coupes de 1 à 2 microns colorées par le bleu de toluidine. Des coupes fines de 0,7 à 0,8 microns sont alors réalisées, placées sur des grilles en cuivre ou en nickel et observées, sans contraste, au microscope électronique.

Contrôle

Des contrôles sont effectués en soumettant les coupes recueillies sur des grilles en nickel à l'action d'une solution de 10 mM d'EGTA (éthylène glycol-bis-β-amino-éthyl-éther) N,N,N',N' - tétraacétique acide; Sigma) pendant 30 à 60 min à 60°C [1]. D'autres contrôles ont été réalisés en omettant la préfixation par le glutaraldéhyde ou en le remplaçant par du paraformaldéhyde tamponné au phosphate ou au cacodylate.

Dosage du calcium par perte d'énergie

Le dosage des ions calcium se fait sur des coupes de fragments de nerf latéral montées sur des grilles n'ayant pas subi de traitement au bichromate de potassium. Seules une fixation par une solution de glutaraldéhyde à 2% dans du tampon phosphate 0,05M à pH 7,4 pendant 12 heures à 4°C suivie d'une postfixation pendant 2h à 4°C dans une solution de 2% d'acide osmique suffisent pour doser à l'aide de microsondes spécifiques les dépôts calciques.

RESULTATS

Les organes sensoriels cutanés spécifiques du système de la ligne latérale du Gymnarche, ont été décrits en microscopie optique par Szabo, [22] et en microscopie électronique par Szamier et Wachtel, [23] pour les Gymnotidés et par Mullinger, [24], Derbin [25] pour les Gymnarche.

Caractérisation du calcium endogène dans l'organe ampullaire et dans l'organe de type B ou gymnarchomaste de *Gymnarchus niloticus*.

L'organe ampullaire (Fig.1) et l'organe de type B (Fig.5) sont insérés dans le derme; ils sont constitués par un épithélium comportant des cellules sensorielles globuleuses à gros noyaux en forme de croissant. La région apicale de ces cellules présente une profonde invagination (Fig.5) dans laquelle les replis de leur membrane cytoplasmique forment des microvillosités qui sont au contact de polysaccharides. Les cellules sensorielles entourées de cellules accessoires sont traversées par des fibres nerveuses afférentes ayant perdu leur gaine de myéline au passage de la membrane basale (Fig.1 et 5).

L'organe ampullaire se différencie du gymnarchomaste (Fig.5) par la présence d'un canal transépidermique (Fig.1) faisant communiquer la cellule sensorielle et le milieu aqueux, et par le diamètre de ses cellules sensorielles, qui est inférieur à celui des cellules sensorielles du gymnarchomaste.

Après application de la méthode de Probst [1], des granulations denses sont présentes dans l'ensemble du cytoplasme des cellules sensorielles de l'organe ampullaire (Fig.2). A fort grossissement, elles sont visibles dans les vésicules synaptiques (Fig.3), notamment dans celles proches du ruban synaptique et dans les vacuoles du réticulum endoplasmique. Les particules de glycogène (G) sont également contrastées, elles sont visibles dans les terminaisons nerveuses (Fig.2 et 3) et dans le cytoplasme des cellules accessoires (Fig.2). Après incubation des coupes dans l'EGTA (Fig.4), les dépôts ne sont plus apparents dans les vésicules synaptiques et les vacuoles du réticulum endoplasmique; en revanche, les particules de glycogène ne sont pas digérées par ce traitement (Fig.4).

Dans la région apicale de la cellule sensorielle du gymnarchomaste (Fig.6), les grains denses aux électrons sont localisés dans les vésicules du réticulum endoplasmique et dans les mitochondries, mais non dans les microvillosités (Fig.6). A la périphérie de la cellule sensorielle où se trouve l'innervation, de fines granulations sont présentes dans les vésicules synaptiques (Fig.8) et dans

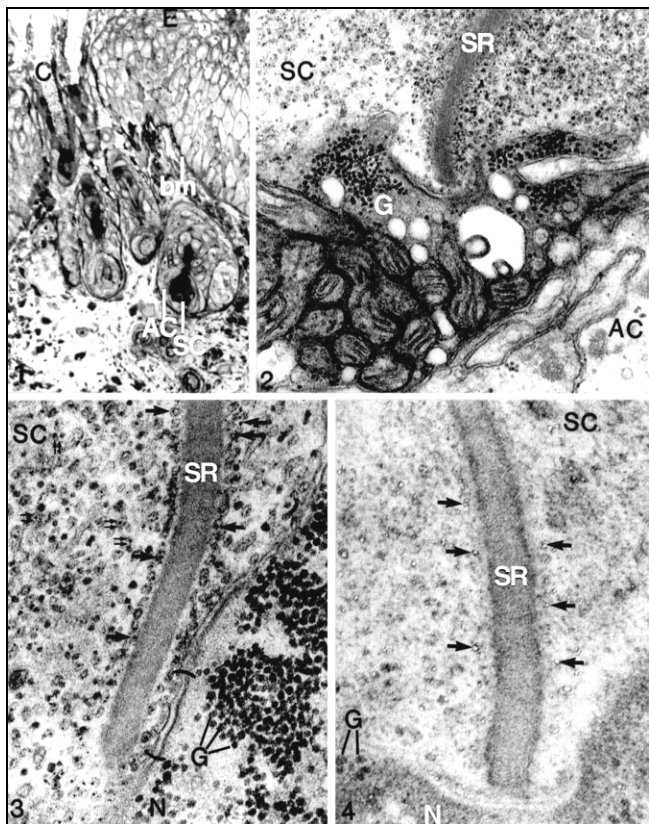


Figure 1: Coupe transversale semi fine colorée au bleu de toluidine de l'épiderme (E) de *Gymnarchus niloticus* montrant des organes ampullaires. Les cellules sensorielles (SC), entourées de cellules accessoires (AC) sont localisées au fond d'un canal (C) traversant l'épiderme. bm: membrane basale. x350.

Figures 2 à 4: Caractérisation du calcium endogène dans l'organe ampullaire de *Gymnarchus niloticus*.

Figure 2: Base de la cellule sensorielle avec son innervation. Noter la présence de fines granulations dans les vacuoles du cytoplasme de la cellule sensorielle (SC) et autour du ruban synaptique (SR). Sur ce dernier, ces granulations sont absentes (voir aussi Fig. 3). Dans le bouton nerveux terminal afférent (N) et les cellules accessoires (AC), présence de grains de glycogène (G) contrastés. x 25250.

Figure 3: Coupe tangentielle d'un ruban synaptique. De fines granulations sont visibles dans les vésicules synaptiques (flèches) proches du ruban synaptique (SR), et dans de petites vacuoles de réticulum endoplasmique (doubles flèches). Grains de glycogène (G) dans le bouton nerveux terminal (N). x 60000.

Figure 4: Contrôle. Traitement pendant 30 min dans 0,1M d'EGTA à 60°C. Absence de granulations dans les vésicules synaptiques (flèches) autour du ruban synaptique (SR). Noter que les particules de glycogène (G) restent visibles. CS: cellule sensorielle; N: bouton nerveux terminal afférent. x 60000.

les saccules du réticulum endoplasmique; les particules de glycogène (G) sont également contrastées (Fig.7).

Caractérisation du calcium endogène dans l'organe tubéreux et dans la fibre nerveuse d'*Apteronotus leptorhynchus*

Les cellules sensorielles de cet organe sont disposées

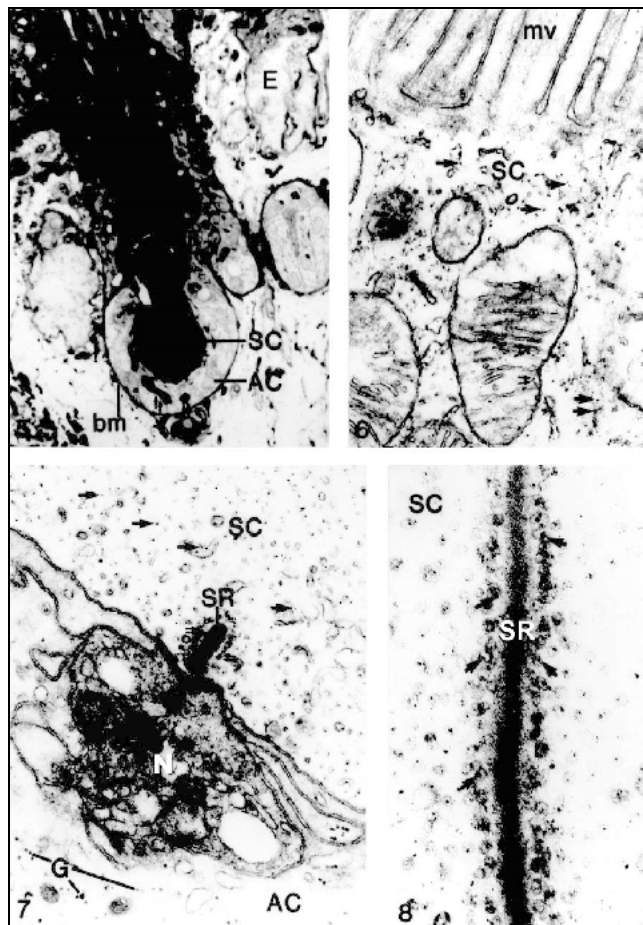


Figure 5: Coupe semi fine colorée au bleu de toluidine montrant un organe de type B ou gymnarchomaste de *Gymnarchus niloticus*. Les cellules sensorielles (SC), dont la partie apicale présente des microvillosités s'ouvrant sur la cavité intraépidermique remplie de polysaccharide, sont entourées par les cellules accessoires (AC). Ces dernières sont traversées par des fibres nerveuses non myélinisées (doubles flèches). bm: membrane basale. x 400.

Figures 6 à 8: Caractérisation du calcium endogène dans la cellule sensorielle du gymnarchomaste.

Figure 6: Zone apicale de la cellule sensorielle (SC). Noter la présence de fines granulations dans le réticulum endoplasmique (flèche) et dans les mitochondries (double flèche), et l'absence de réaction dans les microvillosités (mv). x 25250.

Figure 7: Base de la cellule sensorielle avec son innervation. Noter la présence de fines granulations dans le cytoplasme sensoriel, dans les saccules de réticulum endoplasmique (flèches) et dans les vésicules synaptiques (double flèche) dont certaines sont proches du ruban synaptique (SR). De fins dépôts sont également présents dans la terminaison nerveuse (N). Noter également la présence de glycogène (G) dans les cellules accessoires (AC) et la terminaison nerveuse. x 25250.

Figure 8: Coupe tangentielle d'un ruban synaptique (SR); noter la présence de grains denses (flèches) dans les vésicules synaptiques. x 60000.

sur une plate-forme de cellules accessoires traversées par des fibres nerveuses afférentes (Fig.9).

De fins dépôts sont présents à la périphérie de la cellule sensorielle, dans les vacuoles du réticulum endoplasmique et seulement à l'état de traces dans les mitochondries

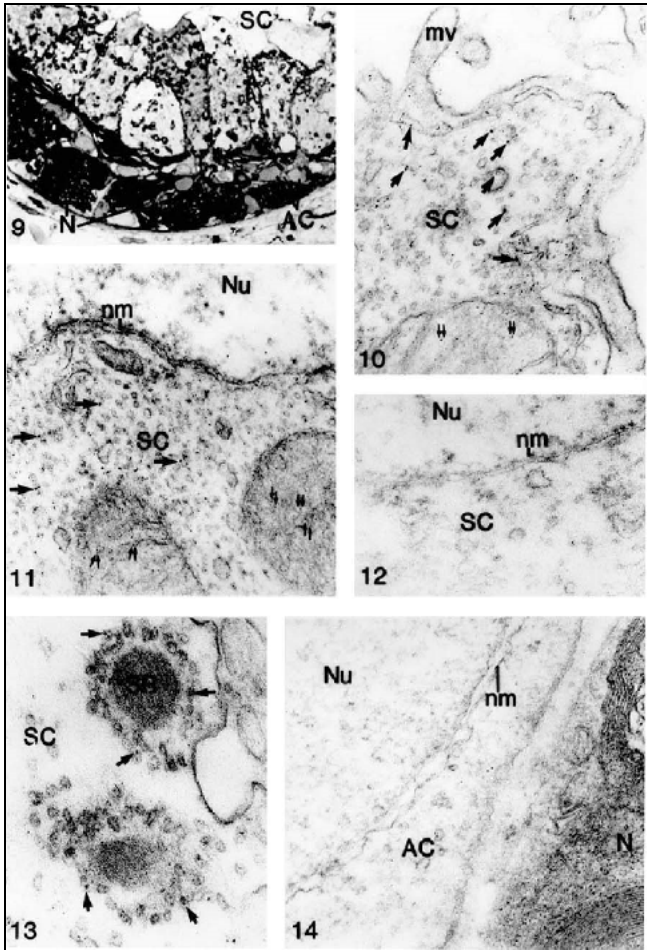


Figure 9: Coupe semi fine colorée au bleu de toluidine montrant un organe tubéreux d'*Apteronotus leptorhynchus*. Les cellules sensorielles (SC) sont disposées sur une plate-forme de cellules accessoires (AC). Noter la présence de fibres nerveuses afférentes (N) myélinisées sous la zone des cellules accessoires (AC). x470.

Figures 10 à 14: Caractérisation du calcium endogène dans les cellules sensorielles et accessoires de l'organe tubéreux d'*Apteronotus leptorhynchus*.

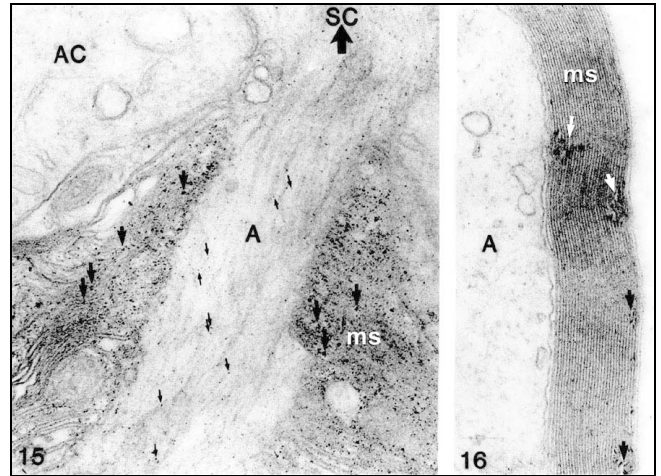
Figure 10: Périphérie de la cellule sensorielle (SC). Les fines granulations présentes essentiellement dans le réticulum endoplasmique (flèches) apparaissent également dans les mitochondries (doubles flèches). mv: microvillosités. x 25250.

Figure 11: Zone centrale de la cellule sensorielle (SC). Des granulations sont présentes entre les feuillettes de la membrane nucléaire (nm), dans le réticulum endoplasmique (flèches). Là encore les granulations sont de plus fins diamètres que dans les saccules de réticulum. (double flèches). No: Noyau. x 25250.

Figure 12: Contrôle. Traitement pendant 30 min dans 0,1M d'EGTA à 60° C. Noyau (No) de la cellule sensorielle (SC). Noter l'absence de dépôts dans les feuillettes de la membrane nucléaire (nm). Comparer avec les figures 11 et 14. x25250.

Figure 13: Coupe transversale de rubans synaptiques (SR) entourés de vésicules synaptiques. Présence de granulations dans les vésicules synaptiques (flèches) x 60000.

Figure 14: Noyau (No) d'une cellule accessoire (AC). Noter l'absence de dépôts entre les feuillettes de la membrane nucléaire (nm) et dans le cytoplasme de cette cellule. Comparer avec les figures 11 et 12. N: terminaison nerveuse myélinisée. x 25250.



Figures 15 et 16: Caractérisation du calcium endogène au niveau de la fibre nerveuse afférente de l'organe tubéreux d'*Apteronotus leptorhynchus*.

Figure 15: Coupe sagittale d'une fibre nerveuse proche du contact (grosse flèche) avec une cellule sensorielle (SC). Noter l'accumulation de fins dépôts (flèches) dans la gaine de myéline (ms). Dans l'axone (A) de fines granulations sont également présentes (petites flèches). x 25250.

Figure 16: Coupe transversale d'une fibre nerveuse proche d'un organe tubéreux. Noter la présence de dépôts (flèches) entre les feuillettes de la gaine de myéline (ms). A: axone. x 25250.

(Fig.10 et 11). Des grains denses sont également localisés entre les feuillettes de la membrane nucléaire (Fig.11), ils ne sont plus apparents sur les coupes traitées à l'EGTA (Fig.12). A la base de la cellule sensorielle où se trouvent les rubans synaptiques, des grains denses sont visibles dans les vésicules synaptiques (Fig.13) autour de ces rubans. Contrairement aux cellules sensorielles, on ne retrouve de dépôts ni dans le cytoplasme ni entre les feuillettes de la membrane nucléaire des cellules accessoires de l'organe tubéreux (Fig.14).

De fines granulations sont également visibles dans les organites de l'axone tels que les vacuoles de réticulum endoplasmique, les neurotubules (Fig.15) et entre les feuillettes de la gaine de myéline (Fig.16) de la fibre nerveuse afférente.

Les particules denses aux électrons sont absentes sur les préparations n'ayant pas subi de préfixation par le glutaraldéhyde et sur celles préfixées par le paraformaldéhyde tamponné dans du cacodylate.

Dosage du calcium par perte d'énergie

Le dosage du calcium à l'aide d'une microsonde a été fait sur des coupes fines de gaine de myéline. Il nous a permis de confirmer que les dépôts opaques aux électrons contenaient du calcium (Fig.17).

DISCUSSION

Des précipités denses aux électrons sont observés dans les électrorécepteurs cutanés de poissons téléostéens préalablement fixés par immersion dans le glutaraldéhyde et postfixés dans le complexe osmium / bichromate de

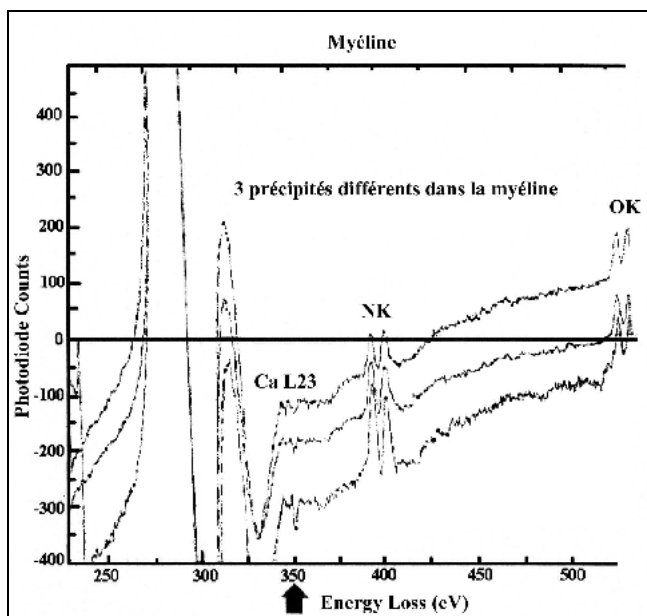


Figure 17: Analyse dans 3 échantillons de gaine de myéline de nerf latéral. Les mesures sont faites sur les précipités donnant des contrastes situés entre les membranes de la gaine de myéline. Noter la perte d'énergie dans la zone 350 eV (flèche sur abs.) correspondant à la zone d'absorption due à la présence de calcium. (Enregistrement réalisé par le Dr C. Colliex de l'Université d'Orsay, Paris 11).

potassium selon la méthode mise au point par Probst [1]. Ces précipités ne résistent pas à une incubation dans l'EGTA et correspondent donc à du calcium. Cette méthode, ne nécessitant pas l'addition de calcium dans les différents milieux de fixation, permet par conséquent de caractériser le calcium endogène [1], [26] et vraisemblablement les ions calcium endogènes insolubles.

Les électrorécepteurs sont des organes sensoriels constitués essentiellement de cellules sensorielles, de fibres nerveuses afférentes myélinisées et de cellules accessoires. Nos résultats indiquent la présence de calcium dans plusieurs organites du cytoplasme des cellules sensorielles et dans les fibres nerveuses; en revanche, dans les cellules accessoires il est absent.

Chez les poissons, des études de microscopie électronique ont permis de démontrer la présence de calcium dans les cellules sensorielles des mécanorécepteurs de la ligne latérale *Lota lota* [27] et dans les cellules photoréceptrices de la rétine de *Oreochromis mossambicus* [26] et des raies *Raja erinacea* et *Raja ocellata*. [27] et [28] ont démontré par des études cytochimiques et par spectroscopie aux rayons X, la présence de calcium, à la fois dans les vésicules synaptiques entourant les rubans synaptiques situés à la base des cellules sensorielles des mécanorécepteurs, et dans les vésicules des boutons terminaux des fibres nerveuses efférentes. Dans ces organes, ces auteurs n'observent de dépôts ni sur les membranes pré- et postsynaptiques, ni dans le cleft synaptique, ni dans le cytoplasme des cellules accessoires.

Dans les cellules photoréceptrices de la rétine, Freilhöfer *et al.* [26] ont obtenu des résultats comparables. En effet, les dépôts calciques sont abondants dans les

sacculles de réticulum endoplasmique et dans les vésicules synaptiques. Ils signalent aussi la présence de calcium dans les fibres afférentes et efférentes et le visualisent dans les espaces extracellulaires et dans le cleft synaptique (voir aussi [1]).

Nos résultats se rapprochent beaucoup de ceux obtenus par ces auteurs. En effet, dans les cellules sensorielles des trois types d'électrorécepteurs étudiés, le calcium est localisé dans les sacculles de réticulum, entre les feuillettes de la membrane nucléaire et dans les vésicules synaptiques. En revanche, comme pour les cellules sensorielles des mécanorécepteurs [27], il n'a été décelé ni sur les rubans synaptiques ni dans l'espace intermembranaire du cleft synaptique. Cette dernière donnée ne semble pas en accord avec les résultats obtenus par des méthodes électrophysiologiques, selon lesquelles la plus forte concentration de canaux membranaires (voltage-dépendants) laissant passer les ions calcium se trouverait sur la membrane présynaptique [18], [29]; Sugawara *com. pers.*

Les résultats obtenus sur les cellules sensorielles des mécanorécepteurs, des électrorécepteurs des Téléostéens et sur les cellules photoréceptrices de la rétine, montrent que les sacculles de réticulum endoplasmique et les vésicules synaptiques peuvent être des réservoirs cellulaires de calcium. Cette propriété a déjà été établie dans des neurones du système nerveux central du rat [5], [6] et de la grenouille [30].

Selon de nombreux auteurs [3] et [31] les mitochondries seraient également un réservoir de calcium, notamment dans les cellules photoréceptrices de la raie [28] et de la grenouille [32]. Ces auteurs ont toutefois utilisé un milieu de fixation enrichi en calcium. Cependant, quand celui-ci en est dépourvu, seule une infime concentration de calcium est visualisée dans les mitochondries des cellules photoréceptrices de poissons téléostéens [26] et dans les électrorécepteurs.

Grâce à la méthode de Prost [1] et à des contrôles rigoureux par l'UGTA, Freilhöfer *et al.* [26] ont démontré l'existence de dépôts calciques entre les membranes des disques constituant les bâtonnets de la rétine d'un poisson téléostéen. Ces disques sont anatomiquement, mais non physiologiquement, très proches des microvillosités de l'apex des cellules sensorielles des électrorécepteurs. On s'attendait à mettre en évidence une importante concentration de calcium sur les plis de la membrane plasmique constituant les microvillosités de ces cellules. Zipser et Bennett, [20]; Akutsu et Obara, [33]; Clusin et Bennett, [15]; Zakon, [19] et Sugawara et Obara, [17] ont montré que des mouvements d'ions calcium à travers la membrane des microvillosités sont à l'origine du potentiel récepteur responsable du phénomène de transduction dans les cellules sensorielles de nombreux électrorécepteurs. Dans le Knollenorgan (organe tubéreux) des mormyridae, les cellules sensorielles possèdent un système microvillaire particulièrement développé et riche en ATPase dépendante du calcium [34]. Dans cette zone, siège de mouvements d'ions calcium [20] à l'origine d'un potentiel de très haute fréquence, le calcium n'a pu jusqu'à présent être mis en évidence.

Les différents travaux concernant la détection du calcium dans les fibres nerveuses ont été essentiellement réalisés chez le rat [35] et chez le calmar [36], [37]; ces auteurs insistent sur l'existence de dépôts calciques dans les organites présents dans l'axone. Cependant, Mata *et al.*, [38] notent que le calcium se trouve, comme la S100 protéine qui capte le calcium, dans les points d'attache de la gaine de myéline, sur les noeuds de Ranvier, et à l'intérieur de la gaine, dans les clefts de Schmidt-Lanterman. Dans les fibres nerveuses des électrorécepteurs, la concentration du calcium contenu dans l'axone est très faible par rapport à celle mesurée dans l'axone des fibres nerveuses du rat [35]. En revanche, dans la gaine de myéline, les fins dépôts de calcium se situent entre les feuillets membranaires [26]. En outre, les dépôts sont plus importants aux endroits où la gaine de myéline a été déformée artificiellement lors de la fixation. Ces zones de déformation pourraient correspondre aux clefts de Schmidt-Lanterman de la fibre nerveuse de rat dans lesquels Mata *et al.* [35] signalent une présence abondante de calcium.

Probst [1] a mis en évidence le calcium dans le système nerveux central de *Cyprinus carpio* où il a caractérisé le calcium endogène intracellulaire et celui situé dans le cleft synaptique ou extracellulaire. Les résultats que nous avons obtenu sur les électrorécepteurs, ainsi que ceux obtenus par d'autres méthodes pour caractériser le calcium dans les tissus des différents poissons, nous amènent à faire certaines remarques sur la méthodologie proposée par Probst [1]. Cette méthode comporte deux étapes et il semble que la préfixation par le glutaraldéhyde soit primordiale. En effet, le calcium, notamment celui qui se trouve dans les vésicules synaptiques, n'est pas conservé quand le glutaraldéhyde est remplacé par du paraformaldéhyde [39], ou encore lorsque la fixation par l'acide osmique ou par le complexe acide osmique bichromate de potassium est utilisée sans préfixation dans le glutaraldéhyde.

La conservation du calcium des vésicules synaptiques dépend non seulement de la présence du glutaraldéhyde, mais aussi du tampon avec lequel il est neutralisé. Le calcium est retenu lorsque le glutaraldéhyde est additionné d'un tampon phosphate, comme dans le présent travail, ou encore d'un tampon cacodylate [1], [39] et [40]. En revanche, pour qu'il soit conservé par une fixation au glutaraldéhyde additionnée à un tampon S-alidine, il est nécessaire d'ajouter une quantité substantielle de Cl_2Ca à la solution tampon [27]. Nos résultats ne nous permettent pas de préciser le rôle du complexe bichromate / acide osmique dans la conservation du calcium extracellulaire. Selon Probst [1] il pourrait augmenter le contraste des dépôts et permettre de déceler de très fines particules de calcium, comme celles présentes dans les mitochondries.

CONCLUSION

Il semble qu'indépendamment de la solution tampon, la fixation par le glutaraldéhyde est essentielle pour la conservation du calcium endogène. Les fines granulations correspondant à du calcium ne sont visibles que si on procède à l'observation des coupes fines sans contraste à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. En effet, cette

"coloration" augmente le contraste de toutes les structures et notamment les membranes; dans ce cas, il n'est plus possible de visualiser les précipités dus au calcium, souvent situés à proximité des membranes.

La visualisation du calcium à l'échelle ultrastructurale dans les électrorécepteurs permet donc de distinguer deux ensembles cellulaires: les cellules sensorielles, riches en calcium, et les cellules accessoires qui, avec la technique utilisée, semblent en être dépourvues. Cette donnée va être exploitée pour rechercher si la différenciation de ces dernières en cellules sensorielles [41] est précédée par un "signal calcium", c'est-à-dire, un afflux de calcium endogène dans leurs organites cytoplasmiques.

REFERENCES

- [1]- Probst W., "Ultrastructural localization of calcium in the CNS of vertebrates", *Histochem.*, 85, (1986), pp.231-239.
- [2]- Szerb, J. C., O'Regan P.A., "Effect of glutamate release from hippocampal slices induced by high K^+ or by electrical stimulation: interaction with Ca^{++} concentrations", *Journal of Neurochem.*, 44, (1985), pp.724-731.
- [3]- Wick S.M. and Hepler P.K., "Selective localization of intracellular Ca^{++} with potassium antimonate", *J. Histochem. Cytochem.*, 31, (1982), pp.1190-1204.
- [4]- Van Reempts J., Borgers M. and Offner F., "Ultrastructural localization of calcium in the rat retina with a combined oxalate - pyroantimonate technique", *Histochem. J.*, 14, (1982), pp.517-522.
- [5]- Mc Graw C.F., Somlyo A.V. and Blaustein M.P., "Localization of calcium in presynaptic nerve terminals", *J. Cell Biol.*, 85, (1980), pp.228-241.
- [6]- Duce I.R. and Keen P., "Can neuronal smooth endoplasmic reticulum function as a calcium reservoir?", *Neurosci.*, 3, (1978), pp.837-848.
- [7]- Silsbergeld E.K. and Costa J.L., "Synaptosomal Ca^{++} metabolism studied by electron microprobe analysis", *Exp. Neurol.*, 63, (1979), pp.277-292.
- [8]- Ellisman M.H., Friedman P.L. and Hamilton W.J., "The localization of sodium and calcium to Schwann cell paranodal loops at nodes of Ranvier and calcium to compact myelin", *J. Neurocytol.*, 9, (1980), pp.185-205.
- [9]- Chan S.Y., Ochs S. and Jersild R.A., "Localization of calcium in nerve fibers", *J. Neurobiol.*, 15, (1984), pp.89-108.
- [10]- Joo F., Milhaly A. and Parducz A., "Visualization of activated synapses with the calcium inclusion technique", In: Jones D.G., ed., *Current Topics in Research on Synapses*, Alan R. Liss, New York, (1984), pp.119-163.
- [11]- Obara S. and Bennett M.V.L., "Mode of operation of ampullae of Lorenzini of skate", *Raja. J. Gen. Physiol.* 60, (1972), pp.534-557.
- [12]- Clusin W.T. and Bennett M.V.L., "Calcium activated conductance in skate electroreceptors". Current clamp experiments", *J. Gen. Physiol.*, 69, (1977a), pp.121-143.
- [13]- Clusin W.T. and Bennett M.V.L. "Calcium activated conductance in skate electroreceptors. Voltage clamp experiments", *J. Gen. Physiol.*, 69, (1977b), pp.145-182.
- [14]- Clusin W.T. and Bennett M.V.L., "The oscillatory responses of skate electroreceptors to small voltage stimuli", *J. Gen. Physiol.*, 73, (1979a), pp.685-702.
- [15]- Clusin W.T. and Bennett M.V.L., "The ionic basis of oscillatory responses of skate receptors", *J. Gen. Physiol.*, 73, (1979b), pp.703-723.
- [16]- Sugawara Y. and Obara S., "Damped oscillation in the

- ampullary electroreceptors of *Plotosus* involves Ca^{++} activated transient K^{+} conductance in the basal membrane of receptor cells", *Brain Res.*, 302, (1984a), pp.171-175.
- [17]- Sugawara Y. and Obara S., "Ionic currents in the sensory epithelium examined in isolated electroreceptors of *Plotosus* under simulated *in situ* conditions", *Brain Res.*, 302, (1984b), pp.176-179.
- [18]- Sugawara Y., "Two Calcium current components of the receptor current in the electroreceptors of marine catfish *Plotosus*", *J. Gen. Physiol.*, 93, (1989), pp.365-380.
- [19]- Zakon H.H., "Tuning of newly generated electroreceptors", *Neurosci.*, 10, (1984), p.193.
- [20]- Zipser B. and Bennett M.V.L., "Tetrodotoxin resistant electrically responses of receptor cells", *Brain Res.*, 62, (1973), pp.253-259.
- [21]- Spurr A.R., "A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy", *J. Ultrastruct. Res.*, 26, (1969), pp.31-43.
- [22]- Szabo T., "Sense organs of the lateral line system in some electric fish of the Gymnotidae, Gymnarchidae and Mormyridae", *J. Morphol.*, 117, (1965), pp.229-250.
- [23]- Szamier R.B. and Watchel A.W., "Special cutaneous receptors organs of fish: The ampullary organs of *Eigenmania*", *J. Morphol.*, 128, (1969), pp.261-290.
- [24]- Mullinger A.M., "The organization of ampullary organ in the electric fish *Gymnarchus niloticus*", *Tiss. and cell*, 1, (1969) pp.31-52.
- [25]- Derbin C., "Les organes sensoriels des organes spécifiques des poissons électriques. Contribution à l'étude cytologique et cytochimique", Thèse de doctorat ès sciences, (1974). Paris.
- [26]- Freilhöfer D., Körtje K.H. and Rahman H., "Ultrastructural localization of endogenous calcium in the teleost retina", *Histochem. J.*, 22, (1990), pp.63-72.
- [27]- Benshalom G. and Flück A., "Calcium-induced electron density in synaptic vesicles of afferent and efferent synapses on hair cells in the lateral line organ", *Brain Res.*, 121, (1977) pp.173-178.
- [28]- Ripps H., Shakib M., Chappell R.L. and Mac Donald E.D., "Ultrastructural localization and X-ray analysis of calcium-induced electron dense deposits in the skate retina", *Neurosci.*, 4, (1979), pp.1689-1703.
- [29]- Sugawara Y. and Kanaseki T., "A combines physiological and electron microscope study of the electroreceptor of marine catfish, *Plotosus anguillaris* (Lacépède), with special reference to the mechanism of afferent transmissions", *J. Elect. Microsc.*, 25, (1976), pp.214-215.
- [30]- Burton P.R. and Laveri L.S., "The distribution, relationships to other organelles, and calcium sequestering ability of smooth endoplasmic reticulum in frog olfactory axons", *J. Neurosci.*, 5, (1985), pp.3047-3060.
- [31]- Nicaise G., Gillot I., Julliard A.K., Keicher E., Blaineau S., Amsellem J., Meyran J.C., Hernandez-Nicaise M.L., Ciapa B. and Gleyza C., "X-ray microanalysis of calcium containing organelles in resin embedded tissue", *Scanning Microsc.*, 3, (1989), pp.199-220.
- [32]- Ungar F., Piscopo I., Letizia J. and Holtzman E., "Uptake of calcium by the endoplasmic reticulum of the frog photoreceptor", *J. Cell Biol.*, 98, (1984), pp.1645-1655.
- [33]- Akutsu Y. and Obara S., "Calcium dependent receptor potential electroreceptor of marine catfish", *Proc. Jap. Acad.*, 50, (1974), pp.247-251.
- [34]- Denizot J.P., "Adenosine triphosphatases (ATPase) on the sensory cell plasmic membranes of tuberous organs (electroreceptors) of *Gnathonemus petersii* (Mormyridae). Cytochemical study", *Cell. Mol. Biol.*, 26, (1980), pp.653-662.
- [35]- Mata M., Staple J. and Fink D.J., "Ultrastructural distribution of Calcium within neurons. An oxalate pyroantimonate study", *Histochemistry*, 87, (1987), pp.339-349.
- [36]- Henkart M.P., Reese T.S. and Brindley F.J., "Endoplasmic reticulum sequesters calcium in squid giant axon", *Science*, 202, (1978), pp.1300-1302.
- [37]- Hillman D.E. and Llinas R., "Calcium-containing electron-dense structures in the axons of the squid giant synapsee", *J. Cell Biol.*, 61, (1974), pp.146-155.
- [38]- Mata M., Alessi D. and Fink D.J., "S100 is preferentially distributed in myelin forming Schwann cell", *J. Neurocytol.*, 19, (1990), pp.432-442.
- [39]- Djebar A.B., "Utilisation de la méthode de Probst (1986) pour la mise en évidence du calcium intracellulaire dans le système nerveux: remarques sur la méthodologie", Symposium national de microscopie électronique USTHB-Alger, (1999), p. 50.
- [40]- Gautron J., "Effet du calcium et de la stimulation sur les terminaisons nerveuses des jonctions nerf - électroplaque de la Torpille", *Biol. Cell.*, 31, (1985), pp.31-44.
- [41]- Denizot J.P. and Libouban S., "New formation of sensory cells in the tuberous organ (electroreceptor) of *Brienomyrus niger* (Mormyridae) induced by transection of afferent nerve", *Int. J. Devl. Neurosci.*, Vol. 3, 4, (1985), pp.323-330. □