

**ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION, *IN VITRO*, DES GRANULOCYTES
DE L'HÉMOLYPHE DE *BIOMPHALARIA GLABRATA*
(*GASTROPODA, PLANORBIDAE*)
Étude au microscope électronique à balayage (MEB)**

D. MORONA*, J. JOURDANE** et A. AESCHLIMANN*

RÉSUMÉ. L'évolution morphologique *in vitro* sur lamelles de verre de granulocytes de *Biomphalaria glabrata* est décrite au microscope électronique à balayage. 4 stades ont été distingués dans cette évolution :

- stade 1 : cellules globuleuses adhérant très peu à la lamelle ;
- stade 2 : cellules aplaties, en contact avec le support sur une large surface et présentant deux zones cytoplasmiques bien distinctes, l'endoplasme qui contient le noyau et l'ectoplasme prolongé par de très fins filopodes terminés par un bulbe sphérique ;
- stade 3 : cellules très aplaties adhérant les unes aux autres ;
- stade 4 : cellules totalement étalées sur la lame de verre, l'ectoplasme incluant les filopodes.

Ces 4 stades correspondraient aux stades de l'évolution ontogénique des granulocytes dans leur fonction de défense cellulaire contre les éléments étrangers.

Study of the *in vitro* evolution of the hemolymph granulocytes of *Biomphalaria glabrata*. Study by scanning electron microscopy

SUMMARY. The morphological evolution *in vitro* of *Biomphalaria glabrata* granulocytes on a cover-glass is described by scanning electron microscopy. 4 stages have been characterized :

- stage 1 : globular cells showing low adhesion to cover-glass ;
- stage 2 : flattened cells in contact with substrate over a large surface, which present two well differentiated cytoplasmic zones : an endoplasm in which the nucleus is embedded and an ectoplasm which extends into very thin filopodia with a spherical terminal bulb ;
- stage 3 : cells which are very flattened and which adhere to each other ;
- stage 4 : cells which are completely spread on the cover-glass, in which the ectoplasm includes the filopodia.

These 4 stages probably represent the granulocyte ontogenetic stages in their role in cellular defense against foreign substances.

* Institut de Zoologie (Directeur : Pr A. Aeschlimann), Université de Neuchâtel, CH-2000 Neuchâtel 7.

** Département de Biologie Animale (Directeur : Pr C. Combes), Université, Avenue de Villeneuve, F 66025 Perpignan Cedex.

Accepté le 5 décembre 1983.

Dès 1952, les travaux de Newton sur les relations entre *Biomphalaria glabrata* et *Schistosoma mansoni* montrent que dans un couple non compatible les larves qui ont franchi la barrière tégumentaire sont très rapidement détruites par les amœbocytes de l'hôte, alors qu'elles ne suscitent jamais de réaction dans un couple compatible. Cette réaction de défense met en jeu des mécanismes de nature immunologique qui ont fait jusqu'ici l'objet d'un certain nombre de mises au point synthétiques (Bayne, 1977, Cheng, 1979 et Lackie, 1980).

Les auteurs qui se sont intéressés à ces problèmes s'accordent à reconnaître que la composante principale de la réaction de rejet dans un couple Mollusque-parasite en situation d'incompatibilité est de nature cellulaire (Cheng, 1975, 1977 et 1979 ; Bénex et Jacobelli, 1980 ; Bayne, Buckley et Dewan, 1980 ; Lie, Jeong et Heyneman, 1980 ; Stumpf et Gilbertson, 1980).

L'hémolymphe de *B. glabrata* comporte, selon les connaissances actuelles, deux types de cellules, les granulocytes et les hyalinocytes (Cheng, 1975). Si le rôle des granulocytes et leur intervention dans la réponse immune du Planorbe ont pu être déterminés avec précision (Tripp, 1961 ; Cheng et Garrabant, 1977 ; Cheng, 1979), les hyalinocytes, par contre, ne semblent pas participer aux processus de défense du Mollusque.

Malgré le rôle prépondérant joué par les granulocytes de Mollusques dans les processus immunitaires à médiation cellulaire, les données sur la différenciation et la morphologie fine de ces cellules restent peu nombreuses (Cheng et Auld, 1977 ; Cheng *et al.*, 1979). Dans le cadre d'un programme d'étude sur les mécanismes de rejet dans les couples Mollusque-Schistosome incompatibles, nous avons été conduits à mener une étude préliminaire au microscope électronique à balayage (MEB) de l'évolution morphologique *in vitro* des granulocytes. Nous présentons ici le résultat de nos recherches.

Matériel et méthodes

A — Récolte de l'hémolymphe de *B. glabrata*

Le Planorbe (souche albinos d'origine brésilienne) est placé à plat dans une coupelle et sa coquille est percée à niveau de la glande génitale. Au toucher de son pied, le Mollusque se rétracte dans sa coquille. Sous cette pression le sang jaillit par l'orifice et est récolté avec une pipette Pasteur.

B — Préparation de l'hémolymphe

Une goutte d'hémolymphe est déposée sur une lamelle de verre (18 × 18 mm) dans un peu de solution physiologique de Chernin (1963). Cette solution présente la même pression osmotique que l'hémolymphe du Mollusque. Avant l'adjonction du fixateur, les cellules ont été incubées au bain-marie à 26 °C pendant différents temps d'essai : 10', 20', 60'. Ces pauses leur permettent d'adhérer aux lamelles. Le temps 20' s'est révélé être le temps d'incubation qui nous a fourni les meilleures préparations.

C — Fixation de l'hémolymphe

Préfixation au glutaraldéhyde 0,25% dans du Chernin + 0,6% de glucose	60' à 26° C
Fixation au glutaraldéhyde 2,5% dans du Chernin + 0,6% de glucose	60' à 4° C
Lavage au Chernin + 1% de glucose	2 × 10' = 12 h.
Postfixation à l'OsO ₄ 1% dans de la S-collidine 0,2 M et pH 7,4	60' à 4° C
Lavage à la S-collidine	1 à 2 h.
Déshydratation à l'acétone 30% (2'), 40% (2'), ... 90% (3 × 5')	
Séchage par passage au point critique du CO ₂	
Dorage dans un Sputter (Balzers)	3' à 25 MA
Observation au MET (Philips 500)	

Résultats

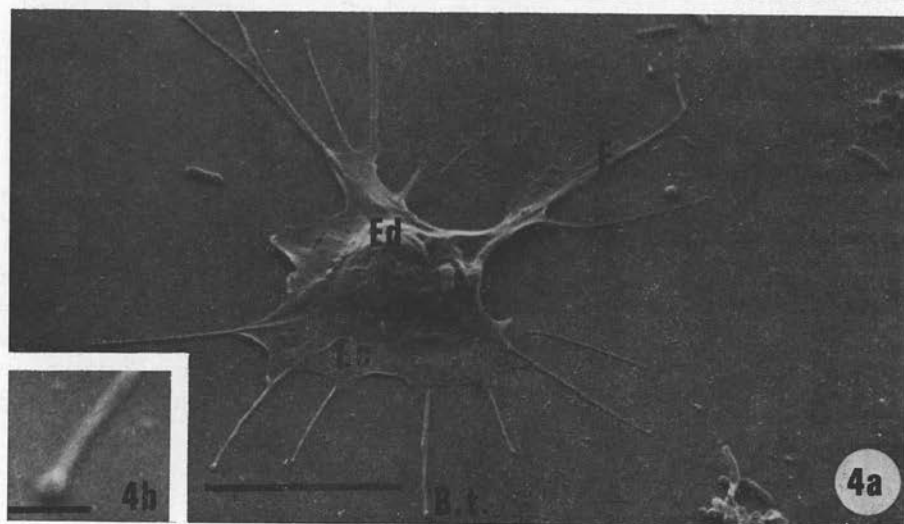
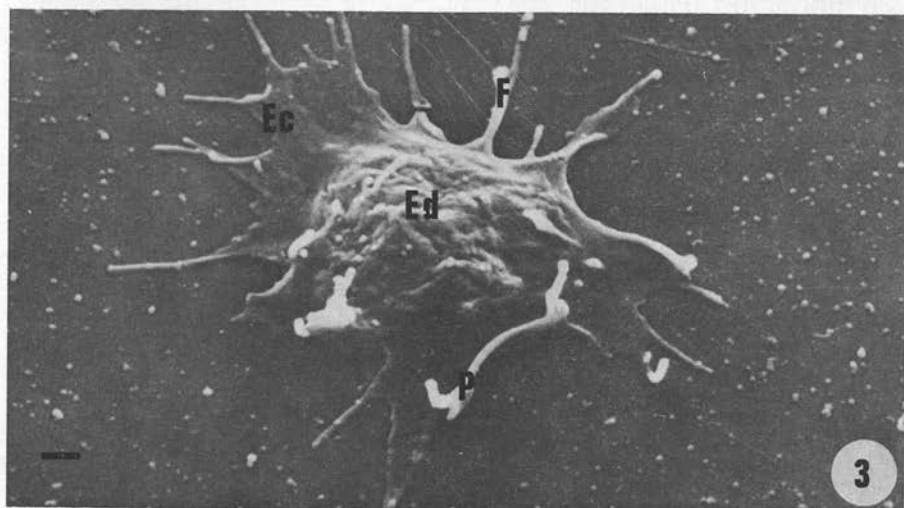
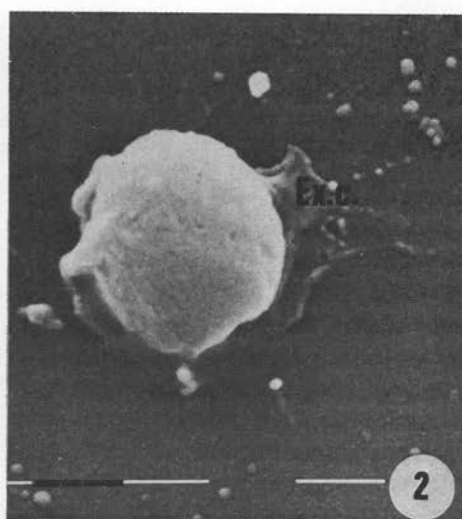
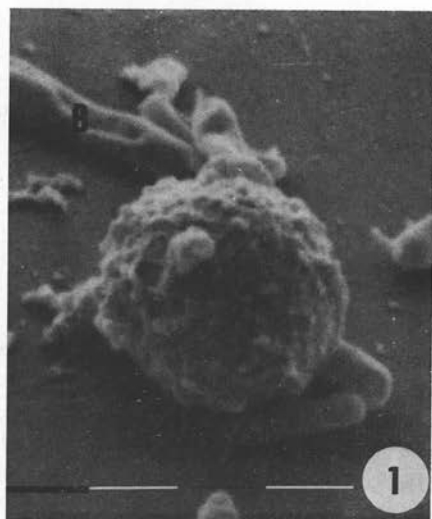
Pour un même temps d'incubation (20 minutes), toutes les cellules fixées sur la lamelle n'offrent pas la même taille et la même morphologie : elles peuvent apparaître sphériques, plus ou moins étalées ou complètement aplaties. Nous avons distingué 4 stades (1 à 4) selon leur degré d'étirement. La classification ci-après se base donc sur une différence comportementale des cellules vis-à-vis du support qui leur est offert.

Stade 1 (fig. 1 et 2)

Les cellules sont globuleuses et mesurent $5,3 \mu\text{m} \pm 1,8 \mu\text{m}$ de long sur $3,8 \mu\text{m} \pm 2,6 \mu\text{m}$ de large. Elles n'adhèrent à la lamelle que par une petite portion de leur surface. Celle-ci peut être lisse ou ornée de petits renflements, lui conférant un aspect granuleux. On observe déjà de courtes expansions cytoplasmiques d'un diamètre moyen de $0,27 \mu\text{m} \pm 0,2 \mu\text{m}$. Dans la *figure 2*, la cellule commence à s'étaler au point de contact avec le verre, formant un voile cytoplasmique mince qui adhère à la lamelle.

Stade 2 (fig. 3, 4a et 4b)

Les cellules, plus aplaties et étalées, sont en contact avec le verre par une grande surface de leur corps. Leur dimension correspond environ au double du stade précédent, soit $18,5 \mu\text{m} \pm 24 \mu\text{m}$ de long sur $10 \mu\text{m} \pm 4,8 \mu\text{m}$. La cellule présente deux zones cytoplasmiques distinctes, l'endoplasme et l'ectoplasme. L'endoplasme est représenté par une masse centrale renflée ; elle contient le noyau, les organelles et diverses inclusions. L'ectoplasme est une zone marginale, amincie, portant des filopodes. Cette zone adhère intimement à la lamelle quoiqu'elle puisse former des plis plus ou moins marqués.



Entre ce stade et le stade suivant on peut observer diverses formes de transition où l'endoplasme n'est plus que légèrement surélevé au-dessus de la lamelle ; l'étalement de l'ectoplasme est plus prononcé et les filopodes plus allongés et nombreux (fig. 4a). Chaque filopode est terminé par un petit bulbe sphérique (fig. 4b).

Stade 3 (fig. 5, 6, 7 et 8)

Les cellules mesurent $37,6 \mu\text{m} \pm 21,3 \mu\text{m}$ de long sur $21 \mu\text{m} \pm 11 \mu\text{m}$ de large. La surface de la cellule adhérant à la lamelle est six fois supérieure à celle du stade 1. L'ectoplasme s'est considérablement étendu entre les longs filopodes et ne forme plus qu'une couche très mince sur tout le pourtour de l'endoplasme. Les filopodes divergent dans toutes les directions et peuvent parfois se ramifier. Ils donnent à la cellule un aspect étoilé.

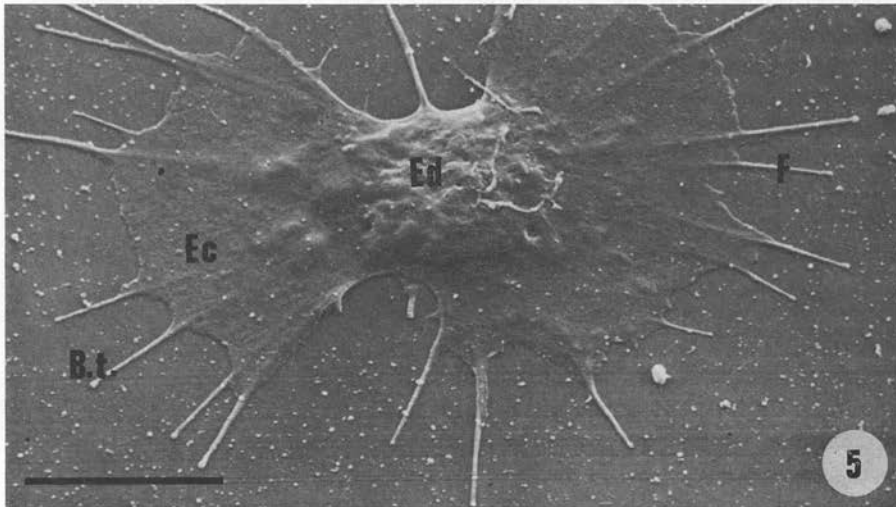


FIG. 5. — Granulocyte de *Biomphalaria glabrata*. Stade 3. L'ectoplasme (Ec) s'est étendu entre les longs filopodes (F). Ed = endoplasme — B.t. = bouton terminal. Échelle = $10 \mu\text{m}$.

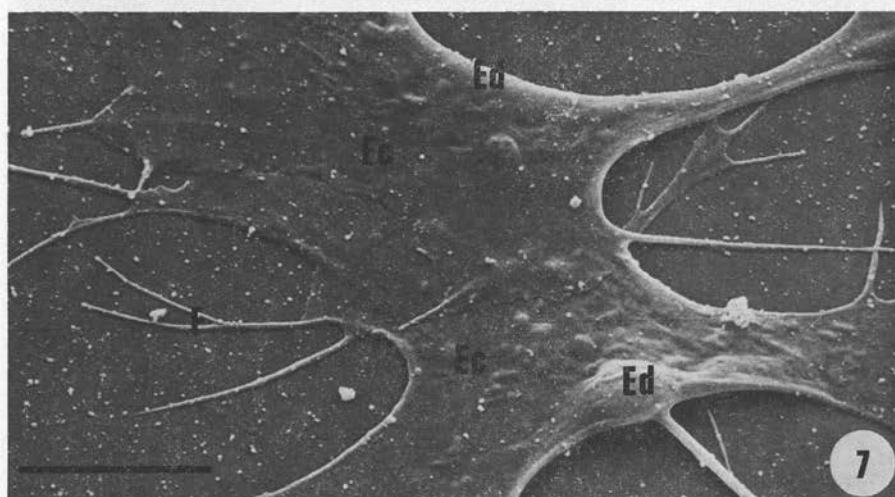
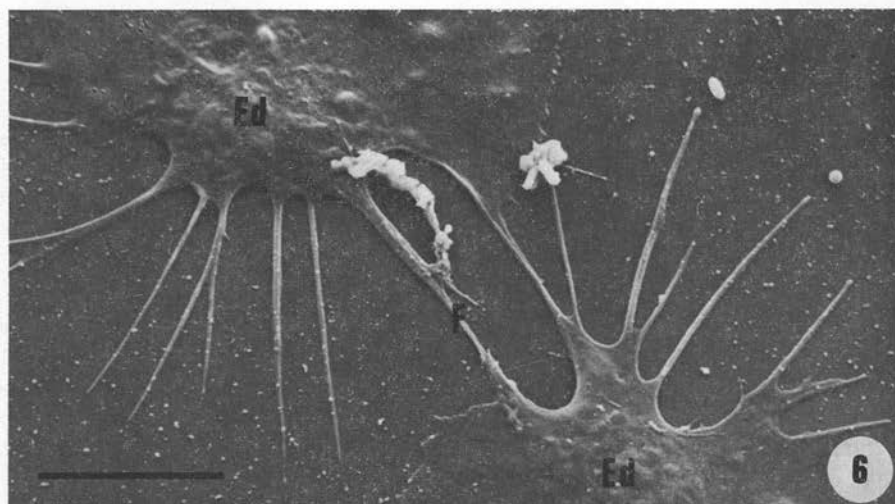
FIG. 1 à 4.

Fig. 1 et 2 : Granulocytes de *Biomphalaria glabrata*. Stade 1. Les cellules sont globuleuses. Elles peuvent présenter de courtes expansions cytoplasmiques (Ex. c.). B = bactéries. Échelle = $1 \mu\text{m}$.

Fig. 3 : Granulocyte de *Biomphalaria glabrata*. Stade 2. La cellule s'est étalée. On distingue l'ectoplasme (Ec) et l'endoplasme (Ed) ainsi que les filopodes (F). L'ectoplasme peut former des plis (P). Échelle = $1 \mu\text{m}$.

Fig. 4a : Granulocyte de *Biomphalaria glabrata*. Stade de transition. L'endoplasme (Ed) est surélevé au-dessus de la lamelle. L'étalement de l'ectoplasme (Ec) est plus prononcé et les filopodes (F), plus allongés et nombreux qu'aux stades précédents. Chaque filopode est terminé par un bulbe sphérique (B.t.). Échelle = $10 \mu\text{m}$.

Fig. 4b : Granulocyte de *Biomphalaria glabrata*. Stade de transition. Agrandissement du bulbe terminal. Échelle = $1 \mu\text{m}$.



Dès le stade 3, les cellules s'associent entre elles sur leur support de verre. Le contact se fait soit de filopode à filopode (*fig. 6*), soit entre ectoplasmes de cellules voisines (*fig. 7*), soit entre ectoplasme d'une cellule et filopodes d'une autre (*fig. 8*).

Stade 4 (*fig. 9a et 9b*)

Au stade ultime de son étalement, la cellule est complètement aplatie et la surface en contact avec la lamelle est 12 fois plus importante qu'au stade initial. Sa longueur peut atteindre $62\mu\text{m} \pm 10 \mu\text{m}$. Les filopodes sont inclus dans l'ectoplasme qui est bordé d'un bourrelet continu (*fig. 9b*). Le renflement endoplasmique est à peine visible.

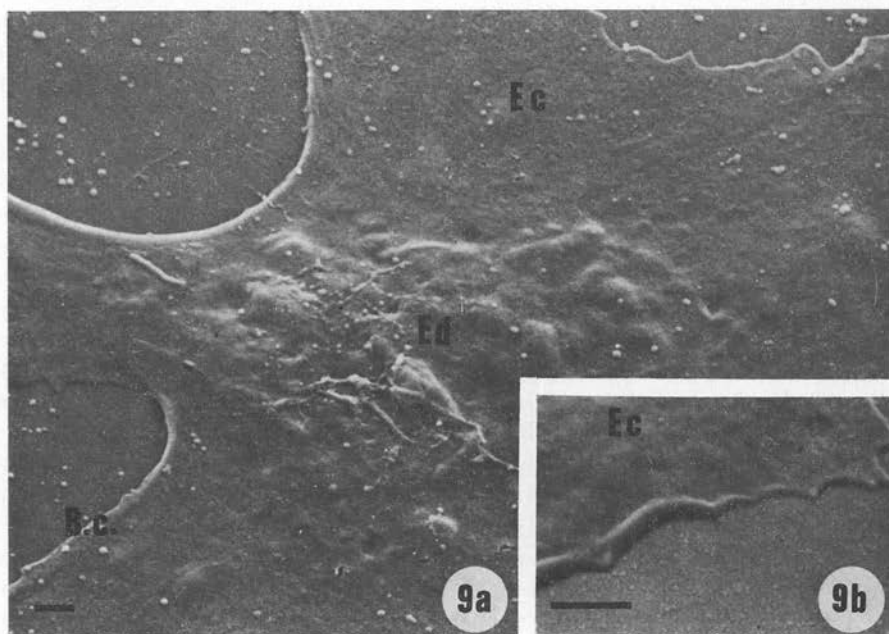


FIG. 9a et 9b. — Granulocytes de *Biomphalaria glabrata*. Stade 4.

Fig. 9a : la cellule est complètement aplatie. Les filopodes sont inclus dans l'ectoplasme (Ec) qui est bordé d'un bourrelet continu (B.c.). Le renflement endoplasmique (Ed) est à peine visible. Échelle = $1 \mu\text{m}$.

Fig. 9b : agrandissement du bourrelet d'un granulocyte. Ec = ectoplasme. Échelle = $1 \mu\text{m}$.

FIG. 6, 7 et 8. — Granulocytes de *Biomphalaria glabrata*. Junctions entre cellules.

Fig. 6 : Jonction entre filopodes (F). Ed = endoplasme. Échelle = $10 \mu\text{m}$.

Fig. 7 : Jonction entre ectoplasme (Ec) de cellules voisines. Ed = endoplasme — F = filopodes. Échelle = $1 \mu\text{m}$.

Fig. 8 : Jonction entre ectoplasme (Ec) d'une cellule et filopodes (F) d'une autre. Échelle = $10 \mu\text{m}$.

Discussion

Cheng *et al.* (1979) sont les premiers à avoir observé au MEB les granulocytes de *B. glabrata* sur lamelles de verre. Ces auteurs décrivent brièvement la cellule sans en préciser les dimensions. Ils ne font pas non plus mention de l'évolution morphologique des cellules lors de l'étalement et des potentialités d'aggrégation de celles-ci. L'unique figure publiée par ces auteurs correspond, à notre avis, à la phase de transition entre les stades 2 et 3. On peut expliquer le fait qu'ils n'aient pas observé les différentes étapes de l'évolution morphologique des granulocytes par l'utilisation de techniques d'incubation et de fixation différentes des nôtres. L'incubation des cellules dans la solution de Chernin permet de préserver leur mobilité et évite que le changement de milieu (de l'hémolymphe du Mollusque au fixateur) soit trop brutal. D'autre part, le fait de préfixer les cellules avec une faible concentration de glutaraldéhyde empêche leur rétraction ou leur rupture.

Nos observations révèlent que les granulocytes, en contact avec un substrat, manifestent une tendance à s'étaler puis à s'associer entre eux. Les lamelles constituent évidemment un substrat exceptionnel de par leur surface plane et lisse. Une telle situation ne se retrouve pas *in vivo*. Les conditions d'expérience jouent donc un rôle important dans le degré d'étalement des cellules.

Au cours de nos multiples étalements, nous n'avons retrouvé que très rarement des granulocytes isolés. Dès le stade 3, ceux-ci tendent très nettement à s'aggréger entre eux. Ce comportement laisse envisager assez facilement leur fonction chez le Mollusque. Les granulocytes entourent en effet tout corps étranger reconnu comme « non self » et l'isolent par encapsulation.

Dans le processus de jonction entre granulocytes, nous avons remarqué l'intervention fréquente des filopodes et de leur bulbe terminal. Cheng *et al.* (1979) ont émis une hypothèse concernant la fonction des ampoules terminales des filopodes : celles-ci seraient le point de croissance des filopodes et en quelque sorte une réserve de matériel pour l'élongation de la cellule. Nous pensons que les ampoules pourraient aussi jouer un rôle d'ancrage au cours du déplacement des granulocytes sur leur support. Elles pourraient également favoriser les contacts intercellulaires, par exemple dans les processus d'encapsulation. Notons qu'une cellule très étalée n'envoie que de rares filopodes : le bord de son ectoplasme forme essentiellement un bourrelet continu ; c'est peut-être à partir de cette ultime réserve ectoplasmique que le granulocyte pourrait s'étirer.

Il serait intéressant de pouvoir attribuer un rôle précis aux stades morphologiques que nous avons distingués. A notre avis, les stades représentent différentes étapes de l'évolution ontogénique du granulocyte dans sa fonction de défense cellulaire. Le stade 1, globuleux, représenterait la forme circulante des granulocytes dans l'hémolymphe : il s'observe rarement sur nos préparations alors que les autres stades apparaissent chacun avec la même fréquence. Les stades étoilés 2 et 3 représenteraient vraisemblablement des formes à fonction phagocytaire. Le stade 4, le plus

étalé, toujours associé à d'autres cellules *in vitro*, correspondrait à la morphologie du granulocyte participant au processus d'encapsulation.

Notre étude nous a permis d'apporter un certain nombre de données sur la différenciation morphologique *in vitro* des granulocytes liée à leur fonction physiologique. Un travail actuellement en cours sur les hyalinocytes nous permettra de compléter les connaissances sur la morphologie fonctionnelle de l'ensemble des éléments figurés de l'hémolymphe de *B. glabrata*.

BIBLIOGRAPHIE

- BAYNE C. J. : Molluscan immunology : elevation in responses. *Dptal Immunobiol., Biomed. Press*, Amsterdam, 1977.
- BENEX J., JACOBELLI G. : Exploration de l'immunité cellulaire chez les mollusques hôtes de schistosomes : *Biomphalaria glabrata*. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 1980, 2, 206-213.
- CHENG T. C. : Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. 1975. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1975, 266, 943-979.
- CHENG T. C. : Biochemical and ultrastructural evidence for the double role of phagocytose in molluscs : defense and nutrition. *Comp. Pathobiol.*, 1977, 3, 21-30.
- CHENG T. C. : Cellular immunity in molluscs with emphasis on the intermediate host of human-infecting schistosomes. *Nat. Acad. Sci. Ilav News*, 1979, 22, 9-16.
- CHENG T. C., AULD K. R. : Hemocytes of the pulmonate Gastropod *B. glabrata*. *J. Invert. Pathol.*, 1977, 30, 119-122.
- CHENG T. C., BUTLER M. S., GUIDA V. E., GERHART P. L. : A scanning electron microscope study of the pseudopodia of *Biomphalaria glabrata* granulocytes. *J. Invert. Pathol.*, 1979, 66, 118-120.
- CHENG T. C., GARRABRANT T. A. : Acid phosphatase in granulocytic capsules formed in strains of *Biomphalaria glabrata* totally and partially resistant to *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.*, 1977, 7, 467-472.
- CHERNIN E. : Observations on hearts explanted *in vitro* from the snail *Australorbis glabratus*. *J. Parasitol.*, 1963, 49, 353-364.
- CHERNIN E. : Transplantation of larval *Schistosoma mansoni* from infected to uninfected snails. *J. Parasitol.*, 1966, 52, 473-482.
- LACKIE A. M. : Invertebrate immunity. *Parasitology*, 1980, 80, 393-412.
- LIE K. J., JEONG K. H., HEYNEMAN D. : Tissue reactions induced by *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1980, 74, 157-166.
- NEWTON W. L. : The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 1952, 38, 362-366.
- STUMPF J. L., GILBERTSON D. E. : Differential leukocytic responses of *Biomphalaria glabrata* to infection with *Schistosoma mansoni*. *J. Invert. Pathol.*, 1980, 35, 217-218.
- TRIPP M. R. : The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail *Australorbis glabratus*. *J. Parasitol.*, 1961, 47, 745-751.
-