

Hypothèse sur le mécanisme de l'évagination du filament urticant des cnidocystes

Hypothesis on the mechanism of cnidocyst discharge

Danièle Carré¹⁾

Station Zoologique, Villefranche-sur-Mer/France

Received July 10, 1979

Accepted October 26, 1979

Cnidogenesis — cnidocystic discharge — nematocysts

The geometric aspects of the cnidocystic filament before invagination, during invagination and after the process of evagination are shown.

Experiments are described that allow an approach to study the mechanism of discharge. It is suggested here that the filament is an elastic tube which, when it is intracapsular, is folded and spiraled and thus, under a constraining action. Evagination then consists simply in the release of the constraining force and reversion of the filament to the primitive cylindric shape. The presence of water seems indispensable to the process to take place; however this does not necessarily imply that a hydration take place in the filament wall. It also seems obvious that if expansion is a normal tendency of the constrained filament, eversion is a result of the continuity between the wall of the filament and that of the capsule.

In conclusion, the invagination of the tube during cnidogenesis may be interpreted as a mean of storing energy for the evagination.

Introduction

Le cnidocyste, qui définit l'embranchement des cnidaires, est un produit de sécrétion présentant un haut degré d'organisation structurale. Il se développe dans une cellule appelée cnidocyte. Il est constitué par une capsule contenant un long filament capable de s'évagner sous l'action de certains stimuli. L'origine, intracapsulaire ou extracapsulaire, du filament urticant est encore controversée dans des publications récentes [1, 19] bien que cette question soit étudiée depuis plus d'un siècle. Cette incertitude tient au fait que les auteurs ont fait des observations ponctuelles sur des cnidocystes fixés. Pour pallier cette difficulté, nous avons travaillé sur de gros cnidocystes de siphonophores observables «in vivo». Ceci nous a permis de suivre, à l'intérieur d'une même cellule, la sécrétion de la capsule par l'appareil de Golgi, puis d'un long filament extracapsulaire qui croît à partir de l'un des pôles de la capsule et devient intracapsulaire dans un second temps, en

s'invaginant progressivement sur lui-même, depuis son extrémité libre jusqu'à sa base [3, 4].

L'étude de la cnidogenèse, outre une meilleure compréhension de la nature des cnidocystes, nous permet d'aborder en termes nouveaux le mécanisme de leur évagination brutale. Plusieurs hypothèses avaient été avancées pour expliquer l'extrusion du filament urticant:

1. Production d'énergie, au moment de l'évagination, par des réactions enzymatiques dans le cytoplasme du cnidocyte [10, 21].

2. Contraction de l'appareil périnématocystique différencié par le cnidocyte autour du cnidocyste. Cette contraction provoquerait une augmentation de la pression intracapsulaire entraînant la sortie du filament [16, 5, 20].

3. Entrée d'eau dans la capsule accompagnée de l'évagination du tube suivant le principe de l'osmomètre de Pfeffer [8, 14, 18, 17].

4. Dilatation du tube cnidocystique. Cette hypothèse, proposée par Picken (12) reprend l'idée «d'élasticité dilatante de la paroi tubulaire» développée par Dujardin [6], Zoja [22] et von Gelei [7]. L'augmentation de la longueur et du diamètre du tube, observée au cours de l'évagination, serait le moteur de son extrusion. Elle résulterait d'un réarrangement de la structure de la membrane par incorporation de molécules d'eau. Ultérieurement, Skaer et Picken [17] dénoncent cette hypothèse après une étude ultrastructurale du filament montrant que l'évagination consiste en un simple retournement en doigt de gant et déploiement d'une structure préexistante.

Nous discutons ces différentes théories en nous basant sur l'étude de la cnidogenèse, sur la géométrie du tube cnidocystique et sur quelques expériences simples.

Matériel et méthodes

Les observations «in vivo» ont été faites chez plusieurs espèces de siphonophores à l'aide d'un microscope à contraste interférentiel.

Les observations en microscopie électronique concernent divers cnidaires fixés à la glutaraldéhyde et au tétroxyde d'osmium tamponnés, puis inclus suivant la méthode de Spurr.

Les expériences ont porté sur des eurytèles microbasiques du siphonophore physonecte *Agalma elegans*.

¹⁾ Danièle Carré, Station Zoologique, F-06230 Villefranche-sur-Mer/France.

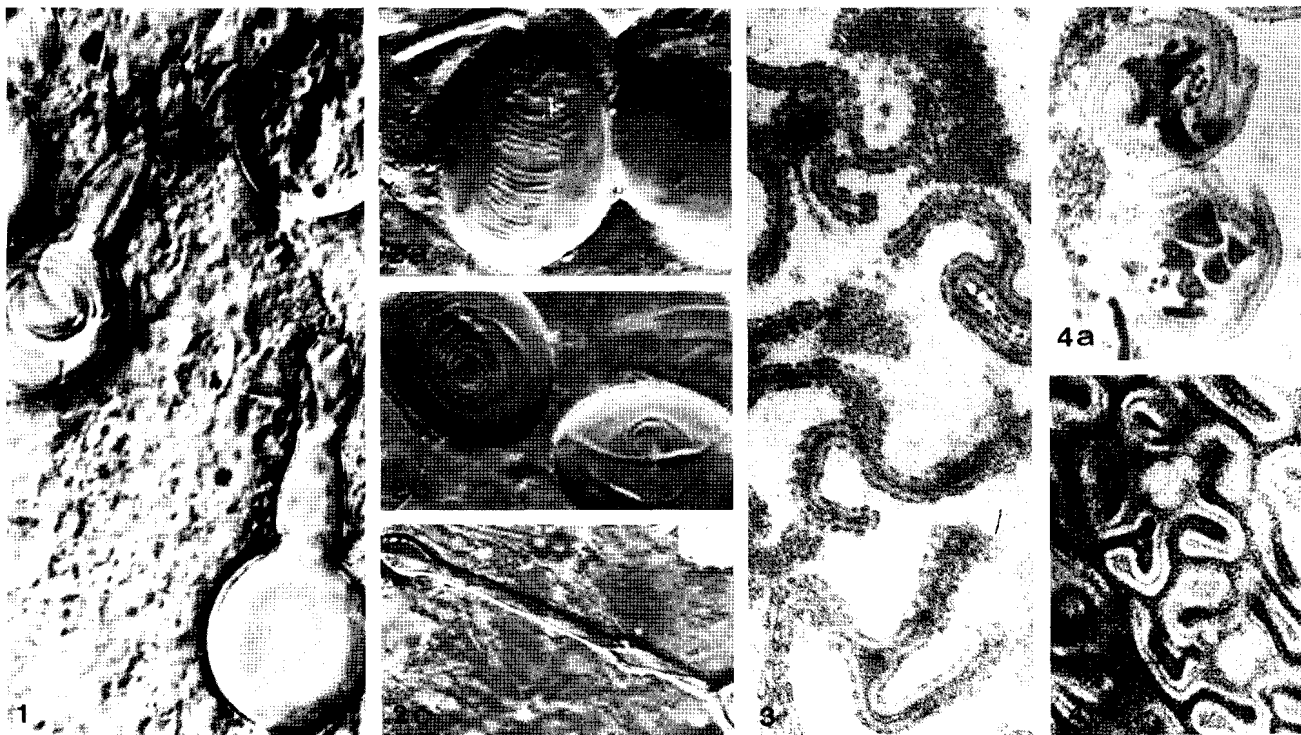


Fig. 1. Sténotèles d'*Apolemia uvaria* (non évaginé-partiellement évaginé-totalement évaginé). — 900 ×.

Fig. 2. Birhapoloïdes d'*Apolemia uvaria*. — a. Invagination du 2ème renflement du filament au cours de la cnidogénèse. — 1500 ×. — b. Stade à filament interne. — 1100 ×. — c. Partie basale d'un filament évaginé. — 700 ×.

Fig. 3. Mastigophore de *Maggiaea kochi*: coupes transversales du filament intracapsulaire replié suivant trois génératrices. — 60 000 ×.

Fig. 4a. Desmonème de *Maggiaea kochi*: coupes transversales du filament intracapsulaire. — 40 000 ×. — b. Isorhize d'*Euchlora rubra*: coupes transversales dans le filament intracapsulaire replié suivant cinq génératrices. — 30 000 ×.

Rappels et précisions sur certains aspects de la cnidogénèse

Le tube externe reflète, dès les premiers stades de sa sécrétion dans le cytoplasme, la morphologie du filament définitif: tube externe isodiamétrique chez les isorhizes, à deux renflements chez les birhapoloïdes (Fig. 2a), à base dilatée chez les sténotèles ... [4]. Toutefois, l'invagination du tube dans la capsule ne consiste pas en un simple retournement en doigt de gant d'une structure préexistante. Elle est accompagnée de trois modifications: étirement — formation de replis longitudinaux — spiralisation.

1. Étirement du tube cnidocystique (Fig. 2 a, b, c; Fig. 7)

Les observations «in vivo» des stades à tube externe, puis des stades à tube interne, suggèrent cet étirement. L'étude des birhapoloïdes de *Apolemia uvaria* (siphonophore physonecete) permet de le préciser. La Figure 7 représente l'évolution de la distance entre la base du tube et le deuxième renflement. La longueur de ce segment ne varie pas entre le moment de sa sécrétion et celui de son invagination (26 μm).

Par contre, à l'intérieur de la capsule, il mesure 48 μm. Le tube étant spiralé à ce stade (cf. § 3), le segment considéré est, en fait, plus long, et égal à sa longueur après évagination, soit 65 μm.

Ces mesures permettent de supposer que la longueur du filament cnidocystique double presque au cours de son invagination.

2. Repliement du tube

Dans leur étude sur la géométrie du filament urticant, Skaer et Picken [17] et de nombreux auteurs après eux, ont montré qu'à l'intérieur de la capsule le tube n'avait pas une section circulaire mais était replié suivant trois génératrices (Fig. 3). L'étude de la cnidogénèse nous permet de préciser que ce plissement se produit au moment de l'invagination (Fig. 5). Il peut, en fait, se réaliser suivant plusieurs modalités. Dans tous les cas où le tube est très long et très fin, les replis sont réguliers, le plus souvent au nombre de trois, parfois au nombre de cinq (exemple des isorhizes exogènes du cténophore *Euchlora rubra*, Fig. 4b). Dans le cas de filaments cnidocystiques plus courts et de gros diamètres, comme ceux des rhopalonèmes et des desmonèmes (Fig. 4a) les replis sont moins réguliers, le cas extrême étant celui des ptychocystes [11] dont le nombre de replis diminue en allant de la base vers l'extrémité du tube (de 6 à 10).

3. Spiralisation du tube cnidocystique

Nous distinguons deux types de spiralisation. La première, facilement observable en microscopie photonique, correspond aux larges spires suivant lesquelles s'agence le filament dans la capsule (Figs. 1, 2a, b). La seconde, autour du filament, avec un pas beaucoup plus petit, a été décrite par Bretschneider [2] puis Skaer et Picken [17] en microscopie élec-

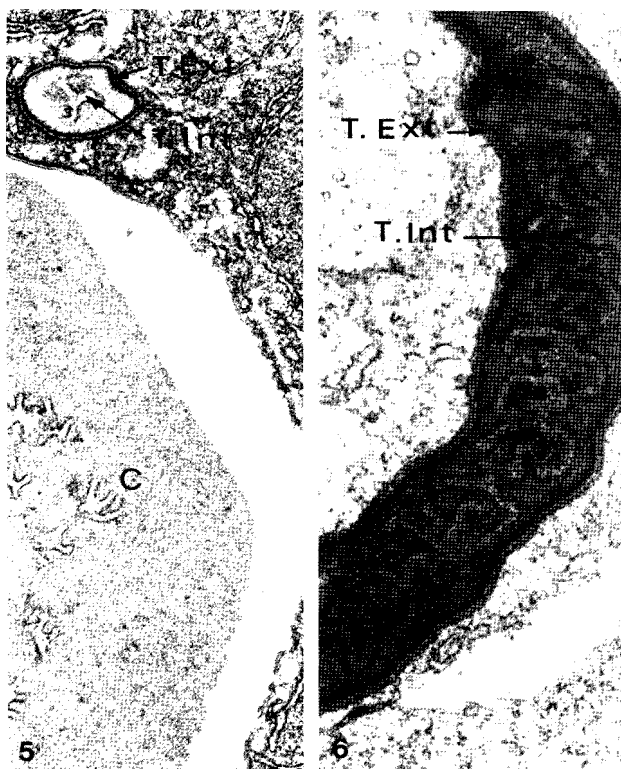


Fig. 5. Cnidogenèse chez *Muggiaea kochi*: dans le cytoplasme du cnidocyte le tube externe (T. Ext) en coupe transversale contient la partie du tube (T. int) en cours d'invagination vers la capsule (C) et déjà repliée suivant 3 génératrices. — 12 000 \times .

Fig. 6. Cnidogenèse chez *Muggiaea kochi*: Tube externe (T. Ext), en coupe longitudinale contenant une portion du tube int (T. int) en cours d'invagination vers la capsule et spiralée. — 16 000 \times .

tronique. En étudiant la cnidogenèse, nous avons observé que cette spiralisierung secondaire se produit au cours de l'invagination du filament qui progresse vers la capsule avec un mouvement de vrille (Figs. 2a, 6). Elle est la règle chez tous les cnidocytes à tube long et fin. Dans le cas des cnidocytes à tube large et relativement court, elle peut faire défaut (cas des ptychocystes et des rhopalonèmes).

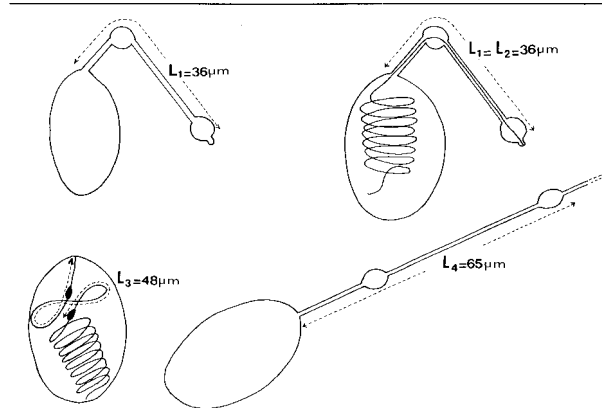


Fig. 7. Birhopaloïde d'*Apolemia uvaria*: étirement du filament cnidocystique.

4. Etude comparée de la géométrie du filament urticant au cours de la vie du cnidocyte

Au stade extracapsulaire le filament, si on fait abstraction des différenciations basales typiques de chaque catégorie de cnidocyte, est cylindrique. A l'intérieur de la capsule, il présente toujours des replis longitudinaux et, le plus souvent, la double spiralisierung. Après évagination il a, de nouveau, une structure cylindrique.

Les expériences que nous allons décrire sont basées sur une hypothèse de travail: l'invagination du filament n'est pas seulement la mise en place d'une structure intracapsulaire; elle est surtout le moyen de stocker, sous forme de contraintes mécaniques, l'énergie nécessaire à l'évagination brutale. Pendant les deux à trois heures de l'invagination, l'organisation spatiale du tube se modifie profondément, la transformation la plus fréquente aboutissant à la structure décrite par Skaer et Picken [17] le cas le plus exceptionnel étant celui des ptychocystes avec un nombre variable de replis et pas de spiralisierung secondaire.

Nous nous proposons d'envisager l'évagination comme une simple suppression des forces de contrainte permettant le retour du tube à sa forme cylindrique initiale, le retournement simultané en doigt de gant n'étant que le résultat de la continuité physique existant entre le tube et la capsule.

Expérimentation

Toutes les expériences ont été faites sur des eurytèles microbasiques d'*Agalma elegans* (siphonophore physonecte) (Fig. 8), isolés mécaniquement et laissés trente minutes dans un dessiccateur afin de détruire le cnidocyte enveloppant normalement la capsule et d'éliminer toute trace d'humidité.

1ère expérience (Figs. 9, 14)

Des eurytèles sont sectionnés transversalement puis réhydratés par l'adjonction d'eau distillée. On observe une extrusion brutale, sans éversion, des fragments de tube contenus dans chaque demi-capsule, qui se déplient et se dés spiralisent. Leur diamètre est égal à celui d'un tube normalement évaginé. Enfin, l'opercule qui obture la zone d'insertion du tube sur la capsule reste en place.

2ème expérience (Figs. 10, 15)

A l'aide d'une aiguille de verre, on effectue une brèche dans la capsule, à proximité de l'opercule, puis on réhydrate la préparation. On observe une extrusion rapide du filament sans éversion, par la brèche sous-operculaire. On note que le diamètre du filament est égal à celui d'un filament normalement évaginé. Il en est de même pour le diamètre et la longueur de la hampe.

3ème expérience (Figs. 11, 16)

Les deux expériences suivantes portent sur des eurytèles partiellement évagins. Pour cela, on place des capsules dans des microgouttes d'eau distillée et on provoque leur évagination par pression. L'extrusion du filament s'arrête d'elle-même dès qu'il émerge de la goutte d'eau. La préparation est alors desséchée et on effectue une brèche sous-operculaire comme



Fig. 8. Eurytèles microbasiques d'*Agalma elegans*. — 500 ×.

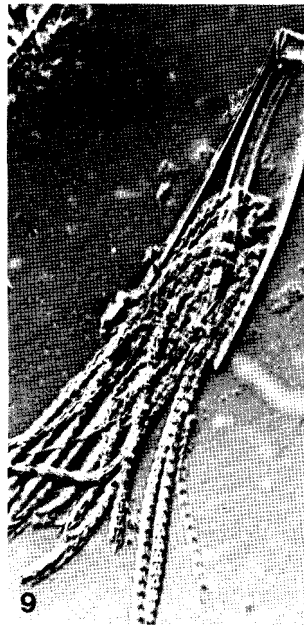
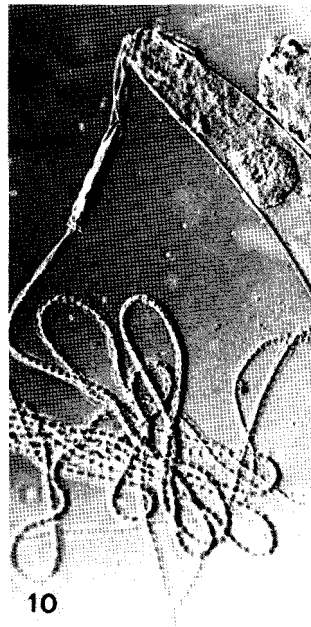


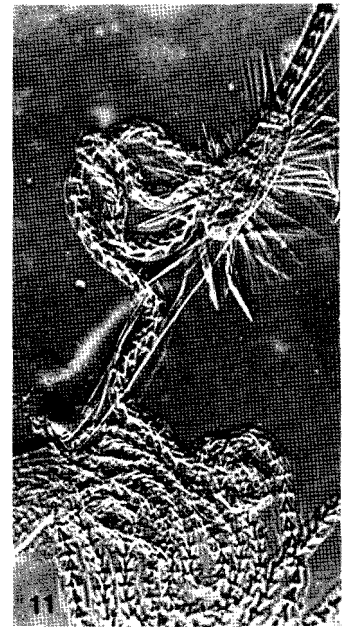
Fig. 9. Expérience 1: extrusion du filament sans éversion après section et réhydratation de la capsule. — 700 ×.

Fig. 10. Expérience 2: extrusion du filament sans éversion, par une brèche sous operculaire. — 500 ×.

Fig. 11. Expérience 3: extrusion du filament sans éversion par une brèche sous-operculaire chez un eurytèle partiellement évaginé. — 850 ×.



10



11

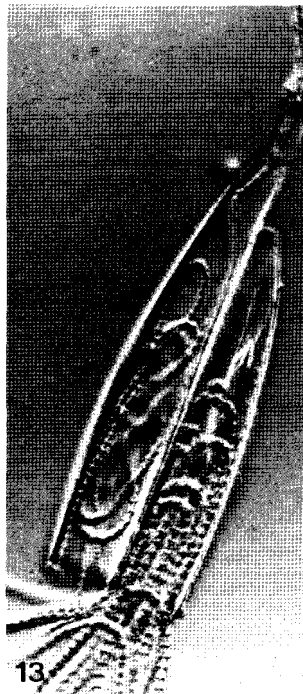
dans l'expérience précédente. La réhydratation n'entraîne pas la reprise de l'évagination, mais la sortie brutale, par la brèche sous-operculaire, de la partie du tube qui était encore dans la capsule. Le tube se déplie, se dés spiralise, mais il n'y a pas d'éversion.

4ème expérience (Figs. 12, 13, 17)

On effectue une très petite brèche dans la capsule d'un eurytèle partiellement évaginé et déshydraté, puis on ajoute une goutte d'eau distillée à proximité de la préparation. Cette atmosphère humide entraîne une hydratation de la partie non évaginée du filament qui se déplisse et se dés spiralise, mais trop progressivement pour provoquer son extrusion. On observe uniquement des mouvements intracapsulaires, qui correspondent à la dés spiralisation, et la réinvagination, dans la capsule, d'une partie du filament contenu dans le tube évaginé (phénomène de «back fire» de Picken et Skaer [11]). Cette réinvagination apparente doit être précisée. En fait, il y avait, en début d'expérience, deux tubes emboîtés: un tube externe, déplié et dés spiralé, contenant un tube en cours d'évagination, plié et spiralé. L'hydratation de la préparation au niveau de la brèche de la capsule, entraîne la dilatation, de proche en proche, du tube interne. De ce fait, il dépasse peu à peu, le tube qui l'enveloppait et pénètre à nouveau dans la capsule. Il ne s'agit donc pas d'une véritable réinvagination, comparable à celle observée au cours de la cnidogenèse, avec formation de replis, mais d'une extension d'une partie du tube qui se déplie et se dés spiralise en direction de la capsule. On peut vérifier la dilatation effective de toute la partie interne du filament en effectuant sur cette préparation l'expérience 1. Après section et réhydratation, il y a émergence brutale des morceaux de filaments contenus dans la capsule 2 servant de témoin, tandis qu'aucune modification n'est induite dans la capsule 1 qui a présenté préalablement le phénomène de «back fire» (Fig. 13, 17).



Fig. 12. Expérience 4: Le cnidocyte 1 a présenté le phénomène de «back fire». Noter l'aspect du filament à l'intérieur de la capsule et de la hampe. — 1000 ×.



13

Fig. 13. Expérience 4: Emerge brutale du filament, sans éversion, uniquement dans le cnidocyte 2. — 500 ×.

5ème expérience

Weill [19] avait montré que les cnidocystes gardaient la capacité de s'évaginer après l'action de certains agents physico-chimiques. Ses résultats souvent oubliés par les auteurs récents, nous ont incité à tester, sur les eurytèles d'*Agalma elegans*, l'action de la dessiccation, de la température et de fixateurs aqueux et non aqueux.

- Action de la dessiccation: nous avons conservé des frottis d'eurytèles pendant plus d'une année dans un dessiccateur, sans observer de baisse de leur pouvoir d'évagination, ce qui concorde avec les résultats de Weill.
- Action de la température: des frottis ont été placés pendant plusieurs semaines dans des étuves à 80, 100 et 140°. Dans tous les cas il a été possible d'obtenir l'évagination des filaments après réhydratation. Par contre, pour des températures supérieures à 140° on note une déformation des capsules et la perte du pouvoir d'évagination.
- Action des fixateurs: nous avons obtenu l'évagination de cnidocystes conservés plusieurs jours dans de l'alcool absolu ou de l'acétone. Par contre, chaque fois que le fixateur contient de l'eau (alcool à 70°, ou formol par exemple) le pouvoir d'évagination diminue rapidement et disparaît au bout de quelques jours.

Cas particulier des cnidocystes d'*Euchlora rubra*

Nous avons étudié pour un autre travail en préparation, les cnidocystes exogènes du Ctenophore *Euchlora rubra*. Ils paraissent un cas intéressant à signaler avant d'aborder la discussion.

Chez *Euchlora rubra* les capsules sont régulièrement distribuées le long des filaments pêcheurs à la place des colloblastes. Elles s'évaginent normalement en réponse à des stimuli appropriés. Pourtant, la microscopie électronique montre qu'il n'existe aucune formation comparable à un appareil périnématocystique autour de ces capsules.

Discussion et conclusions

La première conclusion est que le cnidocyte n'est pas indispensable à l'évagination du filament urticant. Toutes nos expériences ont porté sur des capsules dont la cellule avait été détruite par dessiccation ou par l'action de la chaleur ou d'un fixateur chimique. Le cas particulier des isorhizes d'*Euchlora*, assimilables à des capsules nues, montre que les conditions créées expérimentalement peuvent se retrouver, dans certains cas, «in vivo». Nous refutons donc l'hypothèse de

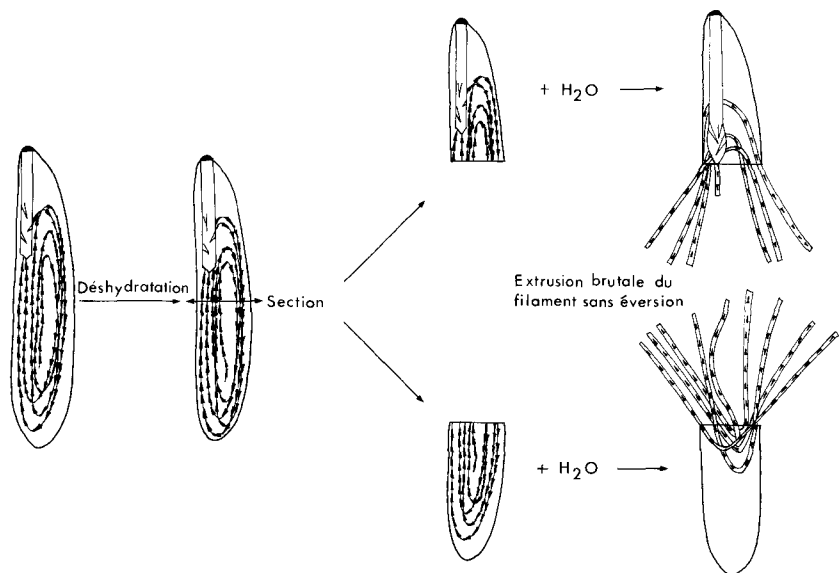


Fig. 14. Expérience 1: Emergence brutale du filament déplié et déspirale sans éversion, après section de la capsule et réhydratation.

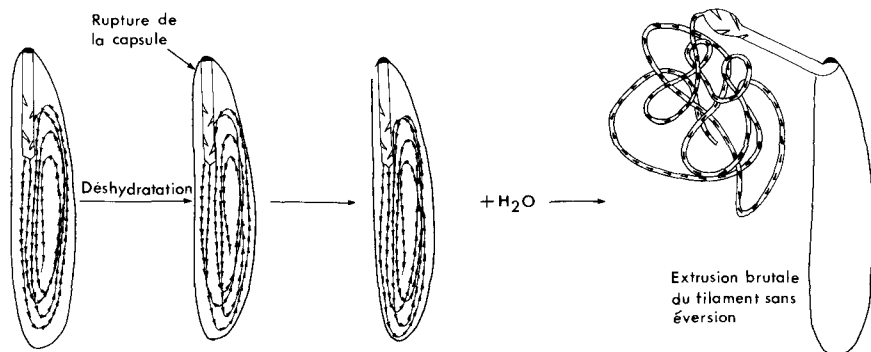


Fig. 15. Expérience 2: Emergence du filament déplié et déspirale, sans éversion, par une brèche sous-operculaire.

Lentz [10] et de Yanagita [21] supposant que le cnidocyte fournit l'énergie nécessaire à l'évagination, ainsi que celle de Russell [16], Chapman et Tilney [5] et Westfall [20] qui associe l'évagination à des contractions de l'appareil périnématocystique.

La troisième hypothèse de Glaser et Sparrow [8], suivis par Robson [14], Slautterback [18] et Skaer et Picken [17], assimile la capsule et son tube à un osmomètre. L'évagination résulterait d'un brusque changement de la perméabilité membranaire entraînant un mouvement d'eau vers la capsule. Les observations de Robson [15] confirment des variations de volume du cnidocyte précédant et accompagnant la décharge. Mais nous avons observé que l'extrusion brutale du filament reste possible lorsque la capsule a été perforée et même sectionnée en deux parties (expériences 1 et 2). Dans ces cas, l'assimilation de la capsule et de son tube à un osmomètre ne peut être acceptée.

La dernière hypothèse est celle avancée puis rejetée par Picken [12, 17]. Cet auteur avait supposé que la dilatation

apparente en longueur et en diamètre du tube au cours de l'évagination, entraînait passivement son extrusion. Mais, ayant observé ultérieurement en microscopie électronique, que la surface du tube ne varie pas entre le stade intracapsulaire et le stade externe, il dénonce sa proposition initiale.

Nos expériences nous conduisent à rejoindre, pour l'essentiel, l'hypothèse première de Picken, c'est à dire, qu'un brusque changement des dimensions du tube est le moteur de son extrusion. Mais, contrairement à cet auteur, et en accord avec les observations ultrastructurales, nous considérons qu'il s'agit d'un changement du volume occupé par le tube et non d'une modification de sa surface [12].

Nous retenons trois étapes dans la vie du cnidocyte:

1. Sécrétion de la capsule et du filament extracapsulaire.
2. Invagination lente du filament dans la capsule (deux à trois heures), accompagnée d'un stockage progressif d'énergie mécanique sous forme d'une spiralisation et de replis longitudinaux du tube.

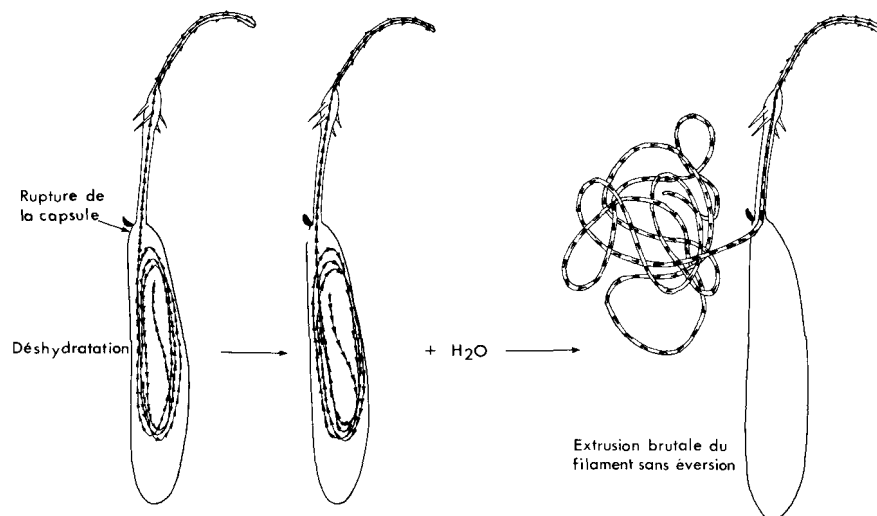


Fig. 16. Expérience 3: Emergence du filament déplié et déspiralé, sans éversion, par une brèche sous-operculaire chez un cnidocyte partiellement évaginé en début d'expérience.

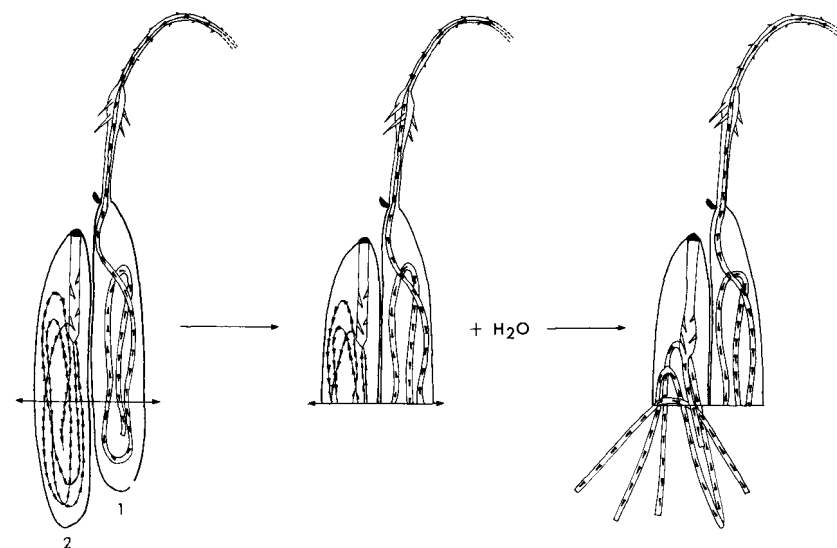


Fig. 17. Expérience 4: Aucune modification n'est induite après section et réhydratation dans le cnidocyte 1 ayant présenté préalablement le phénomène de «back-fire».

3. Rupture des forces de contrainte déformant le tube qui reprend sa forme cylindrique initiale. Le retournement en doigt de gant est un phénomène secondaire résultant uniquement de la continuité qui existe entre le tube et la capsule. Si cette continuité est rompue, ou si une autre voie est ouverte, le tube se détend sans éversion (expériences 1, 2, 3).

Nous ne pouvons pas conclure sur la nature des forces qui maintiennent le tube replié dans la capsule. Il s'agit peut-être de liaisons connectant les membranes jointives. On peut préciser que la suppression de ces forces nécessite la présence d'eau, qu'elle est encore possible après action de la chaleur (jusqu'à 140°), de la dessiccation, de l'alcool absolu. Par contre, nous n'avons jamais obtenu l'évagination de capsules après une fixation prolongée au formol ou dans de l'alcool dilué.

Dans ce travail, nous avons cherché où et quand était produite et éventuellement stockée, l'énergie nécessaire à l'évagination. Nous avons volontairement ignoré les fonctions du cnidocyte dans le contrôle et le déterminisme de ce processus.

Références

- [1] Bouillon, J., C. Massin: La cnidogénèse. *Ann. Soc. r. zool. Belg.* **104**, 7-38 (1974).
- [2] Bretschneider, L. H.: A simple technique for the electron-microscopy of cell and tissue sections. *Proc. K. ned. Akad. Wet.* **52**, 654-666 (1949).
- [3] Carré, D.: Etude du développement des cnidocytes dans le gastrozoïde de *Muggiaea kochi* (Siphonophore calycophore). *C. R. Acad. Sc. Paris.* **275**, 1263-1266 (1972).
- [4] Carré, C., D. Carré: Etude du cnidome et de la cnidogénèse chez *Apolemia uvaria* (Siphonophore physonecte). *Exptl. Cell. Res.* **81**, 237-249 (1973).
- [5] Chapman, G. B., L. G. Tilney: Cytological studies of the nematocyst of *Hydra*. *J. biophys. biochem. cytol.* **5**, 69-84 (1959).
- [6] Dujardin, F.: Mémoire sur le développement des Polypes hydriques et Méduses. *Ann. Sc. Nat. (3)* **4**, 257-281 (1845).
- [7] Geké, J. von: Das Rätsel der Nesselzellen. *Biol. Zbl.* **47**, 327-343 (1927).
- [8] Glaser, O. C., C. M. Sparrow: The physiology of nematocysts. *J. exp. Zool.* **6**, 361-382 (1909).
- [9] Ivester, M. S.: Nematocyst differentiation in the Anthozoon *Renilla reniformis*. *Trans. Amer. Micr. Soc.* **96**, 238-247 (1977).
- [10] Lentz, T. L.: *The Cell Biology of Hydra*. 1-193. North Holland Amsterdam 1966.
- [11] Mariscal, R. N., E. J. Conklin, C. H. Bigger: The ptychocyst, a major new category of Cnida used in tube construction by a cerianthid anemone. *Biol. Bull.*, **152**, 392-405 (1977).
- [12] Picken, L. E. R.: A note on the nematocysts of *Corynactis viridis* Q. *J. Micr. Sci.* **94**, 203-227 (1953).
- [13] Picken, L. E. R., R. J. Skaer: A review of researches on nematocysts. *Symp. Zool. Soc. London* **16**, 19-50 (1966).
- [14] Robson, E. A.: Nematocysts of *Corynactis*. The activity of the filament during discharge. *Quart. J. Micr. Sci.* **94**, 229-235 (1953).
- [15] Robson, E. A.: Discharge of Nematocysts and Capsule Properties. *Publ. Seto Marine Lab.* **20**, 653-673 (1973).
- [16] Russel, F. S.: On the nematocysts of Hydromedusae. III. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* **24**, 515-523 (1940).
- [17] Skaer, R. J., L. E. R. Picken: The structure of the nematocyst thread and the geometry of discharge in *Corynactis viridis* Phil. *Trans. R. Soc. London* **250**, 131-164 (1965).
- [18] Slautterback: Nematocyst development. In: *The biology of Hydra*. (Lenhoff, H. M. et Loomis, W. F. Eds.). 77-129. Univ. of Miami Press. Coral Gables/Florida 1961.
- [19] Weill, R.: Contribution à l'étude des Cnidaires et de leurs nématocystes. *Trav. Sta. Zool. Wimereux* **10**, **11**, 1-701 (1934).
- [20] Westfall, J. A.: Nematocysts of the sea anemone *Metridium*. *Amer. Zool.* **5**, 377-393 (1965).
- [21] Yanagita, T. M.: Cnidoblast as an excitable system. *Publ. Seto Marine Lab.* **20**, 675-693 (1973).
- [22] Zoja, R.: Alcune ricerche morfologiche e fisiologiche sull'*Hydra*. *Boll. Sc.* **12**, 1-90 (1890).

Hypothesis on the mechanism of evagination of the stinging filament of cnidocysts
Hypothesis on the mechanism of cnidocyst discharge
Danièle Carré

Zoological Station, Villefranche-sur-Mer

Cnidogenesis - cnidocyst discharge - nematocysts

The geometric aspects of the cnidocyst filament before invagination, during invagination and after the process of evagination are shown.

Experiments are described that allow an approach to study the mechanism of discharge. It is suggested here that the filament is an elastic tube which, when it is intracapsular, is folded and spiralled and thus, under a constraining action. Evagination then consists simply in the release of the constraining force and reversion of the filament to the primitive cylindrical shape. The presence of water seems essential to the process to take place; however this does not necessarily imply that a hydration take place in the filament wall. It also seems obvious that if expansion is a normal tendency of the constrained filament, eversion is a result of the continuity between the wall of the filament and that of the capsule.

In conclusion, the invagination of the tube during cnidogenesis may be interpreted as a mean of storing energy for the evagination.

Introduction

The cnidocyst, which defines the phylum of cnidarians, is a secretion product with a high degree of structural organization. It develops in a cell called a cnidocyte. It is made up of a capsule containing a long filament capable of evaginating under the action of certain stimuli. The origin, intracapsular or extracapsular, of the stinging filament is still controversial in recent publications [1, 19] although this question has been studied for more than a century. This uncertainty is due to the fact that the authors made occasional observations on fixed cnidocysts. To overcome this difficulty, we worked on large siphonophore cnidocysts which can be observed "*in vivo*". This allowed us to follow, within the same cell, the secretion of the capsule by the Golgi apparatus, then of a long extracapsular filament which grows from one of the poles of the capsule and then becomes intracapsular, gradually invaginating on itself, from its free end to its base [3, 4].

The study of cnidogenesis, in addition to a better understanding of the nature of cnidocysts, allows us to approach in new terms the mechanism of their sudden evagination. Several hypotheses had been put forward to explain the extrusion of the stinging filament:

1. Energy production, at the time of evagination, by enzymatic reactions in the cytoplasm of the cnidocyte

2. Contraction of the perinematocystic apparatus differentiated by the cnidocyte around the cnidocyst. This contraction would cause an increase in intracapsular pressure leading to the exit of the filament [16, 5, 20].

3. Entry of water into the capsule accompanied by evagination of the tube according to the principle of the Pfeffer osmometer [8, 14, 18, 17].

4. Dilation of the cnidocyst tube. This hypothesis, proposed by Picken (12) takes up the idea "dilating elasticity of the tubular wall" developed by Dujardin [6], Zoja [22] and von Gelei [7]. The increase in the length and diameter of the tube, observed during evagination, would be the driving force behind its extrusion. It would result from a rearrangement of the structure of the membrane by the incorporation of water molecules. Subsequently, Skaer and Picken [17] denounce this hypothesis after an ultrastructural study of the filament showing that the evagination consists of a simple reversion of a glove finger and deployment of a pre-existing structure.

We discuss these different theories based on the study of cnidogenesis, the geometry of the cnidocyst tube and some simple experiments.

Material and methods

The "*in vivo*" observations were made in several species of siphonophores using an interference contrast microscope.

The electron microscopic observations concern various cnidarians fixed with buffered glutaraldehyde and osmium tetroxide, then included according to the Spurr method.

The experiments focused on microbasic euryteles of the physonect siphonophore *Agalma elegans*.

Reminders and details on certain aspects of cnidogenesis.

The outer tube reflects, from the early stages of its secretion in the cytoplasm, the morphology of the final filament: isodiametric outer tube in isorhizas, with two swellings in birhopaloids (Fig. 2a), with a dilated base in stenoteles ... [4]. However, the invagination of the tube into the capsule does not consist of a simple reversion of a pre-existing structure. It is accompanied by three modifications: stretching - formation of longitudinal folds - spiralling.

1 Stretching of the cnidocyst tube (Fig. 2 a, b, c; Fig. 7)

The "*in vivo*" observations of the outer tube stages, then the inner tube stages, suggest this stretching. The study of the birhopaloids of *Apoemia uvaria* (physonect siphonophore) makes it possible to specify it. Figure 7 represents the evolution of the distance between the base of the tube and the second bulge. The length of this segment does not vary between the time of its secretion and that of its invagination (26 μm). On the other hand, inside the capsule, it measures 48 μm . The tube being spiralled at this stage (cf. § 3), the segment considered is, in fact, longer, and equal to its length after evagination, i.e. 65 μm . These measurements allow us to suppose that the length of the cnidocyst filament almost doubles during its invagination.

2. Folding of the tube.

In their study on the geometry of the stinging filament, Skaer and Picken [I7] and many authors after them, showed that inside the capsule the tube did not have a circular section but was folded along three planes (Fig. 3). The study of cnidogenesis allows us to specify that this wrinkling occurs at the time of invagination (Fig. 5). It can, in fact, be carried out in several ways. In all cases where the tube is very long and very thin, the folds are regular, most often three in number, sometimes five (example of exogenous isorhizas of the ctenophore *Euchlora rubra*, Fig. 4b). In the case of shorter cnidocyst filaments with large diameters, such as those of rhopalonemes and desmonemes (Fig. 4a), the folds are less regular, the extreme case being that of ptychocysts [II], whose number of folds decreases from the base towards the end of the tube (from 6 to IO).

3. Spiralling of the cnidocyst tube

We distinguish two types of spiralling. The first, easily observable by light microscopy, corresponds to the large turns along which the filament is arranged in the capsule (Figs. 1, 2a, b). The second, around the filament, with a much smaller pitch, has been described by Bretschneider [2] then Skaer and Picken [I7] in electron microscopy. By studying cnidogenesis, we observed that this secondary spiralling occurs during the invagination of the filament which progresses towards

the capsule with a twisting motion (Figs. 2a, 6). It is the rule in all cnidocysts with long and thin tubes. In the case of cnidocysts with a wide and relatively short tube, it may be lacking (cases of ptychocysts and rhopalonemes).

4. Comparative study of the geometry of the nematocyst during the life of the cnidocyst

At the extracapsular stage the filament, if we disregard the basal differentiations typical of each category of cnidocyst, is cylindrical. Inside the capsule, it always presents longitudinal folds and, most often, double spiralling. After evagination it again has a cylindrical structure.

The experiments that we are going to describe are based on a working hypothesis: invagination of the filament is not only the establishment of an intracapsular structure; it is above all the means of storing, in the form of mechanical constraints, the energy necessary for brutal evagination. During the two to three hours of invagination, the spatial organization of the tube undergoes a profound change, the most frequent transformation resulting in the structure described by Skaer and Picken [17] the most exceptional case being that of ptychocysts with a variable number folds and no secondary spiralling.

We propose to consider the evagination as a simple suppression of the constraining forces allowing the return of the tube to its initial cylindrical shape, the simultaneous reversion into a thimble being only the result of the physical continuity existing between the tube and the capsule.

Experimentation

All the experiments were carried out on microbasic euryteles of *Agalma elegans* (physonect siphonophore) (Fig. 8), mechanically isolated and left for thirty minutes in a desiccator in order to destroy the cnidocyte normally enveloping the capsule and to remove all traces of moisture.

1st experiment (Figs. 9, 14)

Euryteles are sectioned transversely and then rehydrated by the addition of distilled water. There is a sudden extrusion, without eversion, of the tube fragments contained in each half-capsule, which unfold and straighten. Their diameter is equal to that of a normally evaginated tube. Finally, the operculum which closes the insertion zone of the tube on the capsule remains in place.

2nd experiment (Figs. 10, 15)

Using a glass needle, a breach is made in the capsule, near the operculum, and then the preparation is rehydrated. We observe a rapid extrusion of the filament without eversion, by the subopercular breach. It is noted that the diameter of the filament is equal to that of a normally evaginated filament. It is the same for the diameter and the length of the hampe [shaft].

3rd experiment (Figs. 11, 16)

The two following experiments relate to partially evaginated euryteles. For this, capsules are placed in microdrops of distilled water and evagination by pressure. The extrusion of the filament stops by itself as soon as it emerges from the drop of water. The preparation is then dried and a subopercular breach is made as in the previous experiment. Rehydration does not cause the resumption of evagination, but the sudden exit, through the subopercular breach, of the part of the tube which was still in the capsule. The tube unfolds, straightens, but there is no eversion.

4th experiment (Figs. 12, 13, 17)

A very small breach is made in the capsule of a partially evaginated and dehydrated eurytele, and then a drop of distilled water is added near the preparation. This humid atmosphere causes hydration of the non-evaginated part of the filament which unfolds and straightens, but too gradually to cause its extrusion. One observes only intracapsular movements, which correspond to the straightening, and the re-invagination, in the capsule, of a part of the filament contained in the evaginated tube (phenomenon of "back fire" of Picken and Skaer [II]). This apparent re-invagination must be clarified. In fact, there were, at the start of the experiment, two nested tubes: an outer tube, unfolded and straightened, containing a tube in the process of evagination, bent and coiled. The hydration of the preparation at the level of the breach of the capsule causes the dilation, step by step, of the internal tube. As a result, it gradually exceeds the tube which enveloped it and re-enters the capsule. It is therefore not a real re-invagination, comparable to that observed during cnidogenesis, with formation of folds, but of an extension of a part of the tube which unfolds and straightens towards the capsule. We can check the effective expansion of the entire internal part of the filament by performing on this preparation experiment 1. After sectioning and rehydration, there is sudden emergence of the pieces of filaments contained in capsule 2 serving as a control, while no modification is induced in capsule 1 which previously presented the phenomenon of "back fire" (Fig. 13, 17).

5th experiment

Weill [19] had shown that cnidocysts retained the capacity to evaginate after the action of certain physicochemical agents. Its results, often forgotten by recent authors, prompted us to test, on the euryteles of *Agalma elegans*, the action of desiccation, temperature and fixatives aqueous and non-aqueous.

- Action of desiccation: we kept smears of euryteles for more than a year in a desiccator, without observing any drop in their evagination power, which agrees with Weill's results.
- Action of temperature: smears were placed for several weeks in ovens at 80, 100 and 140°. In all cases, it was possible to obtain evagination of the filaments after rehydration. On the other hand, for temperatures above 140°, a deformation of the capsules and the loss of the evagination power is noted.
- Action of fixatives: we obtained the evagination of cnidocysts stored for several days in absolute alcohol or acetone. On the other hand, each time the fixative contains water (70° alcohol, or formalin for example) the evagination power decreases rapidly and disappears after a few days.

Special case of *Euchlora rubra* cnidocysts

We studied for another work in preparation, the exogenous cnidocysts of the ctenophore *Euchlora rubra*. They appear to be an interesting case to point out before entering into the discussion.

In *Euchlora rubra* the capsules are regularly distributed along the fishing filaments in place of the colloblasts. They normally evaginate in response to appropriate stimuli. However, electron microscopy shows that there is no formation comparable to a perinematocystic apparatus around these capsules.

Discussion and conclusions

The first conclusion is that the cnidocyte is not essential for the evagination of the nematocyst. All of our experiments focused on capsules whose cell had been destroyed by desiccation or by the action of heat or a chemical fixative. The particular case of *Euchlora isorhizas*, which can be assimilated to naked capsules, shows that the conditions created experimentally can be found, in

certain cases, "in vivo)). We therefore refute the hypothesis of Lentz [10] and Yanagita [21] assuming that the cnidocyte provides the energy necessary for evagination, as well as that of Russell [16], Chapman and Tilney [SI and Westfall [20] which associates evagination with contractions of the perinematocystic apparatus. The third hypothesis of Glaser and Sparrow [8], followed by Robson [14], Slautterback [18] and Skaer and Picken [17], assimilates the capsule and its tube to an osmometer. Evagination would result from a sudden change in membrane permeability causing water to move towards the capsule. The observations of Robson [15] confirm variations in the volume of the cnidocyst preceding and accompanying the discharge. But we observed that the brutal extrusion of the filament remains possible when the capsule has been perforated and even cut into two parts (experiments 1 and 2). In these cases, the assimilation of the capsule and its tube to an osmometer cannot be accepted. The last hypothesis is that advanced then rejected by Picken [12, 17]. This author had supposed that the apparent expansion in length and in diameter of the tube during evagination passively entailed its extrusion. But, having observed later in electron microscopy, that the surface of the tube does not vary between the intracapsular stage and the external stage, he denounces his initial proposal. Our experiments lead us to agree, for the most part, to Picken's first hypothesis, that is to say, that a sudden change in the dimensions of the tube is the motor of its extrusion. But, unlike this author, and in agreement with ultrastructural observations, we consider that this is a change in the volume occupied by the tube and not a modification of its surface [12].

We retain three stages in the life of the cnidocyst:

1. Secretion of the capsule and the extracapsular filament.
2. Slow invagination of the filament in the capsule (two to three hours), accompanied by progressive storage of mechanical energy in the form of spiralling and longitudinal folds of the tube.
3. Failure of the stress forces deforming the tube which returns to its initial cylindrical shape. The reverse turning is a secondary phenomenon resulting solely from the continuity which exists between the tube and the capsule. If this continuity is broken, or if another way is opened, the tube relaxes without eversion (experiments 1, 2, 3).

We cannot conclude on the nature of the forces which keep the tube folded in the capsule. They may be connections connecting the adjoining membranes. We can specify that the removal of these forces requires the presence of water, that it is still possible after the action of heat (up to 140°), desiccation, and absolute alcohol. On the other hand, we never obtained the evagination of capsules after prolonged fixation in formalin or in diluted alcohol.

In this work, we looked for where and when was produced and possibly stored, the energy necessary for evagination. We have intentionally ignored the functions of the cnidocyte in the control and determinism of this process.