

FORMATION, MIGRATION ET MATURATION DES NÉMATOBLASTES ET DES NÉMATOCYSTES CHEZ LES SIPHONOPHORES

I - Mise en évidence et formation des clones de nématocystes.

par Danièle CARRÉ

Station zoologique, C.N.R.S., Université de Paris-VI, 06230 Villefranche-sur-Mer, France.

RÉSUMÉ - Les nématocystes, lorsqu'ils se forment dans le bourrelet urticant des gastrozoïdes de Siphonophores, sont associés en clones. Un clone est constitué par des cellules urticantes d'une même catégorie, à un même stade de développement et provenant de la division d'une même cellule primordiale.

La composition numérique des clones, pour une catégorie de nématocyste donnée, est définie chez chaque espèce de Siphonophore.

Chez une même espèce, les nématocystes de taille différente mais appartenant à une même catégorie morphologique ont, entre autres caractères communs, celui de former des clones de même composition numérique. Toutefois l'auteur montre que le nombre de divisions de la cellule primordiale n'est pas le seul facteur déterminant la différenciation d'une catégorie de nématocyste.

La régulation de la production des nématocystes ne semble pas s'effectuer par une variation du nombre des mitoses au moment de la formation des clones, mais doit résulter de l'activation d'un nombre plus ou moins grand de cellules interstitielles.

Quelques observations et expériences simples montrent qu'il existe une relation entre la formation des nématocystes dans les massifs cnidogènes et les besoins spécifiques en cellules urticantes des organes récepteurs voisins.

SUMMARY - When forming in the gastrozoïd cnidogenous clump of Siphonophores, the nematoblasts are associated in clones. A clone is constituted of stinging cells of the same category, at the same stage of development and coming from the same primordial cell.

The numerical composition of the clones, for a given category of nematocyst, is determined in every species of Siphonophores.

In the same species, nematocysts of different sizes, but belonging to the same morphological category have, among other common characteristics, the characteristic of forming clones of the same numerical composition. However, the author shows that the number of divisions of the primordial cell is not the only factor determining the differentiation of a nematocyst category.

The regulation of the production of nematocysts does not appear to be accomplished by a variation of the number of mitosis at the moment of the formation of the clones. But it must result from activation of a number more or less large of interstitial cells.

A few observations and simple experiments show that there exists a relation between the formation of nematocysts in the cnidogenous clumps and the specific needs of the neighbouring receptor organs in stinging cells.

INTRODUCTION

Les nématocystes (ou cnidocystes) des *Cnidaires* sont parmi les organites cellulaires les plus complexes et les plus énigmatiques du règne animal. Ils sont contenus dans une cellule appelée nématoblaste (ou cnidoblaste) et sont constitués par une capsule renfermant un long filament capable de se dévaginer sous certaines influences. Après avoir fonctionné, pour la capture d'une proie, par

exemple, les nématocystes et leurs nématoblastes disparaissent et sont remplacés par de nouvelles cellules urticantes. La cnidogenèse est, de ce fait, un processus ininterrompu pendant toute la vie d'un Cnidaire.

Très tôt, les zoologistes ont cherché à comprendre le processus de la différenciation des nématocystes. Dans deux publications précédentes (Carré, D. 1972; Carré, C et Carré, D. 1973) nous avons rappelé les différentes théories avancées par les auteurs

et montré, après une étude ultrastructurale et une étude *in vivo* chez *Muggiaeae kochi* (Siphonophore calycophore) et chez *Apolemia uvaria* (Siphonophore physonecte), que la différenciation du nématocyste à l'intérieur du nématoblaste présente trois phases successives : formation de la capsule par fusion de vésicules golgiennes, sécrétion d'un tube externe par l'appareil de Golgi, invagination de ce tube dans la capsule. La planche I illustre ces conclusions à partir d'observations faites chez une autre espèce, *Hippopodius hippocampus* (Siphonophore calycophore). Les figures 1 et 2 représentent des mastigophores différents. Par contre, les différentes étapes de l'invagination du filament dans la capsule ont été photographiées sur un même mastigophore.

Les principaux aspects morphologiques de la différenciation d'un nématocyste à l'intérieur d'un nématoblaste pouvant être considérés comme connus, nous nous sommes intéressés à la répartition des nématocystes dans les foyers cnidogènes. Des observations *in vivo* permettent de constater que chaque nématocyste, lorsqu'il se développe, fait partie d'un ensemble de cellules urticantes de même type, et au même stade de développement formant un clone (Planche III, fig. 1). Nous avons étudié chez diverses espèces de Siphonophores, la composition numérique des clones de chacune des catégories de nématocystes présentes. Dans un second temps, nous avons recherché si la distribution des différents clones dans les foyers cnidogènes était fortuite ou déterminée. Enfin, nous nous sommes intéressée aux clones issus de la division des cellules interstitielles et nous les avons comparés aux clones de nématocystes pour savoir si on pouvait considérer les seconds comme résultant directement de la différenciation des premiers.

En préalable à ce travail, l'ultrastructure des cellules primordiales des nématoblastes a été étudiée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les Siphonophores ont été récoltés dans la rade de Villefranche-sur-Mer soit par des pêches au filet, soit, pour les grandes formes, en surface à l'aide de sacs en plastique. Nous avons souvent travaillé sur des larves calyconula et siphonula obtenues par élevage à partir de fécondations artificielles.

Pour les observations sur le vivant, des larves ou des fragments de colonies ont été placés dans de petites chambres de culture à circulation d'eau. Ces montages, observés au microscope à contraste de phase interférentiel, ont permis de suivre un même phénomène de façon prolongée (3 à 4 heures), *de visu* et par des photos.

L'étude en microscopie électronique a été faite sur des spécimens fixés à la glutaraldéhyde et au tétr oxyde d'osmium tamponnés, et inclus suivant la méthode de Spurr. Les sections ultrafines, contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb suivant Reynolds, ont été observées sur un microscope électronique Hitachi HU IIC.

RÉSULTATS

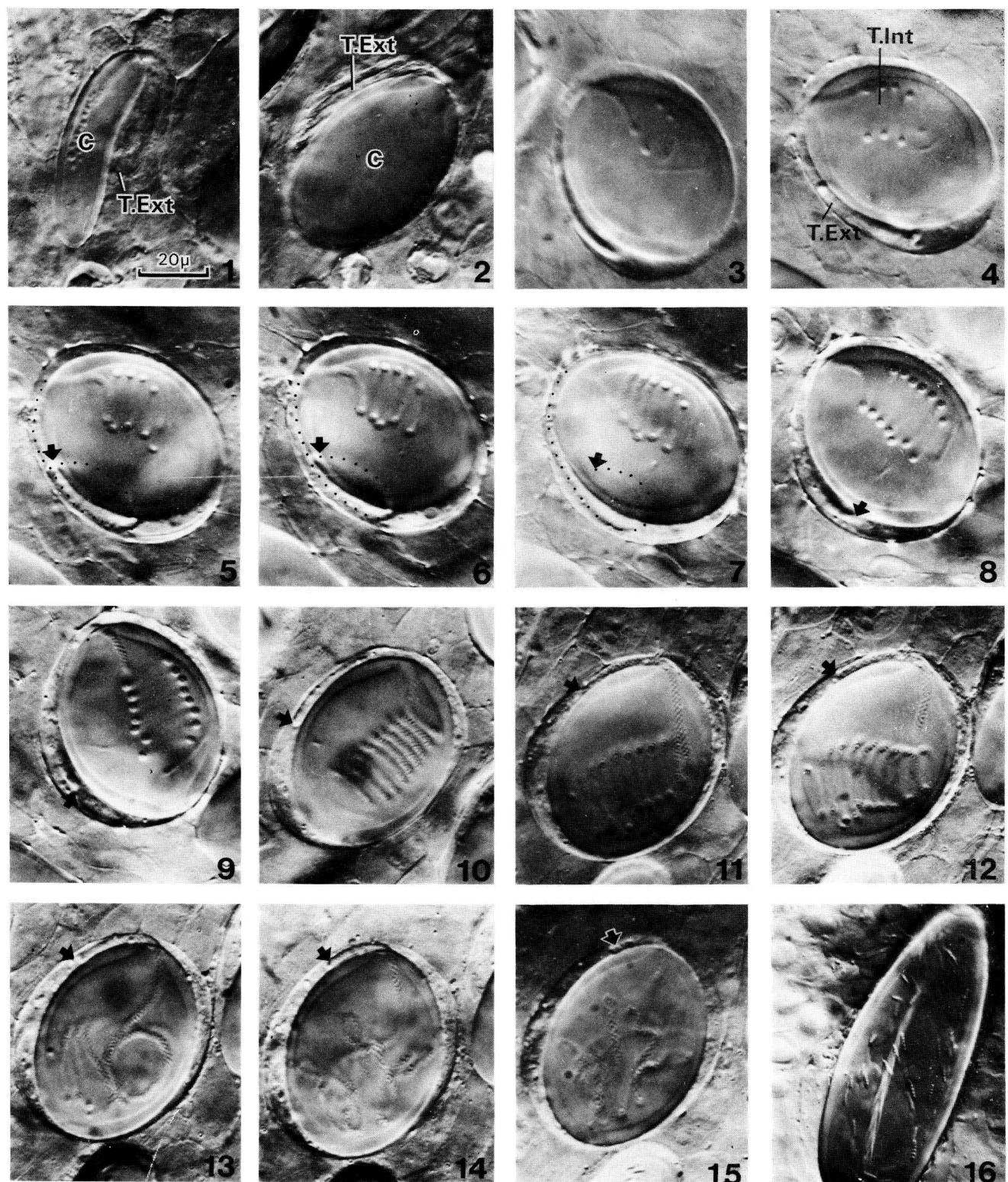
I - Ultrastructure des cellules interstitielles du bourrelet urticant.

Les Siphonophores possèdent des polypes nourriciers, ou gastrozoïdes, pourvus d'un long filament pêcheur portant des ramifications ou tentilles. La quasi-totalité des nématocystes matures de la colonie est localisée dans le bouton urticant et le filament terminal de ces tentilles. Par contre, tous les némato-

PLANCHE I

Mastigophores d'*Hippopodius hippocampus*.

- Formation du tube externe ; microscope à contraste de phase, *in vivo*. $\times 750$.
- Fin de la différenciation du tube externe. $\times 750$; fig. 3-14, diverses étapes de l'invagination du tube nématocystique dans la capsule photographiées sur un même mastigophore aux temps suivants : 2, t = 0 ; 3, t = 5 mn ; 4, t = 24 mn ; 5, t = 27 mn ; 6, t = 29 mn ; 7, t = 41 mn ; 8, t = 59 mn ; 9, t = 1 h 16 mn ; 10, t = 1 h 30 mn ; 11, t = 1 h 35 mn ; 12, t = 1 h 44 mn ; 13, t = 1 h 52 mn ; 14, t = 1 h 57 mn. $\times 750$; 15, stade migrant. $\times 750$.



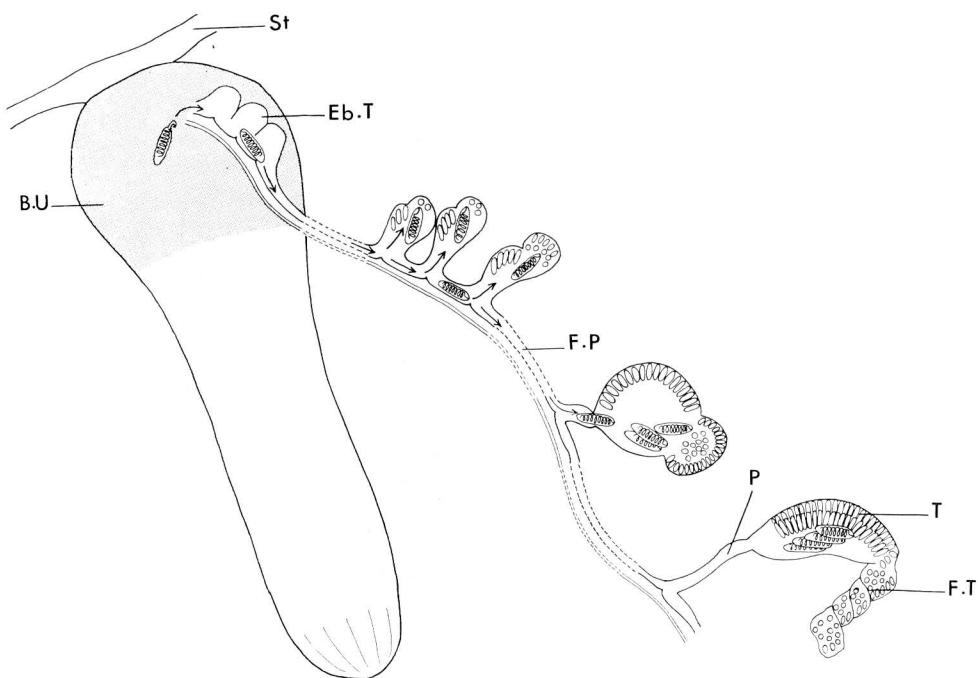


Fig. 1. — Schéma d'un gastrozoïde de Siphonophore et de son filament pêcheur.

cystes en cours de différenciation sont situés à la base des gastrozoïdes dans des foyers enidogènes ectodermiques appelés bourrelets urticants (Fig. 1).

Le bourrelet urticant est un massif non stratifié formé par des cellules interstitielles et par des nématoblastes contenant des nématocystes à divers stades de développement (Planche II, fig. 1). Les cellules interstitielles sont toutes identiques et présentent les caractères des cellules embryonnaires : le noyau est volumineux, le cytoplasme contient peu d'éléments figurés à l'exception de quelques mitochondries et de nombreux granules nucléoprotéiques (Planche II, fig. 2). Il est fréquent d'observer des stades de mitose de ces cellules.

Fawcett et Slauterback (1959) ont signalé la présence de ponts intercellulaires entre les nématoblastes de l'*Hydre*. Cette continuité protoplasmique les conduit à assimiler les nématoblastes jointifs et communicants à un syncytium. Chez les Siphonophores nous n'avons jamais observé d'interruption de la

membrane ni entre les cellules interstitielles du bourrelet urticant, ni entre les nématoblastes en cours de différenciation.

II - Les clones de nématoblastes et de nématocystes.

La mise en évidence et l'étude des clones de nématoblastes et de nématocystes chez les Siphonophores a été basée essentiellement sur des observations *in vivo*.

A - APOLEMIA UVARIA.

1 - Clones de nématocystes (Planche III et Planche IV, fig. 1 à 4).

Apolemia uvaria possède quatre catégories de nématocystes, trois de ces catégories étant de deux tailles : microbirhopaloïdes et macrobirhopaloïdes, microsténotèles et macrosténotèles, microïsorhizes et macroïsorhizes, mastigophores. Toutes les étapes du développement de ces nématocystes ont été décrites (Carré, C et Carré, D. (1973) ce qui nous a permis

TABLEAU I.

Catégories de nématocystes	Nombre de clones comptés	Clones de 4 nématocystes	Clones de 8 nématocystes	Clones de 16 nématocystes	Clones particuliers
Microbirhopaloïdes	26			26	
Macrobirhopaloïdes	30	1		29	
Microsténotèles	14		14		
Macrosténotèles	19	1	16	1	1 clone de 24
Microïsorhizes	23			21	2 clones de 15
Macroïsorhizes	21	1	1	19	
Mastigophores	18	3	15		

d'identifier et de compter les cellules de clones très jeunes, ayant peu de chances d'avoir été dissociés par des interactions cellulaires. Nous avons étudié la composition de 151 clones.

Le tableau I montre que chez *Apolemia uvaria* les microbirhopaloïdes ainsi que les macrobirhopaloïdes forment, lorsqu'ils se différencient, des clones de 16 nématocystes (Planche III, fig. 2 et 3). Il en est de même pour les microïsorhizes et les macroïsorhizes (Planche IV, fig. 3 et 4). Par contre les microsténotèles, les macrosténotèles et les mastigophores sont associés par groupes de huit (Planche III, fig. 1 ; Planche IV, fig. 1 et 2).

Sur les 151 clones étudiés seulement 11 présentent une composition autre que de 8 ou 16 cellules. L'homogénéité de ces résultats s'explique, en partie, par le fait que chez *Apolemia uvaria* nous avons travaillé non pas sur les bourrelets urticants des gastrozoïdes mais sur des foyers cnidogènes particuliers, spécifiques à cette espèce, situés à la base des dactylozoïdes, ou palpons, et formés par une seule assise de cellules ectodermiques.

Ceci facilite les observations et, surtout, limite dans un plan les interactions cellulaires tendant à disjoindre les cellules d'un clone. Par ailleurs, il existe entre les nématoblastes d'*Apolemia*, des cellules glandulaires (caractère original retrouvé seulement chez une autre espèce) qui contribuent aussi à l'isolement et au maintien des clones de nématocystes.

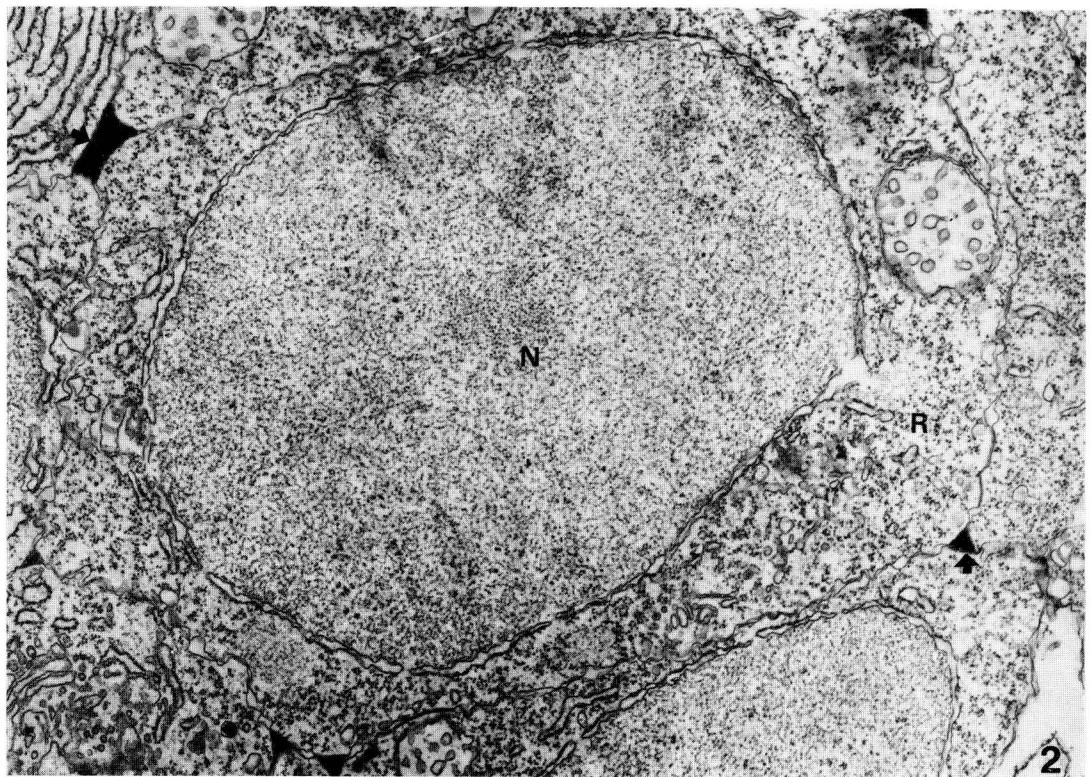
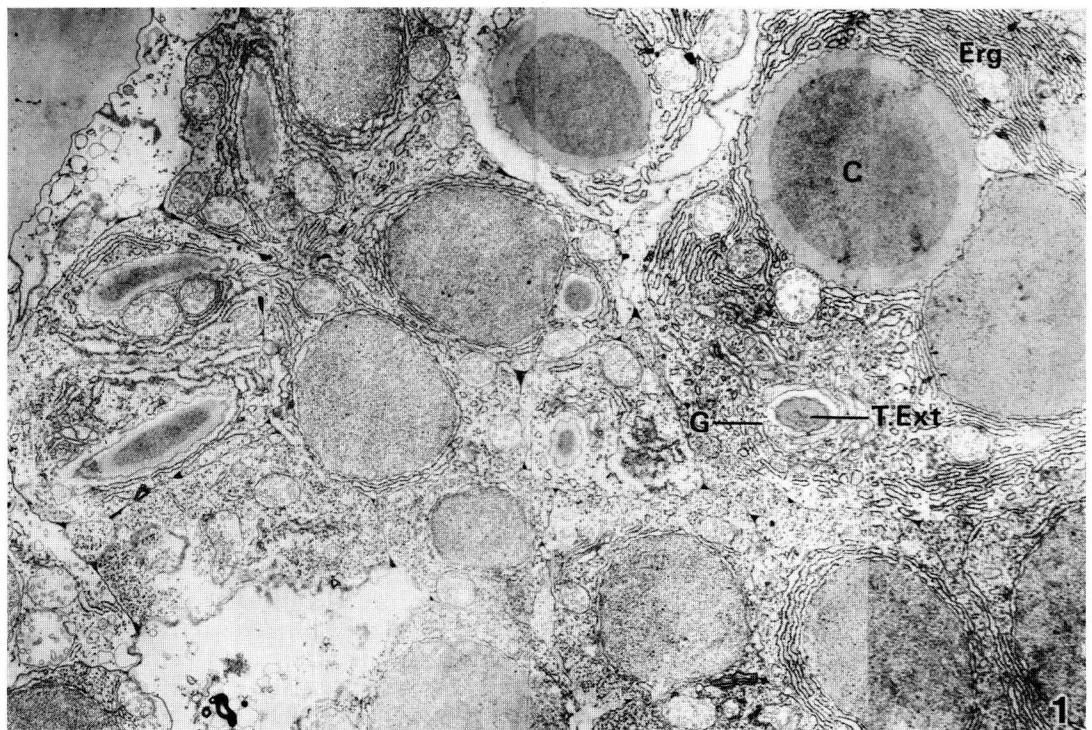
La répartition des différents clones dans le massif cnidogène semble anarchique. Cependant, il est fréquent, mais non obligatoire, d'observer des ensembles de clones d'une même catégorie de nématocystes mais à des stades de développement différents.

2 - Clones issus de la division des cellules interstitielles (Planche V, fig. 2 à 7).

La première manifestation visible de la cnidogenèse est la multiplication de certaines cellules interstitielles. Les chomosomes d'*Apolemia* étant trapus et peu nombreux, nous avons pu suivre ce processus. Les cellules en mitose du bourrelet urticant sont groupées en îlots de une, deux, quatre ou huit cellules

PLANCHE II

1. Ultrastructure du bourrelet urticant de *Muggiae kochi*. $\times 7\,000$.
2. Détail d'une cellule interstitielle du bourrelet urticant de *Muggiae kochi*. $\times 17\,000$.



qui forment, une fois la division achevée, des groupes de deux, quatre, huit et seize cellules (Planche V, fig. 2 à 7). L'observation prolongée de ces cellules montre qu'après une phase de repos, les groupes de quatre cellules amorcent toujours une nouvelle division ; ceci n'est pas obligatoire pour les groupes de deux et de huit cellules et ne se produit jamais pour les groupes de seize cellules. Il semble donc que, chez cette espèce, la division d'une cellule primordiale aboutisse à la formation de groupes de deux cellules filles, ou bien à celle de clones de huit ou de seize cellules. Les mitoses isolées, donnant des groupes de deux cellules, peuvent être considérées comme des divisions assurant la maintenance du stock de cellules interstitielles. Pour les autres mitoses, il y a concordance parfaite, au point de vue numérique, entre les clones de cellules interstitielles et les clones de nématocystes. On peut donc considérer les seconds comme résultant directement de la différenciation des premiers.

B - RHIZOPHYSA FILIFORMIS (SIPHONOPHORE CYSTONECTE).

1 - Clones de nématocystes (Planche IV, fig. 5 et 6).

Le cnidome de *Rhizophysa filiformis* est composé par des sténotèles (capsule de 24 μ de diamètre) et des isorhizes de deux tailles : microisorhizes (10 μ de diamètre), et macroisorhizes (25 μ de diamètre). Nous avons pu identifier ces trois catégories dès les premiers stades de leur formation : leur petite taille différencie nettement les microisorhizes des autres nématocystes tandis que la forme du tube nématocystique, dès le début de sa sécrétion, distingue les sténotèles (tube dilaté dans sa région basale) des macroisorhizes (tube isodiamétrique sur toute sa longueur).

Cette diagnose précoce a permis des comptages sur des clones très jeunes : les sténotèles, les microisorhizes et les macroisorhizes forment toujours des groupes de quatre nématocystes dans les premiers stades de leur développement (Planche IV, fig. 5 et 6). Ensuite ces clones sont le plus souvent dissociés, avant même la fin de l'invagination du tube nématocystique. Comme chez *Apolemia uvaria*, il existe des cellules glandulaires parmi les nématoblastes, qui contribuent à l'isolement des clones.

2 - Clones issus de la division des cellules interstitielles.

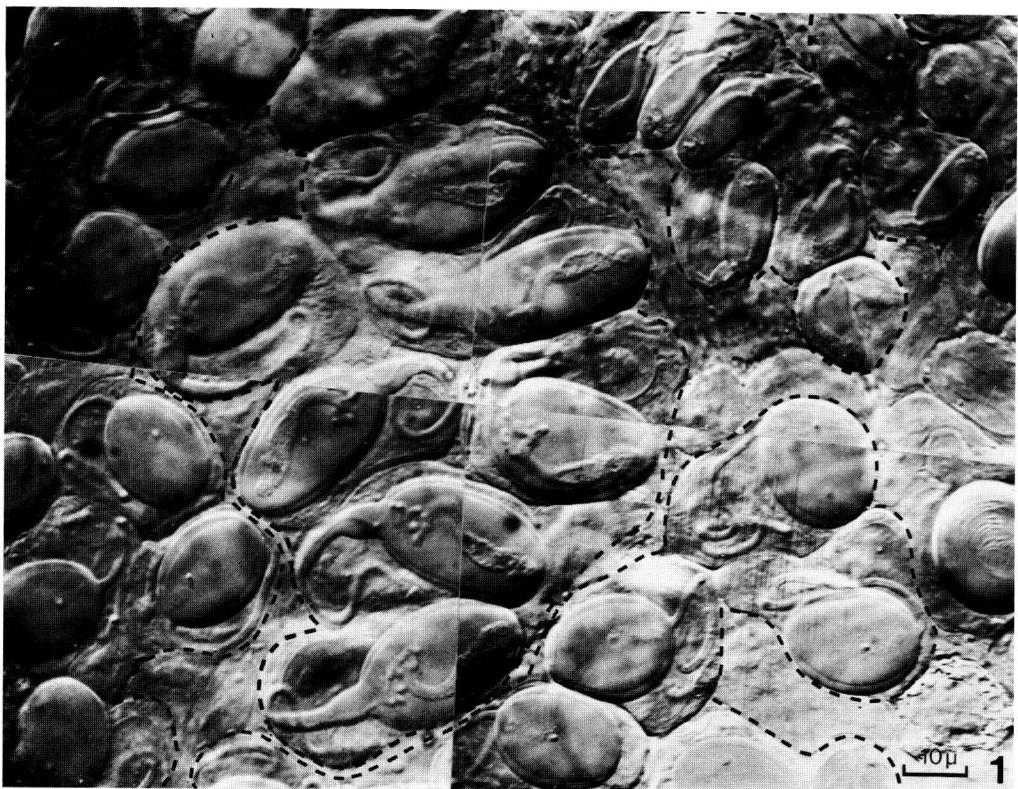
Les cellules interstitielles en mitose, dans le bourrelet urticant de *Rhizophysa* sont isolées ou groupées par deux et donnent, une fois la division achevée, des groupes de deux et quatre cellules. Après une phase de repos, certains des groupes de deux cellules amorcent une seconde division, tandis que ceux formés par quatre cellules ne se divisent plus. Nous pouvons donc conclure, comme chez *Apolemia* que chaque clone de nématocyste provient de la multiplication et de la différenciation d'une cellule interstitielle particulière.

C - AUTRES ESPÈCES DE SIPHONOPHORES (Planche V, fig. 1).

Nous avons entrepris l'étude numérique des groupes de nématocystes chez la plupart des autres Siphonophores présents à Villefranche-sur-Mer : *Sphaeronectes gracilis*, *Abylopsis tetragona*, *Hippopodius hippopus*, *Lensis subtilis*, *Muggiae kochi*, *Rosacea cymbiformis*, *Vogtia pentacantha*, *Eudoxioïdes spiralis*, *Lilyopsis rosea*, *Halistemma rubra*, *Nanomia bijuga*, *Physophora hydrostatica*, *Forskalia edwardsi*. Dans le bourrelet urticant de toutes ces espèces il existe des plages formées par des clones de nématocystes de même catégorie mais à divers stades de développe-

PLANCHE III

1. Bourrelet urticant d'un dactylozoïde du siphosome d'*Apolemia uvaria*; microscope à contraste de phase, *in vivo*. $\times 1000$.
2. Clone de macrobirhopaloïdes chez *Apolemia uvaria*. $\times 1\,000$.
3. Clone de microbirhopaloïdes chez *Apolemia uvaria*. $\times 800$.



ment (Planche V, fig. 1). Il est possible de reconnaître et de séparer les différents stades du développement des mastigophores (chez les Siphonophores calycophores) et des sténotèles (chez les Siphonophores physonectes), qui sont de grandes cellules urticantes. Par contre, pour chacune des autres catégories de nématocystes, il est presque impossible, chez les espèces examinées de distinguer les uns des autres, sur le vivant, les stades de développement proches et, de ce fait, de limiter et de dénombrer les clones de façon sûre.

Toutefois, l'existence des clones a pu être confirmée en suivant les divisions des cellules interstitielles. Chez certaines espèces, les cellules interstitielles en mitose ne forment que des groupes de deux ou quatre cellules, chez d'autres, elles forment des groupes de deux, quatre ou huit cellules. Dans tous les cas, ces groupes sont séparés les uns des autres.

III - Déterminisme de la formation des nématocystes.

En microscopie électronique nous n'avons relevé aucun détail ultrastructural permettant de différencier, par exemple, la cellule primordiale d'un clone de mastigophores de celle d'un clone d'isorhizes. Tous les éléments interstitiels nous sont apparus morphologiquement identiques. Nous pensons que cette identité doit également exister au point de vue biochimique et cela jusqu'au moment où un facteur inducteur d'origine exogène détermine le devenir de ces cellules vers la production de telle ou telle catégorie de nématocystes.

Quelques observations et expériences simples permettent d'illustrer et de justifier cette opinion.

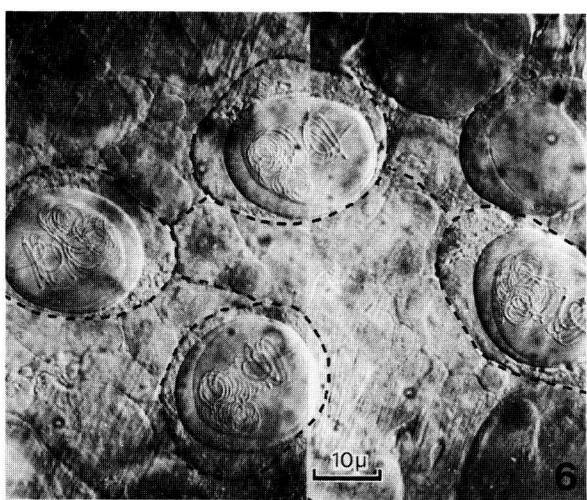
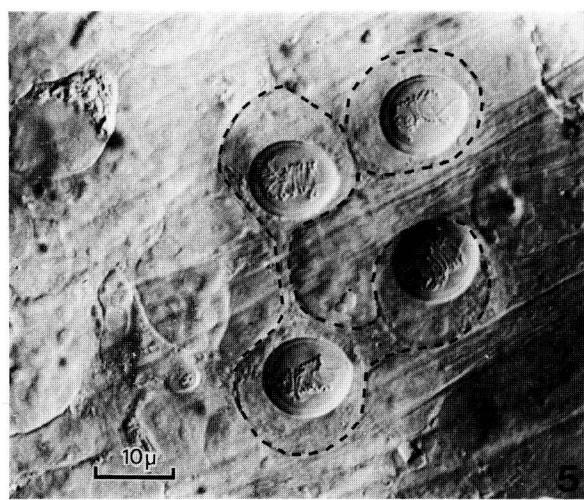
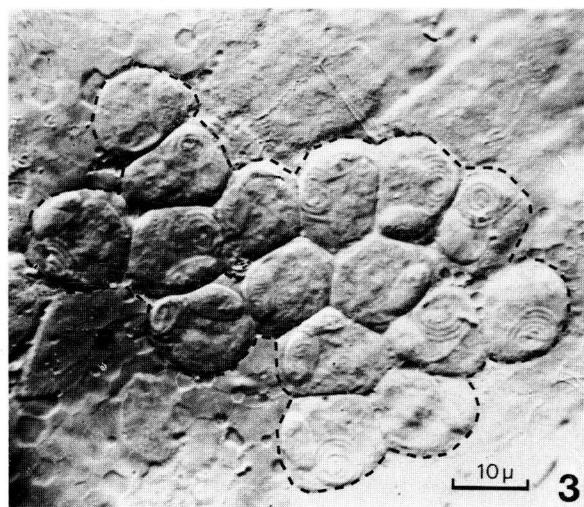
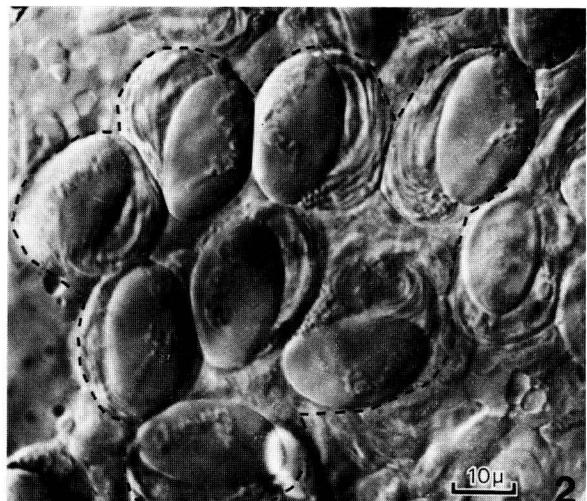
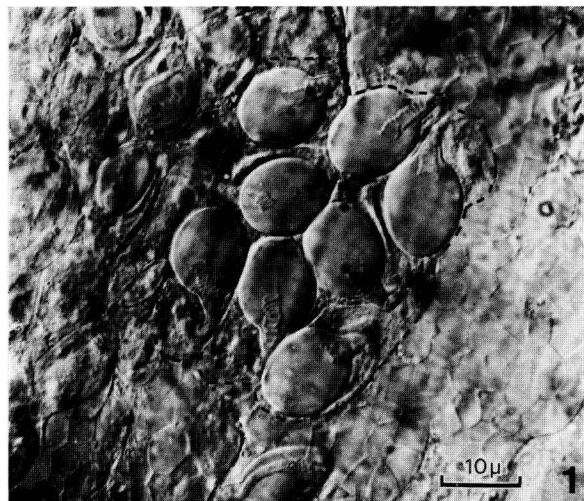
Dans le bourrelet urticant de *Rhizophysa filiformis* se différencient des sténotèles, des microïsorhizes et des macroïsorhizes. A matur-

rité les sténotèles et une partie des microïsorhizes émigrent dans la région buccale du gastrozoïde, tandis que les autres microïsorhizes et tous les macroïsorhizes émigrent dans le filament pêcheur. Nous avons isolé des gastrozoïdes de *Rhizophysa* et nous les avons placés dans un milieu de culture. Au bout de cinq jours, aucune modification qualitative n'a été notée dans le bourrelet urticant des gastrozoïdes pourvus de leur filament pêcheur. Par contre, après la même période, l'observation des bourrelets urticants de gastrozoïdes mis en culture après l'ablation du filament pêcheur, montre qu'ils sont formés, outre les cellules interstitielles, par des sténotèles et des microïsorhizes à divers stades de développement, mais qu'ils sont dépourvus de macroïsorhizes en cours de différenciation. La formation de cette dernière catégorie semble donc liée à la présence du filament pêcheur, ce qui laisse pressentir une relation étroite entre la production de la cellule urticante et la présence effective, et à proximité, de son site d'utilisation. Toujours chez *Rhizophysa*, cette relation est illustrée par l'étude du pneumatophore dont la région apicale possède des sténotèles et des microïsorhizes fonctionnels. Ce bincnidome se forme dans un massif cnidogène particulier à cette espèce, situé dans l'ectoderme du pneumatophore, et différent de tous les autres bourrelets urticants de la colonie par l'absence de macroïsorhizes.

Des observations similaires ont pu être faites chez *Apolemia uvaria*. Ce Siphonophore physonecte présente la particularité de posséder des dactylozoïdes insérés le long du nectosome, parmi les cloches natatoires. Ces dactylozoïdes sont dépourvus de tentacules, contrairement à ceux du siphosome décrits précédemment. Leur bourrelet urticant est totalement dépourvu de birhopaloïdes (nématocystes qui, à maturité, sont localisés dans les tentacules et qui forment la plus grande partie du bourrelet urticant des dactylo-

PLANCHE IV

1. Clone de microsténotèles chez *Apolemia uvaria*. $\times 1\,200$.
2. Clone de mastigophores chez *Apolemia uvaria*. $\times 900$.
3. Clone de microïsorhizes chez *Apolemia uvaria*. $\times 1\,200$.
4. Clone de macroïsorhizes chez *Apolemia uvaria*. $\times 700$.
5. Clone de microïsorhizes chez *Rhizophysa filiformis*. $\times 1\,400$.
6. Clone de macroïsorhizes chez *Rhizophysa filiformis*. $\times 1\,000$.



zoïdes du siphosome) et de mastigophores (également présents dans les dactylozoïdes du siphosome); il présente des clones de microïsorhizes, macroïsorhizes, microsténotèles et macrosténotèles (Planche III, fig. 1). A maturité, les microsténotèles, les macrosténotèles et les microïsorhizes émigrent à l'apex des dactylozoïdes tandis que les macroïsorhizes émigrent dans les ébauches des cloches natatoires. Si on isole ces dactylozoïdes dans un milieu de culture, on constate qu'au bout de cinq jours leurs bourrelets ne possèdent plus de macroïsorhizes en cours de différenciation. On peut donc concevoir que la formation des macroïsorhizes, dans les dactylozoïdes du nectosome, est induite ou dépendante d'un facteur provenant des cloches natatoires auxquelles ils sont destinés. Il aurait été intéressant de greffer un filament pêcheur à ces dactylozoïdes qui en sont normalement dépourvus, afin d'observer si cette greffe induisait la formation de birhopaloïdes (nématocystes typiques des filaments pêcheurs de cette espèce). Nous avons fait plusieurs tentatives mais, à chaque fois, le greffon s'est rapidement détaché. Cette expérience aurait été un moyen de vérifier l'influence de l'organe récepteur des nématocystes sur leur zone de différenciation et, surtout, de montrer si les cellules interstitielles du bourrelet urticant étaient aptes à sécréter n'importe quel type de nématocystes présent chez l'espèce étudiée. Nous reprendrons cette expérience dès la prochaine capture d'*Apolemia*.

DISCUSSION

L'existence de clones de nématocystes avait déjà été établie par plusieurs auteurs à partir d'études histologiques chez l'*Hydre*.

Lehn (1951) indique que les clones de quatre à huit nématoblastes diffèrent des grands sténotèles; les clones de huit à seize cellules donnent des petits sténotèles; ceux de seize à trente-deux, des desmonèmes; enfin les clones de seize cellules donnent des isorhizes. Pour cet auteur le nombre de divisions de la cellule primordiale est le facteur déterminant la formation de telle ou telle catégorie de nématocystes.

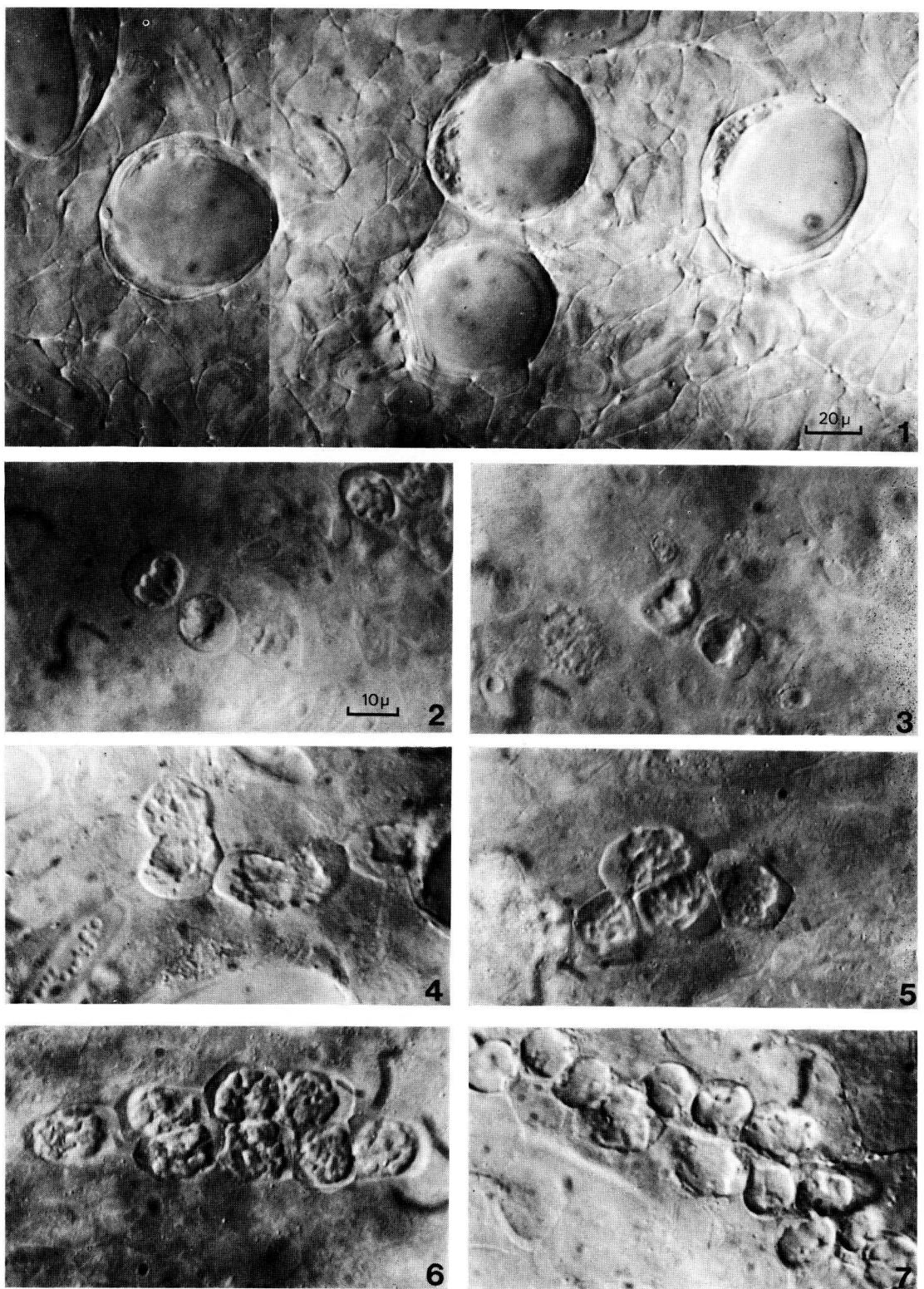
A l'encontre de ces observations, Rich et Tardent (1969), toujours chez l'*Hydre*, ont trouvé que les groupes de nématoblastes sont formés de quatre, huit ou seize cellules, mais « qu'il n'y a pas de corrélation entre le nombre de cellules d'un groupe et le type de nématocystes représenté dans celui-ci ». Ils en déduisent que le nombre de divisions de la cellule primordiale n'est pas un facteur déterminant.

Les divergences et les contradictions entre ces auteurs s'expliquent, peut-être, par le fait qu'ils ont travaillé sur des nématocystes déjà bien différenciés (probablement sur des stades à tube externe en cours d'invagination ou à tube invaginé) et nos observations chez les Siphonophores, nous ont montré que, très souvent, les nématocystes commençaient à émigrer avant la fin de l'invagination du tube nématocystique ce qui entraîne une dissociation très précoce des clones (Carré, D. 1974).

Chez *Apolemia* et chez *Rhizophysa* nous avons constaté que la composition numérique des clones est rigoureusement définie pour chaque catégorie de nématocyste. Toutefois, contrairement à l'opinion de Lehn (1951) nous pensons que le nombre de divisions de la cellule primordiale n'est pas le seul facteur déterminant la formation d'une catégorie de nématocyste. En effet, chez *Apolemia* par exemple, les cellules primordiales des masti-

PLANCHE V

1. Bourrelet urticant d'*Hippopodius hippocampus* montrant quatre mastigophores entourés de nombreux petits nématocystes en cours de différenciation; microscope à contraste de phase, *in vivo*. $\times 600$.
- 2-7. Formation des clones de nématoblastes dans le bourrelet urticant d'*Apolemia uvaria*; microscope à contraste de phase, *in vivo*. $\times 1\,000$.
2. Mitose d'une cellule interstitielle.
3. Fin de la première mitose.
4. Deux cellules en division.
5. Quatre cellules en division.
6. Huit cellules en division.
7. Clone de 16 cellules.



gophores et celles des sténotèles, qui subissent le même nombre de mitoses, donnent des nématocystes très différents.

D'autre part, chez *Apolemia*, les microïsorhizes et les macroïsorhizes forment des clones de même composition numérique, il en est de même pour les microbirhopaloïdes et les macrobirhopaloïdes, pour les microsténotèles et les macrosténotèles. Chez *Rhizophysa*, les microïsorhizes et les macroïsorhizes forment également des groupes numériquement identiques. Ces résultats contredisent ceux de Lehn (1951) et établissent non seulement que pour une catégorie morphologique donnée, les différences de tailles ne résultent pas d'une variation du nombre de mitoses de la cellule primordiale, mais précisent que chez une espèce donnée, les nématocystes d'une même catégorie ont, entre autres caractères communs, celui de toujours former des clones de même composition numérique quelle que soit leur taille.

La comparaison des résultats obtenus chez *Apolemia* et chez *Rhizophysa* permet de noter que, suivant les espèces, une même catégorie de nématocystes peut former des clones numériquement différents. Ainsi, les sténotèles sont groupés par huit chez *Apolemia* et par quatre chez *Rhizophysa*.

Enfin, les nombreuses observations faites chez *Apolemia uvaria*, dans des conditions très variées, ont montré une grande constance dans la composition numérique des clones. Ceci nous incite à penser que la régulation de la production d'une catégorie de nématocyste ne doit pas résulter d'une variation du nombre des mitoses précédant la différenciation morphologique (Zumstein et Tardent (1971), mais plutôt de la stimulation d'un nombre plus ou moins grand de cellules interstitielles.

Dans un clone, tous les nématocystes se différencient de façon rigoureusement synchrone. Rich et Tardent (1969) ont souligné ce fait et le considèrent comme la conséquence des relations plasmiques existant entre les cellules. Nous avons signalé que, contrairement aux observations de Fawcett et Slatterback (1959) chez l'*Hydre*, nous n'avons jamais observé d'interruption de la membrane des nématoblastes et il est vraisemblable que chez les Siphonophores, le synchronisme de la différenciation des cellules d'un clone s'effectue par d'autres voies.

Les travaux de Lehn (1951), puis de Tardent, Rich et Schneider (1971) ont mis en évidence, chez l'*Hydre*, une polarité dans la distribution des nématocystes en cours de différenciation le long du polype. Les macrosténotèles se développent dans la région antérieure de la colonne gastrique tandis que les microsténotèles apparaissent surtout dans la région postérieure. Pour Lehn, cette distribution est liée à une variation du nombre de divisions des cellules primordiales, divisions qui seraient elles-mêmes déterminées par les positions de ces cellules le long de l'axe antéro-postérieur. Tardent, Rich et Schneider (1971) précisent que la différenciation des macrosténotèles est sous la dépendance des tentacules et que l'ablation de la région buccale et des tentacules arrête la formation de ces nématocystes. La confrontation de ces conclusions et de nos résultats chez les Siphonophores nous conduisent à considérer le problème de la polarité de la différenciation des sténotèles chez l'*Hydre* sous une autre forme. Les macrosténotèles ne seraient-ils pas destinés aux tentacules tandis que les microsténotèles resteraient dans la colonne ? Ce détail n'est pas précisé par les auteurs, mais, dans le cas d'une réponse affirmative, on pourrait assimiler le gradient de distribution des sténotèles en cours de différenciation chez l'*Hydre*, aux spécialisations locales de certains bourrelets urticants des Siphonophores. La formation des grands sténotèles serait sous la dépendance des tentacules et destinée à ces tentacules comme, par exemple, la production des macroïsorhizes dans les dactylozoïdes du siphosome d'*Apolemia uvaria* est dépendante des cloches natatoires et destinée à ces cloches. Les macroïsorhizes des cloches nata-toires d'*Apolemia* se forment dans les massifs cnidogènes les plus proches de ces cloches, de même, les grands sténotèles de l'*Hydre* se formeraient dans la région de la colonne gastrique la plus proche des tentacules.

ABRÉVIATIONS

B, Bouton urticant ; B.U., bourrelet urticant ; C, capsule ; Cav. G, cavité gastrique ; Eb. T, ébauches des tentilles ; Ect, ectoderme ; End, endoderme ; Erg, ergastoplasme ; F.P. filament pêcheur ; F.T, filament terminal ; G, appareil de Golgi ; N, noyau ; P, pédoncule de la tentille ; R, ribosomes ; St, stolon ; T, tentille ; T. ext, tube externe ; T. int, tube interne.

BIBLIOGRAPHIE

- CARRÉ, C. et CARRÉ, D. (1973). — Étude du cnidome et la cnidogenèse chez *Apolemia uvaria* (Siphonophore physonecte). *Exp. cell. res.*, **81**, 237-249.
- CARRÉ, D. (1972). — Étude du développement des cnidocystes dans le gastrozoïde de *Mugiaeae kochi* (Siphonophore calycophore). *C.R. Acad. Sc.*, **275**, 1263-1266.
- (1974). — Formation, migration et maturation des nématoblastes et des nématocystes chez les Siphonophores. II. Migration. *Ann. Embr. Morph.* (sous presse).
- FAWCETT, W., SUSUMU, Ito et SLAUTTERBACK, D. (1959). — The occurrence of Intercellular Bridges in Groups of Cells exhibiting synchronous Differentiation. *J. Biophysic and Biochem. Cytol.*, **5**, 453-460.
- LEHN, H. (1951). — Teilungsfolgen und Determination von I. Zellen für die Cnidenzbildung bei *Hydra*. *Z. Naturf.*, **6b**, 388-391.
- RICH, F. et TARDENT, P. (1969). — Untersuchungen zur Nematocysten Differenzierung bei *Hydra attenuata*. *Revue Suisse Zool.*, **76**, 779-787.
- TARDENT, P., RICH, F. et SCHNEIDER, V. (1971). — The polarity of stenotele differentiation in *Hydra attenuata*. *Develop. Biol.*, **24**, 596-608.
- ZUMSTEIN, A. et TARDENT, P. (1971). — Beitrag zum Problem der Regulation der Nematocytenproduktion bei *Hydra attenuata*. *Rev. Suisse Zool.*, **78**, 705-714.

Manuscrit reçu le 18 février 1974.

FORMATION, MIGRATION AND MATURATION OF NEMATOBLASTS AND OF NEMATOCYSTS IN THE SIPHONOPHORES

1 - Identification and formation of nematocyst clones.

Danièle CARRÉ

*Station zoologique, C.N.R.S., Université de Paris- VI, 06230 Villefranche-Sur-Mer,
France.*

SUMMARY - When forming in the gastrozoïd cnidogenic clump of Siphonophores, the nematoblasts are associated in clones. A clone is constituted of stinging cells of the same category, at the same stage of development and coming from the same primordial cell.

The numerical composition of the clones, for a given category of nematocyst, is determined in every species of Siphonophores.

In the same species, nematocysts of different sizes, but belonging to the same morphological category have, among other common characteristics, the characteristic of forming clones of the same numerical composition. However, the author shows that the number of divisions of the primordial cell is not the only factor determining the differentiation of a nematocyst category.

The regulation of the production of nematocysts does not appear to be accomplished by a variation of the number of mitosis at the moment of the formation of the clones. But it must result from activation of a number more or less large of interstitial cells.

A few observations and simple experiments show that there exists a relation between the formation of nematocysts in the cnidogenous clumps and the specific needs of the neighbouring receptor organs in stinging cells.

INTRODUCTION

The nematocysts (or cnidocysts) of Cnidaria are among the most complex and enigmatic cellular organs in the animal kingdom. They are contained in a cell called a nematoblast (or cnidoblast) and are formed by a capsule containing a long filament capable of devaginating under certain influences. After working, for the capture of prey, for example, the nematocysts and their nematoblasts disappear and are replaced by new stinging cells. Cnidogenesis is, therefore, an uninterrupted process throughout the life of a cnidarian.

Very early on, zoologists sought to understand the process of the differentiation of nematocysts. In two previous publications (Carré, D. 1972; Carré, C and Carré, D. 1973) we recalled the different theories advanced by the authors and shown, by an ultrastructural study and an in vivo study in *Muggiae kochi* (Siphonophore calycophore) and in *Apolemia uvaria* (Siphonophore physonect), that the differentiation of the nematocyst inside the nematoblast presents three successive phases: formation of the capsule by fusion of Golgian vesicles, secretion of an external tube by the Golgi apparatus, invagination of this tube in the capsule. Plate 1 illustrates these conclusions from observations made in another species, *Hippopodius hippopus* (Siphonophore calycophore). Figures 1 and 2 represent different mastigophores. On the other hand, the different stages of invagination of the filament in the capsule were photographed on the same mastigophore.

Since the main morphological aspects of the differentiation of a nematocyst within a nematoblast can be considered as known, we are interested in the distribution of

nematocysts in cnidogenic foci. Observations *in vivo* make it possible to observe that each nematocyst, when it develops, is part of a set of stinging cells of the same type, and at the same stage of development, forming a clone (Plate III, fig. 1); I have studied in various species of siphonophores, the numerical composition of the clones of each of the categories of nematocysts present. Secondly, we investigated whether the distribution of the different clones in the cnidogenic foci was fortuitous or determined. Finally, we were interested in the clones resulting from the division of interstitial cells and we compared them to the nematocyst clones to know if we could consider the latter as resulting directly from the differentiation of the former. Prior to this work, the ultrastructure of the primordial cells of the nematoblasts was studied.

MATERIAL AND METHODS

Siphonophores were collected in the bay of Villefranche-sur-Mer either by net fishing or, for large forms, on the surface using plastic bags. We have often worked on calyconula and siphonula larvae obtained by breeding from artificial fertilization. For observations on living organisms, larvae or fragments of colonies were placed in small culture chambers with water circulation. These assemblies, observed under an interference phase contrast microscope, made it possible to follow the same phenomenon for a prolonged period (3 to 4 hours), visually and by photos.

The electron microscopic study was carried out on specimens fixed with buffered glutaraldehyde and osmium tetroxide, and included according to the Spurr method. The ultrafine sections, contrasted by uranyl acetate and Reynolds' lead citrate, were observed on a Hitachi HU IIC electron microscope.

RESULTS

1 - Ultrastructure of the interstitial cells of the basigaster.

Siphonophores have feeder polyps, or gastrozooids, provided with a long tentacle carrying ramifications or tentilla. Almost all of the mature nematocysts in the colony are located in the cnidoband and the terminal filament of these tentilla. On the other hand, all the nematocysts undergoing differentiation are located at the base of the gastrozooids in ectodermal cnidogenic foci called basigaster (Fig. 1).

The basigaster is an unstratified mass formed by interstitial cells and by nematoblasts containing nematocysts at various stages of development (Plate II, fig. 1). The interstitial cells are all identical and present the characters of embryonic cells: the nucleus is large, the cytoplasm contains few figurative elements except for a few mitochondria and numerous nucleoprotein granules (Plate II, fig. 2). It is common to observe stages of mitosis in these cells.

Fawcett and Slatterback (1959) reported the presence of intercellular bridges between *Hydra* nematoblasts. This protoplasmic continuity leads them to assimilate the joined and communicating nematoblasts to a syncytium. In siphonophores we have never observed any interruption of the membrane neither between the interstitial cells of the basigaster, nor between the nematoblasts undergoing differentiation.

II - The clones of nematoblasts and nematocysts.

The identification and study of nematoblast and nematocyst clones in siphonophores has been based primarily on *in vivo* observations.

A - *Apolemia uvaria*.

1 - *Nematocyst clones* (Plate III and Plate IV, fig. 1 to 4).

Apolemia uvaria has four categories of nematocysts, three of these categories being of two sizes: microbirhopaloids and macrobirhopaloids, microstenoteles and macrostenoteles, microisorhizas and macroisorhizas, mastigophores. All the stages in the development of these nematocysts have been described (Carré, C and Carré, D. (1973), which has enabled us to identify and count the cells of very young clones, which are unlikely to have been dissociated by cellular interactions. We studied the composition of 151 clones.

Table I shows that in *Apolemia uvaria* the microbirhopaloids as well as the macrobirhopaloids form, when they differentiate, clones of 16 nematocysts (Plate III, fig. 2 and 3). It is the same for microisorhizes and macroisorhizas (Plate IV, fig. 3 and 4). On the other hand, microstenoteles, macrostenoteles and mastigophores are associated in groups of eight (Plate III, fig. 1; Plate IV, fig. 1 and 2).

Of the 151 clones studied, only 11 have a composition other than 8 or 16 cells. The homogeneity of these results can be explained, in part, by the fact that in *Apolemia uvaria* we worked not on the basigasters of the gastrozooids but on particular cnidogenic foci, specific to this species, located at the base of the dactylozooids, or palpons, and formed by a single layer of ectodermal cells. This facilitates the observations and, above all, limits in a plane the cellular interactions tending to disjoin the cells of a clone. In addition, between the *Apolemia* nematoblasts, there are glandular cells (original character found only in another species) which also contribute to the isolation and maintenance of nematocyst clones.

The distribution of the different clones in the cnidogenic massif seems anarchic. However, it is common, but not mandatory, to observe sets of clones of a same category of nematocysts but at different stages of development.

2 - *Clones resulting from the division of interstitial cells* (Plate V, fig. 2 to 7).

The first visible manifestation of cnidogenesis is the multiplication of certain interstitial cells. The chromosomes of *Apolemia* being stocky and few in number, we were able to follow this process. The cells in mitosis of the basigaster are grouped into islets of one, two, four or eight cells which, once division is complete, form groups of two, four, eight and sixteen cells (Plate V, Figs. 2 to 7). The prolonged observation of these cells shows that after a phase of rest, the groups of four cells always initiate a new division; this is not required for groups of two and eight cells and never happens for groups of sixteen cells. It therefore seems that, in this species, the division of a primordial cell leads to the formation of groups of two daughter cells, or to that of clones of eight or sixteen cells. Isolated mitoses, resulting in groups of two cells, can be considered as divisions, assuring the maintenance of the stock of interstitial cells. For the other mitoses, there is a perfect concordance, from a numerical point of view, between the interstitial cell clones and the nematocyst clones. We can therefore consider the latter as resulting directly from the differentiation of the former.

B- RHIZOPHYSA FILIFORMIS (SIPHONOPHORE CYSTONECT).

1 - Nematocyst clones (Plate IV, fig. 5 and 6).

The *Rhizophysa filiformis* cnidome is composed of stenoteles (capsule 24 μ in diameter) and isorhizas of two sizes: microisorhizas (10 μ in diameter), and macroisorhizas (25 μ in diameter). We were able to identify these three categories from the early stages of their formation: their small size clearly differentiates microisorhizas from other nematocysts, while the shape of the nematocystic tube, from the start of its secretion, distinguishes stenoteles (dilated tube in its basal region) macroisorhizas (isodiametric tube over its entire length). This early diagnosis made it possible to count very young clones: the stenoteles, microisorhizas and macroisorhizas always form groups of four nematocysts in the early stages of their development (Plate IV, fig. 5 and 6). Then these clones are most often dissociated, even before the end of the invagination of the nematocystic tube. As in *Apolemia uvaria*, there are glandular cells among the nematoblasts, which contribute to the isolation of the clones.

2 - Clones resulting from the division of interstitial cells.

The interstitial cells in mitosis, in the basigaster of *Rhizophysa* are isolated or grouped in pairs and, once division is complete, give groups of two and four cells. After a phase of rest, some of the groups of two cells initiate a second division, while those formed by four cells no longer divide. We can therefore conclude, as in *Apolemia*, that each nematocyst clone arises from the multiplication and differentiation of a particular interstitial cell.

C - OTHER SPECIES OF SIPHONOPHORES (Plate V, fig. 1).

We have undertaken the numerical study of the groups of nematocysts in most of the other siphonophores present in Villefranche-sur-Mer: *Sphaeronectes gracilis*, *Abylopsis tetragona*, *Hippopodius hippopus*, *Lensia subtilis*, *Muggiae kochi*, *Rosacea cymbiformis*, *Vogtia pentacantha*, *Vogtia pentacantha*, *Eudoxoides spiralis*, *Lilyopsis rosea*, *Halostemma rubra*, *Nanomia bijuga*, *Physophora hydrostatica*, *Forskalia edwardsi*. In the basigaster of all these species there are plaques formed by clones of nematocysts of the same category but at various stages of development (Plate V, Fig. 1). It is possible to recognize and separate the different stages of development of mastigophores (in calycophoran siphonophores) and stenoteles (in physonect siphonophores), which are large stinging cells. On the other hand, for each of the other categories of nematocysts, it is almost impossible, in the species examined to distinguish one from the other, in the living, the close stages of development and, therefore, to limit and count the clones of sure way.

However, the existence of the clones could be confirmed by following the divisions of the interstitial cells. In some species, the interstitial cells in mitosis form only groups of two or four cells, in others they form groups of two, four or eight cells. In all cases, these groups are separate from each other.

III - Determinism of the formation of nematocysts.

With electron microscopy we did not find any ultrastructural details allowing to differentiate, for example, the primordial cell of a clone of mastigophores from that of a

clone of isorhizas. All the interstitial elements appeared to us to be morphologically identical. We believe that this identity must also exist from a biochemical point of view and that until the moment when an inducing factor of exogenous origin determines the fate of these cells towards the production of such or such category of nematocysts.

A few observations and simple experiments allow to illustrate and justify this opinion. In the basigaster of *Rhizophysa filiformis*, stenoteles, microisorhizas and macroisorhizas are distinguished. At maturity, the stenoteles and part of the microisorhizas migrate to the buccal region of the gastrozooid, while the other microisorhizes and all the macroisorhizas migrate into the tentacle. We isolated gastrozooids from *Rhizophysa* and placed them in culture medium. At the end of five days, no qualitative modification was noted in the basigaster of the gastrozooids provided with their tentacle. On the other hand, after the same period, the observation of the basigasters of gastrozooids cultured after the ablation of the tentacle, shows that they are formed, in addition to the interstitial cells, by stenoteles and microisorhizas at various stages of development, but that they are devoid of macroisorhizas in the process of differentiation. The formation of the latter category therefore seems to be linked to the presence of the tentacle, which suggests a close relationship between the production of the nematocyst and the actual presence, and in the vicinity, of its site of use. Still in *Rhizophysa*, this relationship is illustrated by the study of the pneumatophore, the apical region of which has functional stenoteles and microisorhizas. This bicnidome is formed in an cnidogenic mass peculiar to this species, located in the ectoderm of the pneumatophore, and different from all the other basigasters of the colony by the absence of macroisorhizas.

Similar observations could be made in *Apolemia uvaria*. This physonect siphonophore has the particularity of having dactylozooids inserted along the nectosome, among the swimming bells. These dactylozooids do not have tentacles, unlike those of the siphosome described previously. Their basigaster is completely devoid of birhopaloids (nematocysts which, at maturity, are localized in the palpacles [? tentacules] and which form most of the basigaster of the dactylozooids of the siphosome) and mastigophores (also present in the dactylozooids of the siphosome); it presents clones of microisorhizas, macroisorhizas, microstenoteles and macrostenoteles (Plate III, fig. 1). At maturity, the microstenoteles, the macrostenoteles and the microisorhizas migrate to the apex of the dactylozooids while the macroisorhizas migrate into the buds of the swimming bells. If these dactylozooids are isolated in a culture medium, it is found that after five days their basigasters no longer have macroisorhizas in the course of differentiation. It is therefore conceivable that the formation of macroisorhizas, in the dactylozooids of the nectosome, is induced or dependent on a factor originating from the swimming bells for which they are intended. It would have been interesting to graft a tentacle to these dactylozooids which are normally devoid of it, in order to observe whether this graft induces the formation of birhopaloids (nematocysts typical of the tentacle of this species). We made several attempts, but each time the graft quickly detached. This experiment would have been a means of verifying the influence of the receptor organ of the nematocysts on their zone of differentiation and, above all, of showing whether the interstitial cells of the basigaster were able to secrete any type of nematocyst present in the species studied. We will resume this experiment with the next capture of an *Apolemia*.

DISCUSSION

The existence of nematocyst clones had already been established by several authors from histological studies in *Hydra*. Lehn (1951) indicates that clones of four to

eight nematoblasts differentiate from large stenoteles; clones of eight to sixteen cells give small stenoteles; those from sixteen to thirty-two, desmonemes; finally, the clones of sixteen cells produce isorhizas. For this author, the number of divisions of the primordial cell is the determining factor in the formation of a particular category of nematocysts.

Contrary to these observations, Rich and Tardent (1969), also in *Hydra*, found that the groups of nematoblasts are formed of four, eight or sixteen cells, but "that there is no correlation between the number of cells in a group and the type of nematocyst represented in it". They deduce that the number of divisions of the primordial cell is not a determining factor.

The discrepancies and contradictions between these authors are perhaps explained by the fact that they worked on already well differentiated nematocysts (probably on stages with an external tube in the process of invagination or with an invaginated tube) and our observations in the siphonophores, showed us that, very often, the nematocysts began to migrate before the end of the invagination of the nematocystic tube which involves a very early dissociation of the clones (Carré, D. 1974).

In *Apolemia* and in *Rhizophysa* we found that the numerical composition of the clones is rigorously defined for each category of nematocyst. However, contrary to the opinion of Lehn (1951) we believe that the number of divisions of the primordial cell is not the only factor determining the formation of a category of nematocyst. Indeed, in *Apolemia* for example, the primordial cells of mastigophores and those of stenoteles, which undergo the same number of mitoses, give very different nematocysts.

On the other hand, in *Apolemia*, microisorhizas and macroisorhizas form clones of the same numerical composition, it is the same for microbirhopaloids and macrobirhopaloids, and for microstenoteles and the macrostenoteles. In *Rhizophysa*, microisorhizas and macroisorhizas also form numerically identical groups. These results contradict those of Lehn (1951) and establish not only that for a given morphological category, the differences in size do not result from a variation in the number of mitoses of the primordial cell, but specify that in a given species, the nematocysts of the same category have, among other common characteristics, that of always forming clones of the same numerical composition whatever their size.

The comparison of the results obtained in *Apolemia* and in *Rhizophysa* makes it possible to note that, according to the species, the same category of nematocysts can form numerically different clones. Thus the stenoteles are grouped by eight in *Apolemia* and by four in *Rhizophysa*.

Finally, the numerous observations made in *Apolemia uvaria*, under very varied conditions, have shown great consistency in the numerical composition of the clones. This suggests that the regulation of the production of a category of nematocyst should not result from a variation in the number of mitoses preceding morphological differentiation (Zumstein and Tardent (1971), but rather from the stimulation of a number more or less large interstitial cells.

In a clone, all nematocysts differentiate in a strictly synchronous fashion. Rich and Tardent (1969) underlined this fact and consider it to be the consequence of the plasma relationships existing between cells. We have reported that, contrary to the observations of Fawcett and Slauterback (1959) in *Hydra*, we have never observed any disruption of the nematoblast membrane and it is likely that in siphonophores, the synchronism of cell differentiation of a clone is effected by other routes.

The work of Lehn (1951), then of Tardent, Rich and Schneider (1971) highlighted evidence, in *Hydra*, of a polarity in the distribution of nematocysts undergoing differentiation along the polyp. Macrostenoteles develop in the anterior region of the gastric column while microstenoteles mainly appear in the posterior region. For Lehn, this

distribution is linked to a variation in the number of divisions of primordial cells, divisions which would themselves be determined by the positions of these cells along the anteroposterior axis. Tardent, Rich and Schneider (1971) specify that the differentiation of macrostenoteles is dependent on the tentacles and that the ablation of the oral region and the tentacles stops the formation of these nematocysts. The comparison of these conclusions and our results in the siphonophores leads us to consider the problem of the polarity of the differentiation of the stenoteles in the *Hydra* in another form. Will not the macrostenoteles be destined for the tentacles while the microstenoteles remain in the column? This detail is not specified by the authors, but, in the case of an affirmative answer, we could assimilate the distribution gradient of stenoteles undergoing differentiation in *Hydra*, with the local specializations of certain basigasters of the siphonophores. The formation of the large stenoteles would be dependent on the tentacles and intended for these tentacles as, for example, the production of macroisorhizas in the dactylozooids of the siphosome of *Apolemia uvaria* is dependent on swimming bells and intended for these bells. Macroisorhizas of swimming bells of *Apolemia* are formed in the cnidogenic masses closest to these bells, similarly, the large stenoteles of the *Hydra* would form in the region of the gastric column closest to the tentacles.