

CAPACITÉS MORPHOGÈNES DES CELLULES D'ÉPONGES DISSOCIÉES

par

GYSÈLE VAN DE VYVER et MARCO BUSCEMA

Laboratoire de Biologie animale et cellulaire,
Université libre de Bruxelles,
50, Avenue F. Roosevelt, B-1050 Bruxelles (Belgique)

RÉSUMÉ

Une analyse ultrastructurale nous a permis de suivre de manière approfondie la reconstitution d'éponges fonctionnelles à partir d'agrégats cellulaires, formés, les uns au départ de suspensions non-fractionnées d'éponges dissociées, les autres au départ de suspensions d'archéocytes purifiés.

La réorganisation des agrégats provenant de suspensions complètes consiste essentiellement en un réassemblage en structures fonctionnelles des cellules qui conservent leur différenciation initiale. Au cours de cette restructuration, les archéocytes phagocytent non seulement les débris cellulaires provenant de la dissociation, mais aussi les cellules saines surnuméraires, rétablissant ainsi l'équilibre quantitatif entre les divers types cellulaires.

L'évolution des agrégats composés exclusivement d'archéocytes souligne le caractère largement totipotent de ces cellules qui se différencient en tous les types cellulaires de l'éponge. Toutefois, les anomalies, qui caractérisent les éponges reconstituées à partir d'archéocytes seuls et qui consistent principalement en un déséquilibre quantitatif des types cellulaires, suggèrent que certains mécanismes morphogènes de régulation font défaut.

Morphogenetic capabilities of sponge dissociated cells

SUMMARY

The reconstitution of functional sponges from aggregates, some built from non-fractionated suspensions, others from purified archaeocytes, has been studied using electron microscopy in process of time.

The reorganization of aggregates made from complete suspensions mainly consists in a gathering of cells keeping their initial differentiation into functional structures. During restructuration, cellular debris resulting from dissociation and surnumerary healthy cells are phagocytized by archaeocytes.

The evolution of archaeocyte aggregates points out the totipotency of these cells, since they appear to be able to differentiate into all sponge cell types. Nevertheless, the anomalies appearing during the sponge reconstitution, which mainly consist in a cell type population ratio disequilibrium, suggest that some morphogenetic regulation mechanisms are lost.

A Paul BRIEN.

INTRODUCTION

Depuis que WILSON (1907, 1911) a découvert la capacité d'agrégation et de ségrégation spécifique des cellules d'éponges dissociées, et leur remarquable pouvoir de reconstitution, l'intérêt porté aux mécanismes impliqués dans l'agrégation cellulaire n'a cessé de croître. Très rapidement après cette découverte, les biologistes ont reconnu dans ce modèle expérimental, un outil exceptionnel pour étudier des phénomènes très universels, tels que la différenciation, l'adhérence et la spécificité cellulaire.

Cet outil cependant devait soulever bien des controverses. En effet, au cours des années qui ont suivi l'expérience initiale de WILSON, les travaux de morphogénèse s'appuyant sur l'agrégation se sont multipliés, mais leurs conclusions sont loin d'être homogènes.

Pour certains auteurs dont WILSON (*op. cit.*) lui-même, la reconstitution d'éponges fonctionnelles à partir d'agrégats est un phénomène de régénération tout à fait caractéristique. En d'autres termes, la reconstitution de l'éponge se fait toute entière à partir d'un seul type cellulaire totipotent : les archéocytes.

Pour d'autres auteurs, dont HUXLEY (1911) et GALTISOFF (1925), plusieurs types cellulaires, parmi lesquels les archéocytes, les pinacocytes et les cellules grises, interviennent directement dans la reconstitution de l'éponge tandis que les choanocytes disparaissent ou se dédifférencient.

FAURE-FREMIET (1932) enfin, interprète la réorganisation d'une éponge non comme une régénération à partir d'un ou plusieurs types cellulaires, mais comme un regroupement structuré des cellules préexistantes.

Il appartient à BRIEN (1937) d'avoir levé cette controverse en suivant rigoureusement par l'histologie, l'évolution d'un agrégat depuis sa formation jusqu'à sa réorganisation en éponge fonctionnelle. Cette étude lui a permis de conclure que « l'éponge se réorganise sans qu'il y ait néoformations dans les structures essentielles. Dans le filtrat, les types cellulaires les plus caractéristiques sont dissociés mais présents. Ils subsistent avec leurs caractères sans qu'il y ait dédifférenciation. La réorganisation est une mise en place progressive des cellules selon leur nature et leurs propriétés de manière à reconstituer les tissus, les organes, les structures correspondant à leur destinée première. Il n'y a donc pas régénération, mais morphallaxis, la position que prennent les cellules étant fonction de leur nature et de leurs caractères ».

En élucidant le processus de restructuration des éponges dissociées, BRIEN a résolu un problème, mais il en a soulevé deux autres. En effet, si une éponge peut se reconstituer à partir de cellules différenciées regroupées au hasard au sein d'un agrégat, il faut nécessairement que les cellules puissent se déplacer, se reconnaître et se réassembler en structures fonctionnelles. Reste à savoir quels sont les mécanismes impliqués par ces différentes étapes. Par ailleurs, si les travaux de BRIEN montrent clairement que les archéocytes ne jouent pas un rôle privilégié dans la reconstitution d'une éponge dissociée, ils ne répondent pas à la question de savoir si des archéocytes à eux seuls peuvent reconstituer une éponge fonctionnelle.

Dans la voie tracée par BRIEN, c'est à ces deux aspects de la biologie des éponges que nous nous sommes intéressés au cours des dernières années.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Culture des éponges

Diverses souches de l'éponge d'eau douce *Ephydatia fluviatilis* (VAN DE VYVER, 1970) ont été utilisées. Pour chaque expérience, des gemmules récoltées dans nos élevages en étang ont été cultivées au laboratoire suivant la technique mise au point par RASMONT (1961).

Dissociation cellulaire et agrégation

Les éponges ont été dissociées mécaniquement par une succession d'aspirations et de refoulements lents dans une pipette Pasteur, dans du milieu de culture (milieu M, RASMONT, 1961). Les spicules et les groupes de cellules non-dissociées qui subsistent ont été éliminés par une filtration sur nylon (maille 25 μm de diamètre).

Pour toutes les expériences, nous avons utilisé des suspensions cellulaires de 2 ml contenant environ 10^6 cellules.

L'agrégation se déroule librement dans des cuvettes à fond plat, de 1 cm de diamètre, sans qu'aucune agitation ne soit communiquée aux cellules.

Techniques ultrastructurales

Des agrégats à divers stades de leur développement ont été fixés pendant une heure dans une solution à 1 % de tétroxyde d'osmium tamponnée à pH 7,4 au cacodylate de sodium 0,025 M. Les échantillons ont été déshydratés dans des bains successifs d'éthanol puis inclus dans l'ERL (SPURR, 1969). Les coupes fines ont été contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb selon REYNOLDS (1963). Elles ont été observées à l'aide d'un microscope AEI 6B.

Fractionnement cellulaire

Des archéocytes ont été purifiés par centrifugation en gradient de Ficoll suivant la technique mise au point par DE SUTTER et BUSCEMA (1977). Cette technique consiste à déposer une suspension complète d'éponges dissociées à la surface d'un gradient discontinu de Ficoll constitué de quatre couches de densité décroissante correspondant à des concentrations de 10 %, 8 %, 6 % et 4 %.

Après une centrifugation à 3000 g pendant 6 minutes, les archéocytes et eux seuls sont concentrés à l'interface des couches de Ficoll 8 %-10 %. On les récolte en perçant le fond du tube à centrifugation. La pureté des culots ainsi isolés a été vérifiée par une analyse ultrastructurale (DE SUTTER et BUSCEMA, 1977).

RÉSULTATS

Reconnaissance cellulaire au sein de l'agrégat

Une suspension non-fractionnée de cellules réalisée à partir d'éponges dissociées s'agrège spontanément sans agitation. Le début de l'agrégation se présente comme un regroupement tout à fait aléatoire de cellules de tous types. La surface de l'agrégat notamment comporte aussi bien des archéocytes et des collencytes que des choanocytes dont les flagelles battent vers l'extérieur.

Deux heures après le début de l'agrégation, et jusqu'à la fin du phénomène, soit six heures environ après la mise en suspension, les pinacocytes migrent en sur-

face et s'étalent sur les autres cellules pour y constituer un revêtement continu qui présente les caractéristiques de l'exopinacoderme des éponges adultes.

Au début de l'agrégation, les choanocytes sont dispersés au hasard en surface et au sein des agrégats. Progressivement, les cellules glissant les unes sur les autres, ils se retrouvent et en moins de deux heures, certains d'entre eux constituent déjà des ébauches de chambres choanocytaires. Ces ébauches sont peu structurées; le nombre de choanocytes rassemblés est très variable et leur orientation tout à fait fantaisiste (Pl. I, 1).

Après six heures cependant, tout se régularise. Il n'y a pratiquement plus de choanocytes isolés et les chambres choanocytaires, bien qu'encore éparpillées, ont retrouvé leur aspect caractéristique.

Simultanément, l'agrégat se creuse de lacunes délimitées par des pinacocytes. Ces lacunes sont les premières ébauches du système aquifère (Pl. I, 2).

L'analyse ultrastructurale de l'agrégation traduit clairement que l'un des événements essentiels qui se déroulent au sein de l'agrégat est une extraordinaire activité de déplacement des cellules les unes par rapport aux autres. Ces déplacements regroupent les cellules en chambres choanocytaires, en canaux aquifères et en pinacoderme, tout en conservant, comme l'avait décrit BRIEN à l'échelle photomicroscopique, leur différenciation initiale.

Dans sa description de la restructuration de l'agrégat, BRIEN (1937) a montré que les cellules centrales dégénèrent et sont phagocytées par les archéocytes périphériques.

Compte tenu de la taille extrêmement modeste des agrégats sur lesquels nous avons travaillé (leur diamètre ne dépasse guère 300 μm), nous n'avons jamais observé de clivage en une zone périphérique saine et une zone centrale dégénérescente. Toutefois, les archéocytes dispersés dans les agrégats phagocytent activement non seulement les débris cellulaires provenant de la dissociation (Pl. II, 3) mais aussi des cellules saines, particulièrement des choanocytes (Pl. II, 4).

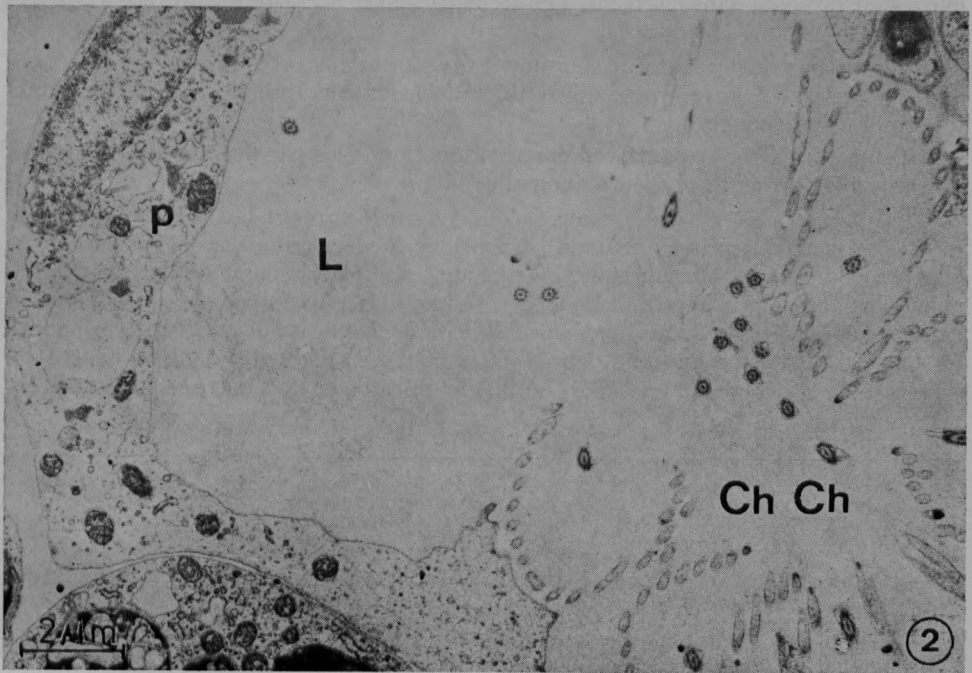
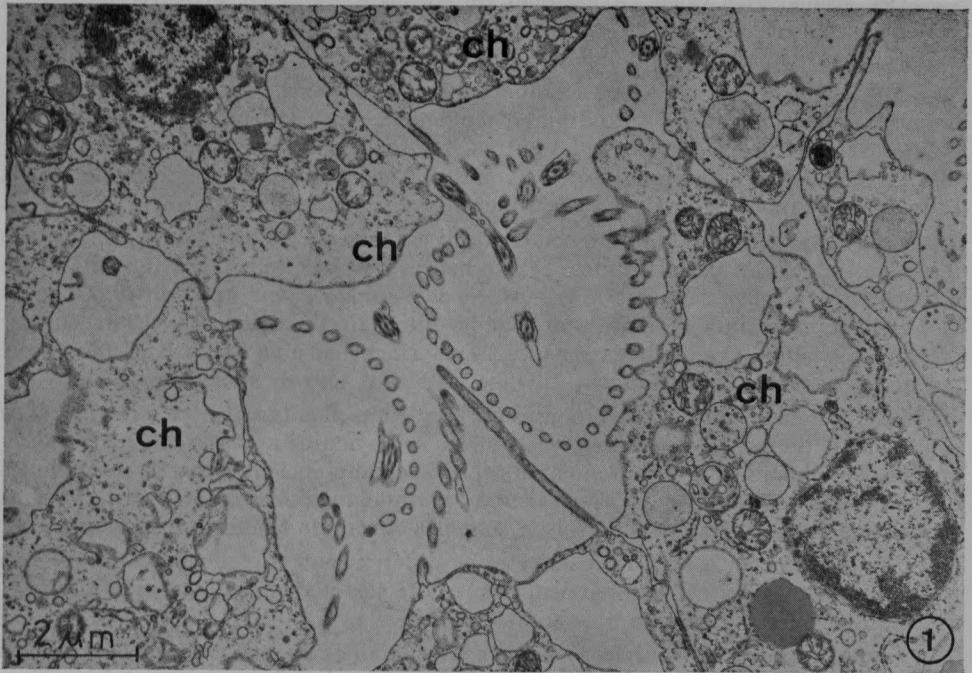
Cette activité est attestée par l'abondance de phagosomes qui caractérise les archéocytes quelques heures après la formation de l'agrégat. On peut interpréter cette activité de phagocytose comme un phénomène d'épuration en ce qui concerne l'élimination des cellules lésées et comme un rééquilibrage quantitatif des populations cellulaires en ce qui concerne la phagocytose des cellules saines.

Environ 24 heures après la mise en suspension des cellules, les agrégats adhèrent au support, puis s'y étalent grâce à l'extension rapide du pinacoderme. Cet étalement est suivi par la restructuration complète du système aquifère, la régénération du squelette formé « de novo » et l'apparition du premier oscule.

L'apparition de l'oscule marque la fin de la reconstitution.

PLANCHE I

1. — Ébauche de chambre choanocyttaire dans un agrégat de 6 heures ($G = 10.500$), ch. = choanocyte.
2. — Lacune en communication avec une chambre choanocyttaire dans un agrégat de 6 heures ($G = 8.300$). L = lacune; Ch. ch. = chambre choanocyttaire; p = pinacocyte.



Restructuration d'agrégats constitués d'archéocytes purifiés

Des archéocytes isolés en gradient de Ficoll et remis en suspension dans du milieu de culture s'agrègent spontanément en sphérules minuscules. Une légère agitation est nécessaire pour obtenir des agrégats de taille manipulable.

Au terme de l'agrégation, chaque sphérule est constituée par un ensemble homogène d'archéocytes qui ne diffèrent entre eux que par leur forme. Les archéocytes centraux tassés les uns sur les autres épousent des formes polyédriques tandis que les cellules périphériques sont arrondies. Quelle que soit leur position dans l'agrégat, les archéocytes sont pratiquement dépourvus de phagosomes (Pl. III, 5-6).

La première phase de différenciation qui caractérise les agrégats d'archéocytes intéresse les cellules périphériques. Douze heures après le début de l'agrégation, les cellules superficielles s'étalent à la surface de l'agrégat, leur appareil de Golgi et leur reticulum granuleux régressent, tandis que dans le noyau, la chromatine se condense en blocs. Ces modifications les transforment en pinacocytes typiques à ceci près que les noyaux de beaucoup d'entre elles sont encore nucléolés.

La différenciation des choanocytes est beaucoup plus tardive. Elle est précédée d'une vague de mitoses qui s'amorce environ vingt heures après le début de l'agrégation. Les choanocytes proprement dits, qui se différencient à partir des cellules qui viennent de se diviser, n'apparaissent que quelques heures plus tard. Ils sont groupés en petits amas, mais ne constituent pas encore de chambres choanocytaires.

Simultanément, certains archéocytes se différencient en collencytes et en sclérocytes. Les sclérocytes sont particulièrement faciles à reconnaître grâce à la présence de leur spicule en voie d'élaboration.

Après trente heures environ, les types cellulaires les plus caractéristiques de l'éponge, c'est-à-dire, les pinacocytes, les collencytes, les choanocytes et les sclérocytes sont présents dans l'agrégat. Les archéocytes qui subsistent sont restés pauvres en phagosomes.

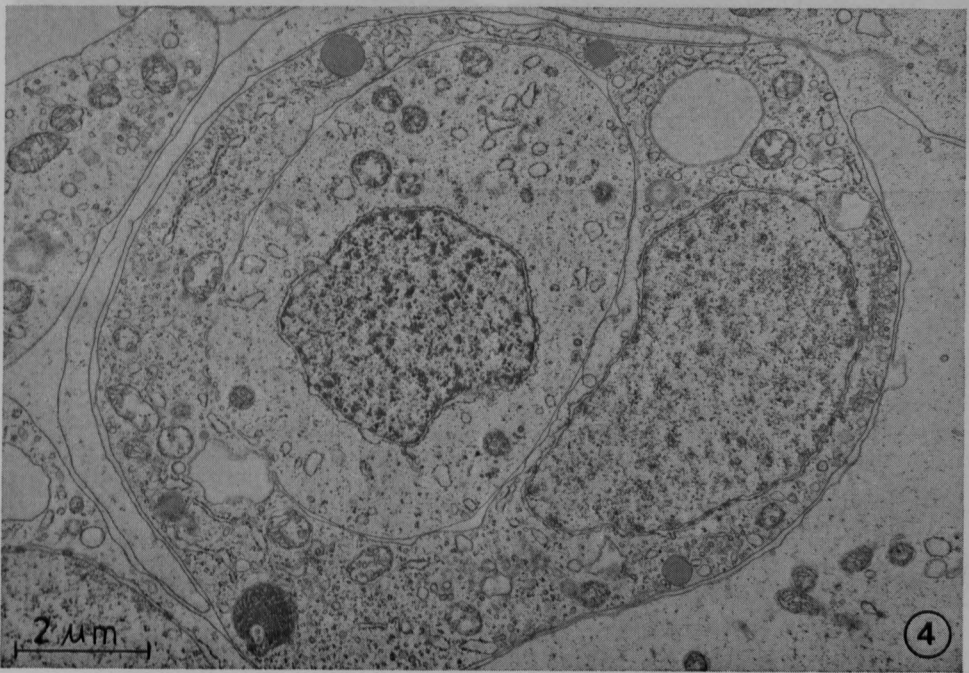
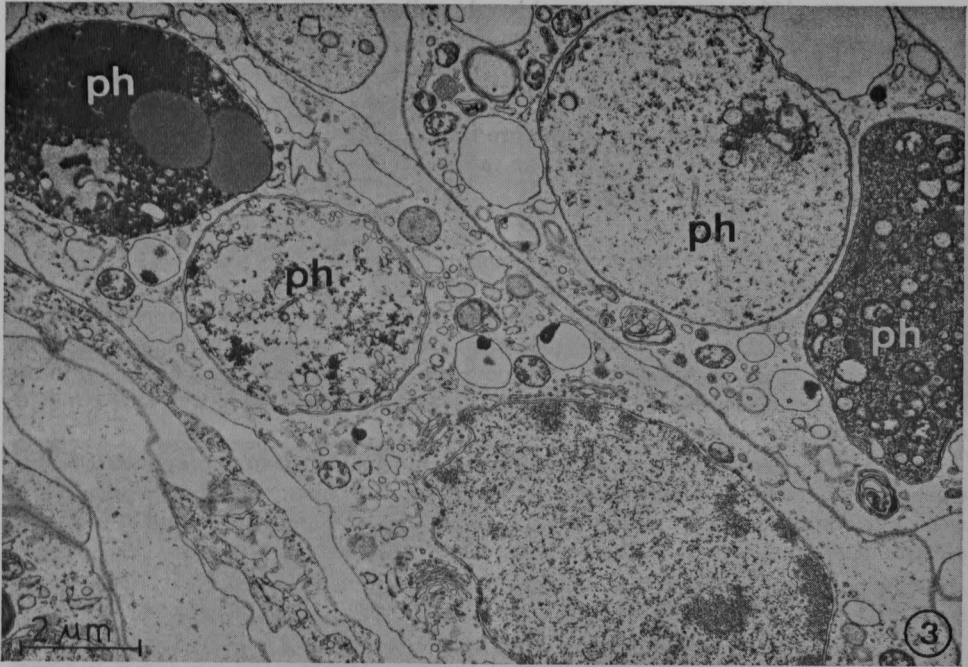
Ces observations montrent clairement que des archéocytes provenant d'éponges adultes conservent la propriété de se différencier en tous les types cellulaires caractéristiques de l'éponge.

Toutefois, la reconstitution d'éponges fonctionnelles par des agrégats d'archéocytes purifiés présente plusieurs anomalies.

Ces agrégats en effet, se fixent et s'étalent sur le support beaucoup plus rapidement que ceux qui proviennent de suspensions non fractionnées, et l'extension de leur pinacoderme est considérable. Il en résulte un aplatissement de l'agrégat infiniment plus accusé que chez les témoins. L'anomalie la plus frappante consiste cependant en une hypersécrétion de spicules. Si dans les agrégats de vingt-quatre heures, les spicules sont peu nombreux, leur sécrétion par les sclérocytes dans les heures qui suivent est extrêmement intense et se fait manifestement au détriment de la proli-

PLANCHE II

3. — Archéocyte ayant phagocyté des débris cellulaires dans un agrégat de 6 heures (G = 10.700). arch. = archéocyte; ph = phagosome.
4. — Archéocyte ayant phagocyté une cellule entière et apparemment saine dans un agrégat de 6 heures (G = 11.000).



fération des autres types cellulaires. Ces spicules ne constituent pas une véritable charpente car ils restent couchés à l'horizontale. Ce comportement semble indiquer une très nette déficience dans la synthèse du collagène (Pl. III, 7-8-9-10).

Le système aquifère est fonctionnel environ trois jours après le début de l'aggrégation.

L'examen d'agrégats que l'on a forcé à s'étaler et se réorganiser entre lame et lamelle, montre cependant que le nombre de chambres choanocytaires qui bordent les canaux exhalants est très faible par rapport aux éponges reconstituées à partir de suspensions cellulaires complètes.

DISCUSSION

L'analyse ultrastructurale de la reconstitution d'éponges fonctionnelles à partir d'agrégats formés les uns au départ de suspensions cellulaires non fractionnées, les autres au départ de suspensions d'archéocytes purifiés, nous a permis de démontrer les potentialités morphogènes de différents types cellulaires ainsi que leur capacité de reconnaissance « tissulaire ».

La réorganisation des agrégats provenant de suspensions complètes consiste essentiellement en un réassemblage en structures fonctionnelles des cellules dissociées qui conservent leur différenciation initiale. Seul le squelette, qui a été complètement éliminé lors de la dissociation est synthétisé de novo.

Sur ce point, nos résultats confirment donc tout en les précisant, les observations histologiques effectuées par BRIEN en 1937.

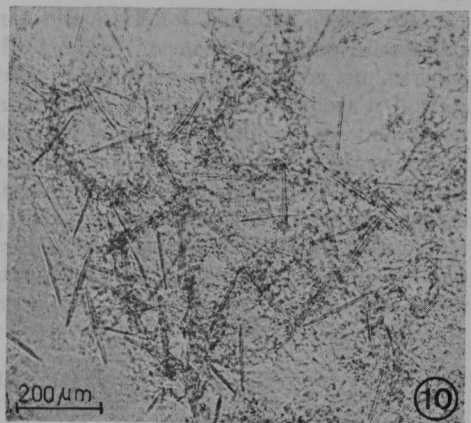
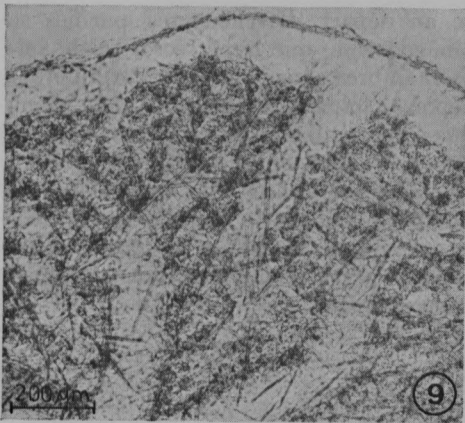
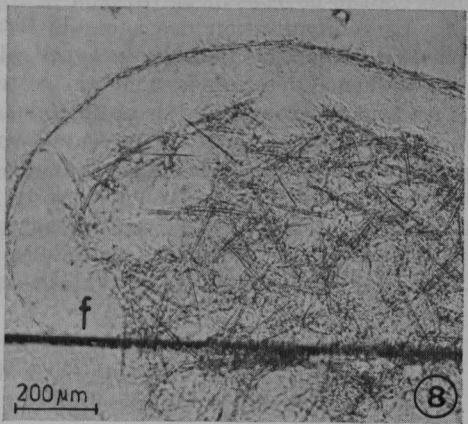
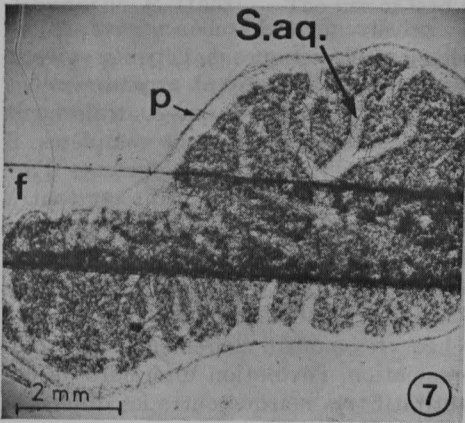
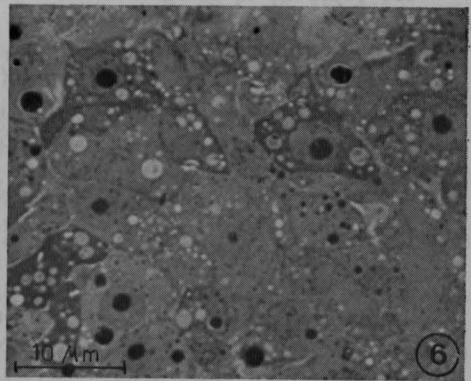
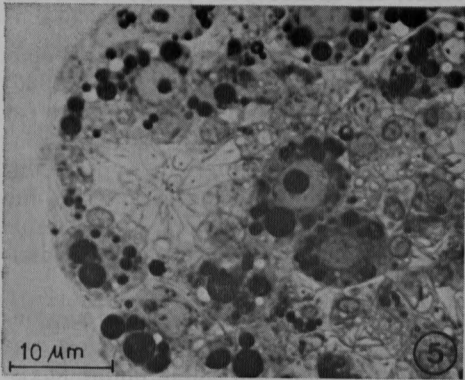
Les déplacements cellulaires individuels aboutissent à la reconstitution de tissus impliquant une reconnaissance réciproque des différents types cellulaires.

Un ensemble de travaux antérieurs axés sur l'étude des phénomènes de rejet allogénique (c'est-à-dire entre individus de la même espèce) et xénogénique (c'est-à-dire entre individus d'espèces différentes), nous a montré que les éponges reconnaissent le « soi » et l'acceptent, tandis qu'elles rejettent sans discrimination tous les « non soi » (VAN DE VYVER, 1978).

PLANCHE III

5. — Coupe semi-fine dans un agrégat de 6 heures formé au départ d'une suspension d'éponge non-fractionnée ($G = 1.000$).
6. — Coupe semi-fine dans un agrégat de 6 heures formé au départ d'une suspension d'archéocytes ($G = 1.100$).
7. — Éponge reconstituée à partir d'une suspension non fractionnée, 3 jours après le début de l'aggrégation. L'éponge s'est développée entre lame et lamelle ($G = 9$) f = fente où ont été introduit des agrégats âgés de 24 heures; s. aq. = système aquifère; pi = pinacoderme.
8. — Éponge reconstituée entre lame et lamelle à partir d'agrégats formés au départ de suspensions d'archéocytes, 3 jours après le début de l'aggrégation ($G = 35$). Sp. = spicules; f = fente où ont été introduit des agrégats âgés de 24 heures.
9. — Détail de 7 ($G = 35$).
10. — Détail de 8 ($G = 35$).

PLANCHE III



BIBL. UNIV.
GENT

La reconnaissance de cellules de types différents, mais appartenant au même individu, pourrait se faire suivant le même principe.

Au cours de la réorganisation de l'agrégat, les archéocytes phagocytent des débris cellulaires et des cellules saines, en particulier des choanocytes.

Si la phagocytose de débris cellulaires traduit clairement un phénomène d'épuration du même type que celui qui a été décrit par BOROJEVIC et LÉVI (1964, 1965) chez *Ophlitaspongia seriata*, la signification de la phagocytose de cellules saines est moins évidente. Toutefois, si l'on tient compte du fait que l'agrégation est un regroupement aléatoire de cellules, l'équilibre quantitatif entre les différents types cellulaires au sein d'un agrégat peut s'écarter sensiblement de celui qui caractérise une éponge fonctionnelle (BUSCEMA et VAN DE VYVER, 1978). Dès lors, tout semble indiquer que la phagocytose de cellules saines correspond à un rééquilibrage quantitatif harmonieux de ces populations.

L'importance de la phagocytose lors de la reconstitution d'éponges fonctionnelles à partir d'agrégats montre clairement, que cette reconstitution n'est pas limitée à un simple regroupement structuré de cellules, mais qu'elle implique l'existence de mécanismes de régulation.

La réorganisation des agrégats formés exclusivement d'archéocytes s'amorce par la différenciation des divers types cellulaires caractéristiques de l'éponge suivant une séquence déterminée. Pendant cette phase, les cellules restent arrondies; elles n'émettent ni pseudopodes, ni filopodes, ce qui semble indiquer que contrairement à ce qui se passe dans les agrégats formés au départ de suspensions complètes, il n'y a guère de déplacements cellulaires. Par ailleurs, l'évolution des agrégats d'archéocytes se distingue par l'absence de phagocytose. Ce comportement est tout à fait cohérent avec le fait que les agrégats d'archéocytes ne contiennent que des cellules saines et que toutes les cellules se différenciant « de novo », le problème de l'équilibre quantitatif entre populations cellulaires se pose en termes de néomorphogenèse.

Si l'évolution précoce des agrégats d'archéocytes montre clairement leur caractère totipotent du point de vue de la différenciation, l'évolution ultérieure de ces agrégats fait apparaître un déséquilibre quantitatif très marqué entre les différents types cellulaires.

En effet, l'éponge fonctionnelle formée au départ d'archéocytes purifiés se singularise par une extension exagérée du pinacoderme, une hypersécrétion de spicules et une réduction massive du nombre de chambres choanocytaires. La différenciation d'archéocytes isolés à partir d'une éponge fonctionnelle se distingue donc nettement de la différenciation d'archéocytes gemmulaires. Ceux-ci en effet, à l'éclosion de la gemmule, donnent naissance à un organisme qui reflète un équilibre harmonieux entre les différentes populations cellulaires, tandis que les archéocytes issus d'éponges adultes semblent avoir perdu partiellement le contrôle de l'orientation de leur différenciation. La production exagérée de certaines structures telles que les spicules suggère que les archéocytes isolés à partir d'éponges adultes n'expriment plus qu'une partie de leur programme génétique.

RÉFÉRENCES

- BOROJEVIC, R. et LEVI, C. (1964) — Étude au microscope électronique des cellules de l'éponge : *Ophlitaspongia seriata* (Grant) au cours de la réorganisation après dissociation. *Z. Zellforschung*, **64**, 708-725.

- BOROJEVIC, R. et LEVI, C. (1965) — Morphogenèse expérimentale d'une éponge à partir de cellules de la larve nageante dissociée. *Z. Zellforschung*, **68**, 57-69.
- BRIEN, P. (1937) — La réorganisation de l'éponge après dissociation par filtration et phénomènes d'involution chez *Ephydatia fluviatilis*. *Arch. Biol.*, **48**, 185-268.
- BUSCEMA, M. et VAN DE VYVER, G. (1978) — Étude ultrastructurale de l'agrégation des cellules dissociées de l'éponge *Ephydatia fluviatilis*. In : *Biologie des Spongiaires*, Éd. CNRS, Paris, **291**, 225-232.
- DE SUTTER, D. et BUSCEMA, M. (1977) — Isolation of a highly pure archeocyte fraction from the fresh-water sponge *Ephydatia fluviatilis*. *Wilhelm Roux's Arch.*, **183**, 149-153.
- FAURE-FREMIET, E. (1932) — Morphogenèse expérimentale (restitution) chez *Ficulina ficus*. *Arch. Anat. Microscop.*, **28**, 1-80.
- GALTISOFF, P. S. (1925) — Regeneration after dissociation. II. Histogenesis of *Microciona prolifera* Verr. *J. Exp. Zool.*, **42**, 223-251.
- HUXLEY, J. S. (1911) — Some phenomena of regeneration in Sycon. *Phil. Trans. Roy. Soc. B. London*, **202**, 165-189.
- RASMONT, R. (1961) — Une technique de culture des éponges d'eau douce en milieu contrôlé. *Annls. Soc. r. zool. Belg.*, **91**, 147-156.
- REYNOLDS, E. (1963) — The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **17**, 208-213.
- SPURR, A. R. (1969) — A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultras. Res.*, **26**, 31-43.
- VAN DE VYVER, G. (1970) — La non-confluence intraspécifique chez les spongiaires et la notion d'individu. *Ann. Embryol. Morph.*, **3**, 251-262.
- VAN DE VYVER, G. (1978) — Cellular mechanisms of recognition and rejection among sponges. In *Biologie des Spongiaires*. Éd. CNRS, Paris, **291**, 195-204.
- WILSON, H. V. (1907) — On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *J. exp. Zool.*, **5**, 245-258.
- WILSON, H. V. (1911) — Development of sponges from dissociated tissue cells. *Bull. U.S. Bureau of Fisheries*, **30**, 1-30.

Study of spontaneous contractile waves
in the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis*
cultivated in vitro

SUMMARY

This work analyzes the periodicity and the morphology of spontaneous wave contractile reactions that appear in young *Ephydatia fluviatilis* cultivated under controlled conditions.

The laws of periodicity in the contractile waves and the persistence of their length are shown by accelerated time lapse cinematography.

The rate of propagation waves is slow, about 0.008 cm/sec.

TEM and SEM studies conducted parallelly with cinematography reveal the main part taken by two cell types in contraction: pinacocytes and choanocytes.

Pinacocytes of the dorsal membrane and the contractile vacuole appear to be the contraction wave conducting cells. Choanocytes completely distended and the flagellar beating of which is stopped, are responsible for a part of the large distension of the contractile vacuole and the arrest of the feeding current.

The spontaneous character of contractile waves spreading in sponges cultivated under constant medium conditions suggests that contractions are induced by internal stimuli.