



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Les réactions de défense cellulaires chez le crabe *Carcinus Maenas* L (crustacé décapode brachyoure) in vivo et in vitro

Delvaux, Michèle

Award date:
1976

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

1976



FACULTES UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX.

NAMUR

FACULTE DES SCIENCES

LES REACTIONS DE DEFENSE CELLULAIRES CHEZ
LE CRABE CARCINUS MAENAS, L.
(CRUSTACE DECAPODE BRACHYOURE)
IN VIVO ET IN VITRO

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

MICHELE DELVAUX
Année académique 75-76

Je voudrais adresser mes plus sincères remerciements à tous ceux qui m'ont aidée dans l'élaboration de ce travail. Tout d'abord à Monsieur le Professeur A. Bauchau, qui en est le promoteur. Son optimisme, sa compétence et sa bonne humeur ont été pour moi un stimulant constant. Et je n'oublie pas les nombreux trajets de Namur à la Côte, dont quelques-uns même furent infructueux, qu'il a consentis à faire gracieusement afin que la réserve de crabes soit toujours pourvue.

Que Madame Elisabeth Passelecq et Mademoiselle Marie-Bernadette De Brouwer trouvent également ici l'expression de ma profonde reconnaissance; elles m'ont apporté leur aide compétente et dynamique dans la partie expérimentale de ce mémoire.

Je ne voudrais pas passer sous silence Madame Nicole Fiévet ni Messieurs Jacques Collet et Yves Houbion de l'Unité Interfacultaire de Microscopie Electronique qui m'ont permis d'illustrer cette étude.

Enfin, merci de tout coeur à Mademoiselle Gyselle Detroye et à Monsieur Paul Peters qui, par leur gentillesse et leur empressement ont contribué à la réalisation de ce texte.

P L A N

Introduction	1
Chapitre 1 : <u>Les hémocytes et la coagulation de l'hémolymphe</u>	6
Chapitre 2 : <u>La phagocytose</u>	15
Chapitre 3 : <u>L'encapsulation, la mélanisation et la formation de nodules</u>	24
I. Encapsulation in vivo	27
II. Encapsulation in vitro	35
III. Réaction à la Sacculine	36
IV. Formation de nodules	38
V. Discussion générale	40
Résumé	46
Bibliographie	48

INTRODUCTION

L'immunité comprend l'ensemble des réactions de défense mises en oeuvre lors d'une confrontation entre les tissus internes d'un organisme (le "soi") d'une part et un corps étranger macromoléculaire (le "non soi") d'autre part. Il s'agira par exemple de parasites, de cellules ou de tissus, de grosses molécules comme les acides nucléiques, les protéines, les polysaccharides ou une combinaison de ces corps.

Chez les vertébrés, les réactions immunologiques se présentent sous trois modalités fondamentales : 1) la réaction inflammatoire ou immunité tissulaire, relevant en ordre principal des mastocytes et des granulocytes; 2) l'immunité cellulaire déclenchée par les lymphocytes T et visant à détruire les cellules et tissus étrangers; 3) l'immunité humorale résultant de la sécrétion d'anticorps ou immunoglobulines par les lymphocytes B.

Les invertébrés en général, et les Arthropodes en particulier, ne disposent pas d'une gamme réactionnelle aussi différenciée.

Les dangers d'infection qui menacent les Arthropodes ne sont cependant pas moindres que ceux courus par les vertébrés. La multiplicité des habitats terrestres et aquatiques qu'ils occupent, la diversité de leur régime alimentaire les exposent en fait aux intrusions d'une énorme variété de parasites : virus, bactéries,

champignons, protozoaires, plathelminthes, némathelminthes, insectes et crustacés.

Quelques unes de ces infections affectant les Crustacés sont connues depuis longtemps. Certaines d'entre elles ont fait l'objet d'un examen détaillé plus récemment.

L'invasion du crabe Carcinus maenas, L. par le crustacé cirripède rhizocéphale, Sacculina carcini, en fournit un bon exemple. (Veillet, 1945).

L'épizootie de "peste" qui s'est abattue sur les populations d'Astacus en Europe occidentale, à la fin du 19ème siècle, a entraîné la disparition de cette écrevisse en de nombreuses régions. Elle résulte de la multiplication, dans le sang, du Bacillus pestis astaci (André, 1960).

Les protozoaires comptent de nombreux parasites de Crustacés, tels les microsporidies du genre Thelohania qui infestent les amphipodes Gammarus, les crevettes Leander et le crabe Carcinus maenas (Perez, 1904). On peut citer aussi les ciliés du genre Anophrys qui envahissent le sang et les tissus du crabe Carcinus maenas (Bang, 1967); Pediococcus homari, agent étiologique de la gaffkémie chez les homards Homarus vulgaris et Homarus americanus ainsi que chez la langouste Panulirus interruptus (Rabin, 1970); les amibes marines Paramoeba sp, qui provoquent la "maladie du crabe gris" chez le crabe bleu Callinectes sapidus... et bien d'autres encore (Vivarès, 1972-73).

Les deux embranchements d'helminthes parasitent également un nombre important de Crustacés. Déjà von Baer (1827) découvrait chez Astacus des kystes d'un Trématode, le Distomum Astracotrema cirrhigerum. Des cysticerques de Cestodes parasitent un certain nombre de Brachyoures et aussi les écrevisses Astacus : il s'agit de l'Hymenolepis tenuirostris Rud. et de l'Aploparaksis cirrosa Korabbe (André, 1960). De même, le crabe Carcinus maenas héberge un Némertien Carcinonemertes carcinophila (Vivarès, 1972-73).

L'invasion de certaines moisissures a été récemment réétudiée par Unestam et ses collaborateurs (1970-72) chez Astacus

astacus : il s'agit du champignon Aphanomyces astaci.

Les viroses par contre n'ont été identifiées que rarement et cela dans un passé très proche par Vago (1966) et Bonami et al. (1971) sur Macropipus depurator.

Pour conjurer ces menaces toujours présentes, les Crustacés bénéficient de certaines protections passives mais aussi de certains mécanismes de défense active.

L'exosquelette constitue une première barrière. Il est formé de chitine (polymère de l'acétyl glucosamine), de protéines tannées et d'une mince couche de cire. Il assure ainsi une première protection contre l'invasion d'organismes étrangers; l'isolement relatif qu'il apporte diminue notablement la perméabilité superficielle et donc l'entrée de matériaux externes solubles.

Le tube digestif constitue une autre barrière. Les sucs détruisent rapidement un grand nombre de microorganismes introduits dans le tractus alimentaire avec la nourriture. L'intestin enrobe également les résidus non assimilables dans une sorte de sac chitineux ou membrane péritrophique qui empêche la dissémination des parasites non détruits et assure leur élimination rapide (Orihel, 1975).

Malgré toutes ces défenses, certains parasites parviennent à s'implanter dans l'hémocoèle; ils s'y multiplient ou y grandissent en puisant généralement dans le sang les éléments nécessaires à leur croissance. De là, ils peuvent gagner les tissus et provoquer des perturbations plus ou moins graves, parfois mortelles, dans le fonctionnement des organes.

Les Arthropodes ne subissent pas passivement ces invasions mais mettent en oeuvre de nombreux moyens de lutte. Les réponses sérologiques, contrairement à celles des vertébrés, sont peu spécifiques. Elles n'impliquent pas la formation de véritables anticorps.

Par contre, l'intervention des cellules sanguines ou hémocytes est générale. Elle rappelle à certains égards celle des leucocytes de vertébrés. C'est pourquoi il est légitime de parler d'immunité cellulaire ou de réactions de défense cellulaires.

En fait, ces réactions ont surtout été étudiées chez les Insectes. Salt (1970) a publié une revue générale des résultats actuellement obtenus dans cette classe d'Arthropodes.

Quatre modalités d'intervention peuvent être distinguées : la phagocytose, l'encapsulation, la formation de nodules et l'élimination des toxines.

Les trois premiers points feront l'objet d'une étude plus approfondie dans les chapitres qui suivent. En ce qui concerne l'élimination des toxines, nous ne pouvons que reprendre les constatations faites par Salt (1970) sur les Insectes.

"Certains organismes libèrent des toxines dans le sang de leur hôte. Les substances toxiques peuvent être changées en composés moins nocifs grâce à des procédés biochimiques connus sous le nom de "détoxification" et qui sont réalisés par certaines cellules. Les toxines sont éliminées du sang, soit directement, soit sous une forme moins nocive, par les cellules des tubes de Malpighi (excrétion). Mais parfois, certaines substances toxiques sont stockées au lieu d'être éliminées : cette "ségrégation" réalisée par les cellules du péricarde et, dans certaines circonstances, par les cellules des tubes de Malpighi, constitue, en quelque sorte, un mécanisme de défense cellulaire."

Chez les Crustacés, nos connaissances sont beaucoup moins avancées et ne reposent encore que sur un nombre limité de travaux, dont certains sont trop anciens pour bénéficier des techniques modernes d'investigation (Hardy, 1892; Nolf, 1909; Tait, 1911; Tait et Gunn, 1918; Toney, 1958).

Le but de notre travail est précisément de faire le point des résultats acquis et d'analyser de manière plus systématique certains aspects des processus réactionnels des hémocytes.

Il sera possible alors de les comparer à ceux qui ont été identifiés chez les Insectes et de dégager ainsi l'unité éventuelle des réactions de défense cellulaires dans l'embranchement des Arthropodes. Nous y ajouterons certaines données obtenues récemment chez les Mollusques, de telle sorte qu'une image globale de l'immunité des Invertébrés pourra être esquissée.

CHAPITRE I. LES HEMOCYTES ET LA COAGULATION
DE L'HEMOLYMPHE

INTRODUCTION

Les cellules sanguines ou hémocytes de Carcinus maenas sont impliqués, notamment, dans la coagulation de l'hémolymphe, dans la cicatrisation des blessures et dans la défense vis-à-vis des parasites internes.

Lorsque l'hémolymphe est exposée à l'air ou au contact du verre, les hémocytes s'agglutinent et provoquent une gélification plus ou moins complète du plasma. La coagulation de l'hémolymphe repose donc sur deux processus distincts : l'agglutination des hémocytes et la gélification du plasma.

MATERIEL ET METHODES

Pour suivre les différentes étapes de la coagulation nous utilisons des chambres de Bürker, dans lesquelles nous introduisons l'hémolymphe, telle quelle ou mélangée à de l'EDTA (5 % pH 7), en proportions égales. L'observation se fait directement au microscope optique.

Certaines solutions nous ont permis de tester la stabilité morphologique des hémocytes. Il s'agit de l'EDTA (éthylène diamine tétra-acétate) à 5 % et à pH 7, de tampons phosphates 0,1 M de pH variable (allant de 2 jusqu'à 7) contenant 3,8 % NaCl, de

l'AMP cyclique sous forme sodique ou non, à une concentration de 10^{-2} M, dissous dans un tampon PO_4 0,1 M, à pH 7,2 avec 3,8 % de NaCl. Ces différentes solutions sont ajoutées à l'hémolymphe dans un rapport 1/1.

Les hémocytes sont alors examinés au microscope optique; et au microscope électronique (Philips EM 201), selon les techniques de fixation et d'inclusion habituelles, préconisées par M.F. Ronveaux (cours sur les techniques d'analyse en morphologie, 1975).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1. Les hémocytes

Nous pouvons distinguer trois principaux types de cellules :

a) des hémocytes hyalins

petites cellules, rondes ou ovales, de 8μ sur 6 , dont le noyau seul est visible, pratiquement, au microscope optique. Ce noyau est généralement central et son diamètre est de 5μ environ. Dans le cytoplasme, on trouve quelques granules faiblement opaques aux électrons, à texture homogène, mesurant $0,2$ à $0,5 \mu$.

b) des hémocytes semi-granuleux

cellules ovales ou fusiformes, relativement plus grandes que les précédentes. Le cytoplasme renferme plusieurs granules denses, sphériques ou fusiformes, allant de $0,2$ à $1,5 \mu$.

c) des granulocytes

cellules ovoïdes, de 13μ sur 7 , bourrées de gros granules réfringents au microscope optique et très opaques au microscope électronique.

Dans les granules fusiformes, on observe parfois une formation centrale d'apparence cristalloïde. Les granules sphériques ont une texture homogène; leur diamètre varie entre $0,3$ et $2,6 \mu$.

2. La coagulation de l'hémolymphe

L'agglutination se fait entre hémocytes contigus, par contact direct, étalement et étirement de la masse cytoplasmique.

Les cellules hyalines et semi-granuleuses réagissent les premières : une minute après le prélèvement, des boursouflures soulèvent le plasmalemme en maints endroits de la périphérie; elles s'élargissent, deviennent des vésicules qui disparaissent pour se reformer bientôt. Quand ces vésicules "explosent", les hémocytes semblent se vider de leur cytoplasme : tout se passe donc comme si une substance cytoplasmique était libérée dans le plasma.

En même temps, les cellules s'étalent de plus en plus sur le support : elles émettent des expansions cytoplasmiques qui envoient, à leur tour, des prolongements très effilés, en forme d'aiguilles. Ces pseudopodes ou "filipodes" s'allongent, assurent le contact avec d'autres cellules plus éloignées : c'est l'agrégation, qui se généralise 5 minutes après le prélèvement.

Pendant ce temps, les granulocytes interviennent aussi : après 3 minutes environ, ils réagissent de manière analogue. Au bout de 10 à 15 minutes les granules commencent à disparaître; après une demi-heure d'observation, le cytoplasme des cellules est véritablement transparent.

Chez Carcinus maenas, la gélification du plasma n'est que partielle. Un caillot mou, blanchâtre, se forme en moins de 5 minutes, ce caillot n'est pas "consolidé" par la suite.

Nous avons réalisé ensuite une série de tests en vue d'examiner l'action, sur les cellules sanguines, et plus spécialement au niveau des membranes, de l'EDTA, de l'AMP cyclique sous forme sodique ou non et de différents tampons phosphates.

L'EDTA qui est chélateur du calcium ionisé empêche l'agglutination et la formation d'un précipité finement granuleux. Donc, le calcium ionisé joue un rôle déterminant dans la genèse du caillot. De même, l'AMP cyclique sous forme d'acide libre main-

tient les cellules sanguines, plus longtemps encore que l'EDTA. Par contre, le 3'-5' AMP sous forme de sel sodique est nettement moins bon : la coagulation de l'hémolymphe n'est pas bloquée mais seulement un peu retardée. Il est vrai que dans cette dernière molécule, les groupements acides sont bloqués par des ions sodium. Or, ces charges négatives pourraient bien intervenir en neutralisant des radicaux ou du moins des ions positifs, comme le calcium.

Dans toutes les expériences, l'AMP cyclique était dissous dans un tampon phosphate. Nous nous sommes demandés s'il n'avait pas lui aussi un rôle et si oui, de quel genre. Il s'est avéré que le tampon, à lui tout seul, est aussi efficace et même, en général, meilleur. Nous avons alors voulu préciser la gamme de pH qui se révélait la plus favorable.

A pH 2 : les protéines précipitent au point de masquer les cellules; l'observation est impossible.

A pH 3 : il n'y a plus qu'un léger précipité; mais, très tôt, les hémocytes émettent des prolongements et s'agglutinent.

A pH 4 : les amas sont encore relativement nombreux; les cellules prennent la forme de fuseaux. Après 10 minutes environ, des digitations apparaissent.

A pH 5 : les hémocytes ne se déforment que rarement et lentement. Les cellules hyalines sont "en fuseau" avec un prolongement cytoplasmique très court à chaque pôle. Les granulocytes restent bien ronds pendant plus d'une heure.

A pH 6 : les hémocytes se maintiennent, les uns en fuseau, les autres arrondis pendant une bonne demi-heure. Puis les cellules se déforment et s'agglutinent.

A pH 7 : des amas se forment presque immédiatement.

Les pH compris entre 5 et 6 semblent donc convenir le mieux lorsqu'il s'agit de bloquer le processus de coagulation.

Notre dernier test a été de séparer les cellules sanguines du plasma (par centrifugation à 3.500 r.p.m pendant 2 minutes) afin de départager le rôle de l'un et des autres. Pour cette dernière expérience, nous avons utilisé, comme précédemment, différents tampons phosphates, compris dans la même gamme de pH. Les pH compris

entre 5 et 6 se sont avérés les plus efficaces mais toutes les cellules sont déformées, bien avant 30 minutes, sans le plasma. Un ou des facteurs plasmatiques interviendraient donc dans le maintien de la morphologie hémocytaire.

DISCUSSION

Les trois types d'hémocytes présents chez Carcinus maenas se retrouvent également chez Eriocheir sinensis, un autre crustacé décapode brachyoure, étudié par Bauchau et De Brouwer (1972) et chez l'écrevisse Orconectes virilis (Wood, Podlewski et Shenk, 1971).

Dans les publications plus anciennes, différents noms ont été utilisés pour désigner, en fait, un même type de cellules. Jones (1962) a tenté de regrouper toutes ces dénominations et résume comme suit les différentes classes d'hémocytes qui existent chez les Arthropodes en général.

1. Prohémocyte : cellule souche
 - = amibocyte I de Cuénot (1895)
 - = leucocyte hyalin I de Kollmann (1908)
 - = lymphocyte de George et Nichols (1948)
 - = cellule hyaline de Wood et Visentin (1967)
 - = probablement thigmocyte hyalin de Tait (1918)
 - = cellules hyalines de Carcinus

2. Plasmocyte = amibocyte II de Cuénot (1895)
 - = leucocyte hyalin II de Kollmann (1908)
 - = amibocyte de George et Nichols (1948)
 - = thigmocyte de Dall (1964)

3. Hémocyte granulaire = leucocyte granulaire de Kollmann (1908)
 = granulocyte amiboïde de George et Nichols (1948)
 = granulocytes et hémocytes semi-granuleux de Carcinus
4. Cystocyte = corpuscule explosif de Hardy (1892)
 = amibocytes III et IV de Cuénot (1895)
 = leucocyte granulaire orthochromatique de Kollmann (1908)
 = granulocyte réfringent de George et Nichols (1948)
 = granulocyte à petits granules réfringents de Wood et Visentin (1967)
 = coagulocyte de Grégoire (1964)
 = cellules hyalines et hémocytes semi-granuleux de Carcinus
5. Oenocytoïde = oenocytoïdes des insectes (Jones, 1962)
 = oenocytoïdes des mille-pattes (Ravindranath, 1973)
6. Cellule "sphérule" = cellule protéique de Cuénot (1895)
 = basophile de Hardy (1892)
 = cellule sphéruleuse de Kollmann (1908)
 = granulocyte réfringent de Toney (1958)
 = granulocyte à gros granules réfringents de Wood et Visentin (1967)
 = granulocytes de Carcinus
7. Adipohémocyte = grand amibocyte granulaire de Dall (1964)

Tait (1911) décrivait, chez les crustacés, trois types de coagulation : type A : simple agglutination sans gélification du plasma
 type B : agglutination et gélification totale du plasma
 type C : formation d'un gel limité initialement au pourtour des hémocytes puis gélification plus complète.

Récemment, Bauchau et De Brouwer (1972) se sont repenchés sur le problème. Ils ont pu ainsi attribuer le type B à Eriocheir sinensis, Carcinus maenas se situe entre les types B et A, la gélification du plasma n'est que partielle, mais elle a lieu.

C'est chez l'écrevisse Astacus sp que Hardy (1892) découvrait les "corpuscules explosifs". Il les décrit comme des cellules fusiformes qui, au contact d'une surface étrangère non grasse, se contractent en une sphère. Aussitôt, des expansions cytoplasmiques fusent de partout et les cellules prennent un aspect épineux. Ce processus prend fin avec la cytolyse et la libération d'une substance analogue à la ehzomiline (fribin-ferment), qui provoque la coagulation du plasma et la lyse des autres corpuscules explosifs.

Depuis, des phénomènes comparables ont été décrits notamment par Wood, Podlewski et Shenk (1971) sur Orconectes virilis et par Bauchau et De Brouwer (1972) sur Carcinus maenas et Eriocheir sinensis. Les trois types d'hémocytes interviennent, soit en se vidant de leur cytoplasme, soit en perdant progressivement leurs granules. Chez Eriocheir, comme chez Orconectes, la gélification du plasma est totale : un caillot mou se forme en 3 minutes. Après 3 ou 5 minutes, il se forme chez Orconectes un système à deux phases : un caillot semblable à un gel mou, entouré d'un fluide plus aqueux (Wood, Podlewski et Shenk, 1971).

Quelle est la nature du matériel libéré par les cellules hyalines et granuleuses ? Wood, Podlewski et Shenk (1971) ont réalisé une série de tests cytochimiques et ont mis en évidence, par métachromasie induite, la présence d'un matériel muco- ou glycoprotéinique dans le plasma, lors de la coagulation. "Une glycoprotéine ou une mucoprotéine (un mucopolysaccharide neutre ?) est libérée par explosion des vésicules des cellules hyalines dans le plasma." Les granules des granulocytes participent aussi à une phase secondaire de la coagulation (réaction plus tardive et plus lente); ils contiennent d'autre part en majorité des mucopolysaccharides neutres (Bauchau et al. 1975).

Deux hypothèses différentes ont été proposées pour expliquer la gélification du plasma.

- Les hémocytes secrètent un ferment (le "fibrin-ferment" de Hardy ou la coaguline de Nolf) qui convertit un précurseur plasmatique, analogue au fibrinogène, et détermine ainsi l'apparition du gel. Duchâteau et Florkin (1954), Stewart et al (1966) ont isolé du "fibrinogène" dans le plasma du homard.

- La substance qui compose le gel proviendrait des hémocytes eux-mêmes (Bang, 1971; Solum, 1970).

Wood a essayé d'identifier un facteur plasmatique, semblable au fibrinogène de mammifère, chez l'écrevisse Orconectes virilis. Elle n'a trouvé aucune protéine ayant les caractéristiques chimiques ou fonctionnelles de ce précurseur, de plus les bandes électrophorétiques du plasma et du sérum sont identiques. Stutman et al (1968) font la même constatation chez le crabe Gecarcinus lateralis.

Nous avons vu que l'EDTA empêchait la coagulation de l'hémolymphe. Selon Bauchau et De Brouwer (1972), il est fort probable que l'agglutination résulte de la formation, par sécrétion cellulaire, d'un gel circonscrit au départ à la périphérie cellulaire; ce gel permet l'adhérence des hémocytes. Puis, au fur et à mesure que les vésicules se vident dans le plasma, le gel s'étend. Il apparaît que le calcium ionisé déclenche la réaction corticale des cellules, puisque l'EDTA séquestre le calcium et suspend l'agglutination et la gélification.

Les résultats obtenus avec les deux types d'AMP cyclique ne font que confirmer le rôle important joué par le calcium dans la coagulation. De plus, un ou des facteurs plasmatiques semblent indispensables pour assurer la stabilité morphologique des hémocytes et enrayer toutes les étapes ultérieures de la gélification de l'hémolymphe.

De nombreux problèmes restent néanmoins à résoudre nous en évoquerons quelques-uns : quelle est la nature exacte du matériel libéré par les hémocytes durant la coagulation ? S'agit-il d'une glucoprotéine ou de différents types de glycoprotéines pour tous les crustacés ? Comment le tampon PO_4 agit-il pour maintenir les hémocytes fusiformes ? Comment se fait-il que la forme "en fuseau" empêche ou, du moins, freine l'agglutination ? Pourquoi les pH les plus favorables sont-ils acides ?

CHAPITRE II. LA PHAGOCYTOSE

INTRODUCTION

La phagocytose a été observée chez tous les animaux comme moyen de défense immunitaire. Dans le cas des Arthropodes, elle suppose qu'un corps étranger ait réussi à pénétrer dans l'intimité des tissus malgré l'épaisse barrière de l'exosquelette. Le tube digestif constitue dès lors la voie de pénétration la plus facile et la plus habituelle.

Mais toute lésion externe ouvre une brèche dans la muraille protectrice et comporte une menace d'infection. Certains champignons pathogènes réussissent même à percer le revêtement tégumentaire par leurs propres moyens. C'est le cas pour Aphanomyces astaci qui est à l'origine d'une infection grave, souvent fatale, pour l'écrevisse (Unestam et Weiss, 1970).

Très souvent, l'agent infectieux pénètre dans l'hémocoèle et c'est là qu'il sera plus particulièrement exposé à la phagocytose.

Si la réalité du phénomène ne laisse place à aucun doute, le mécanisme opérationnel de la phagocytose n'en est pas complètement élucidé pour autant. Il pose en effet une série de problèmes délicats qui n'ont pas tous reçu de réponses tout à fait satisfaisantes.

Les principales étapes du processus ont été décrites par

Metchnikoff dès 1892. Elles ont été récemment réexposées par Bang (1967) et peuvent être résumées comme suit :

1 - reconnaissance qui peut mener, comme nous l'avons vu au chapitre 1 à l'agglutination puis à la coagulation.

2 - ingestion

3 - digestion et utilisation, ou symbiose, ou destruction par l'agent ingéré.

Cette description s'applique aussi bien à la phagocytose des invertébrés qu'à celle des vertébrés.

Le premier problème est celui de la reconnaissance. Chez les amibes et les cellules sanguines de mammifères, la phagocytose n'a lieu que lorsqu'il y a eu adsorption de la particule à la surface de la cellule phagocytante (Holter, 1965); l'interaction est facilitée et peut-être même nécessairement initiée par la présence de substances inductrices ou opsonines, qui stimulent plus ou moins spécifiquement la réaction de la cellule vis-à-vis de la particule (Newsome, 1967). Chez les Insectes, par contre, ni la nécessité des opsonines, ni leur présence n'a été démontrée (Bang, 1967). Pourtant, d'après Maramorosch et Shope (1975), les caractéristiques de la particule à phagocyter sont très importantes : une altération chimique ou une opsonisation peuvent affecter le taux d'ingestion d'une particule donnée.

L'ingestion, observée au microscope électronique, se déroule, dans le cas des Insectes d'au moins trois façons différentes :

a) formation de vésicules de pinocytose pour englober le liquide contenant les petites particules (Leutenegger, 1967).

b) encerclement des particules par des pseudopodes (Groosley, 1964 et Smith, 1968). C'est le mode d'ingestion utilisé principalement par les cellules des crustacés. Les pseudopodes émis par les hémocytes entourent des gouttelettes d'hémolymphe contenant les particules. Les vacuoles formées de cette manière ont de 1 à 1,5 microns de diamètre (Grimstone, Rotheram et Salt, 1967).

c) ingestion par contact direct et extension de la membrane plasmatique. D'après Grimstone et al (1967), il n'y a pas d'espace visible entre la membrane plasmatique invaginée et la surface de la particule. Déjà en 1937, Rooseboom avait essayé d'expliquer ce phénomène : "Les particules englobées se trouvent d'abord plongées dans le cytoplasme; c'est seulement après qu'elles sont entourées de vacuoles."

La digestion et donc la destruction de l'organisme ou de la substance ingérée constitue très souvent l'étape finale de la phagocytose. Les microorganismes englobés sont généralement détruits : dissolution progressive, immédiatement dans le cytoplasme ou dans les vacuoles formées autour des organismes ingérés (Metalnikov, 1924). Au cours de la digestion, les granulocytes perdent leurs granules. Ces granules ont été décrits chez les Mollusques, comme des lysosomes par Feng et al. (1971) et par Cheng et al. (1974) ou encore comme des phagosomes secondaires par Cheng et Cali (1974). Il faut ajouter que le lysozyme présent dans le sérum de nombreux organismes a son origine dans les cellules sanguines. Dès lors, la dégranulation ou décharge explosive du contenu des granules cytoplasmiques pourrait être, en fait, la manifestation morphologique de la libération d'enzymes protéolytiques dans le milieu (Foley, 1974).

La fonction du lysozyme sérique consiste à neutraliser ou à tuer les microorganismes sensibles qui ont envahi l'hémolymphe mais qui n'ont pas été phagocytés. Elle complète ainsi le rôle de la phagocytose en étendant son résultat final. S'agit-il d'un facteur humoral ?

La symbiose. La digestion n'est pas la seule éventualité qui accompagne la phagocytose. Certains microorganismes peuvent rester vivants dans les hémocytes durant la métarmorphose d'un insecte, jusqu'au stade adulte. Parfois, ils restent non seulement vivants mais continuent à se développer dans les cellules qui les ont ingérés.

La phagocytose peut aussi affecter le phagocyte. L'ingestion de quelques particules inertes n'a aucun effet; mais, quand les cellules sanguines absorbent beaucoup de particules, leur noyau dégénère. Comme Rooseboom (1937) l'a écrit : les phagocytes se désintègrent complètement, libérant les particules dans le sang.

Nous nous sommes intéressés à la phagocytose pratiquée par les hémocytes des Crustacés. L'examen du phénomène *in vivo* étant impraticable, nous l'avons suivi comme tous les auteurs *in vitro*.

MATERIEL ET METHODES

Après avoir sectionné un péréiopode du crabe, nous laissons tomber 5 gouttes d'hémolymphe dans un tube de polyallomère contenant 1,5 ml d'EDTA 5 % pH 7. Après homogénéisation, nous prélevons une goutte de ce mélange et nous la déposons sur une chambre de Bürker, dégraissée. Rapidement, nous posons un couvre-objet et, à l'aide d'une pipette Pasteur, nous introduisons, par capillarité, une goutte de solution de carmin ou de charbon de bois à 1 % dans de l'eau de mer artificielle.

Nous avons aussi observé la phagocytose de levures colorées d'après la méthode de Van Harreveld (1973), dans un tampon PO_4 0,1 M + NaCl 3,8 % de pH 4,35 ou dans de l'EDTA 5 % pH 7.

En vue de voir si l'opsonisation jouait un rôle chez les Crustacés, les cellules de Carcinus sont isolées du plasma par centrifugation à 3.500 r.p.m. pendant 2 minutes environ. Pour cela, nous introduisons une seringue contenant 0,6 ml d'EDTA 5 % pH 7 dans l'articulation d'un péréiopode et nous aspirons 0,3 ml de sang. La seringue est alors vidée dans un tube contenant 1 ml d'EDTA 5 % pH 7. Après centrifugation, les cellules sont remises en suspension dans 0,5 ml d'EDTA 5 % pH 7. Entretemps, on traite le carmin ou le charbon de bois : 0,5 cc de plasma sont mis en présence de la même quantité de carmin ou de charbon actif, à 1 % dans de l'eau de mer artificielle. Une goutte du mélange cellules-EDTA

est déposée sur une chambre de Bürker; par capillarité, on ajoute une goutte de la solution "prétraitée".

La phagocytose est suivie au microscope optique pendant une heure. Les solutions sont maintenues à la température de la glace fondante et examinées aux temps 5, 15, 30 et 60.

RESULTATS

Comme lors de la coagulation, ce sont les hémocytes hyalins et semi-granuleux qui réagissent les premiers. Après 5 minutes environ, les deux types de cellules ont émis des pseudopodes qui encerclent les particules. Les granulocytes font de même, mais au bout d'une heure seulement. A ce moment, nous pouvons dire que sur 100 hémocytes présents dans la préparation, 56 ont ingéré une particule : 28 hyalins, 22 semi-granuleux et 6 granulocytes.

D'une manière générale, le charbon actif suscite plus de réaction de la part des cellules que le carmin. Après un quart d'heure, pratiquement toutes les particules de charbon sont phagocytées par des cellules hyalines et semi-granuleuses. En ce qui concerne le carmin, il faut attendre une heure avant de voir les premières cellules en activité. De même, l'affinité des hémocytes pour les levures est très grande. La nature chimique de la particule à phagocyter semble donc jouer un rôle.

Lorsque nous travaillons dans de l'EDTA à pH 7, le processus s'observe plus ou moins rapidement. Par contre, dans un tampon phosphate à pH 4,35, il ne se passe rien, même après 2 heures. Il semble donc que les pH acides inhibent ou, du moins, retardent considérablement l'ingestion.

Parfois, il ne se produit pas de phagocytose. C'est le cas lorsque les particules à ingérer sont trop grandes (gros grumeaux de charbon de bois). On observe alors une réaction d'agglutination : les granulocytes et les hémocytes semi-granuleux explosent, libérant

leurs granules dans la préparation. Ces granules libres ont tendance à se masser autour des particules et se collent véritablement à elles. Au bout d'une heure environ, des cellules hyalines viennent s'agglutiner à leur tour. Après un quart d'heure, les semi-granuleuses arrivent aussi. Il faut attendre encore deux heures pour voir les granulocytes réagir enfin. Les hémocytes forment alors un manchon lâche autour des particules. Cette agrégation représente-t-elle une tentative de phagocytose ? Il s'agit plus vraisemblablement de la première étape d'une encapsulation, phénomène dont il sera question plus loin.

Apparemment, l'opsonisation ne joue pas. Le taux de particules ingérées et la vitesse de la réaction ne changent guère. S'agit-il d'une erreur d'expérience ? Ou la phagocytose est-elle déjà si rapide par elle-même que l'addition de facteurs plasmatiques semble ne plus avoir d'effet ? Autant de questions qu'il faudrait réexaminer de façon expérimentale.

DISCUSSION

Certains auteurs sont plutôt sceptiques en ce qui concerne la phagocytose, *in vitro*, par les cellules d'insectes. Quand les hémocytes sont confrontés avec les particules *in vitro*, aucune phagocytose n'a lieu (Jones, 1956; Salt, 1970). Au contraire, si les particules sont injectées dans l'insecte *in vivo*, avant de prélever le sang, on peut suivre le processus : comme l'écrit Grégoire en 1951, les cellules sont examinées *in vitro* mais elles ont phagocyté *in vivo*.

Pourtant la phagocytose s'observe réellement *in vitro*, même si elle est plutôt rare. Il ne faut pas oublier que l'on travaille dans des conditions modifiées de pH, de température, d'osmolarité, de composition ionique... De plus, il faut se rappeler que les cellules sanguines examinées sur une lame de verre ont déjà été stimulées; dès lors, leurs propriétés de surface sont modifiées,

du moins d'un côté (Fauré-Fremiet, 1927). Ce seul fait suffit pour réduire la capacité de phagocytose d'une cellule normalement active *in vivo*.

Quoi qu'il en soit chez les Insectes, la phagocytose *in vitro* constitue un phénomène courant chez les Crustacés.

Chez Carcinus maenas, les opsonines ne jouent apparemment aucun rôle. Par contre Mac Kay et al. (1969) et Mac Kay et Jenkin (1970) ont trouvé, chez l'écrevise Parachaeeraps bicarinatus, notamment, des hémagglutinines qui semblent agir comme des opsonines : elles augmentent l'adhérence des particules aux hémocytes et activent la phagocytose.

CONCLUSIONS

Il apparaît donc que tous les types hémocytaires des Crustacés peuvent phagocyter. La différenciation des hyalins en granulocytes n'entraîne pas la perte de cette fonction. La réaction est plus rapide pour les particules de charbon de bois et pour les levures. Les pH acides (4,35) inhibent pratiquement la phagocytose; au contraire, à un pH neutre (7), le processus semble normal et peut-être même un peu accéléré.

Ce qu'il faudrait vérifier par de nouvelles expériences, c'est le rôle éventuel joué par un ou des facteurs plasmatiques dans cette réaction de défense.

Immunité humorale

Les Invertébrés n'ont pas d'anticorps. Il existe cependant des agglutinines et les lysines bactériennes : pour Bang (1962), ce sont des antisomes, analogues aux anticorps. Rabin (1970) et Shapiro (1975) ont approfondi le sujet : les crustacés décapodes reconnaissent les protéines étrangères et les bactéries non pathogènes et les chassent de l'hémolymphe au moyen d'une précipitine. C'est le cas du homard Homarus americanus

confronté à la protéine S.A.B. (sérum albumine bovine). In vitro, l'hémolymphe a une action antibactérienne qui est bactériostatique dans certains cas, bactéricide dans d'autres. Evans et al (1968) ont induit dans l'hémolymphe de la langouste Panulirus argus une bactéricidine active contre Salmonella typhosa.

De même, il existe des hémagglutinines et des hémolysines. Le sérum du crabe des cocotiers Birgus latro contient des hémagglutinines pour tous les érythrocytes humains. Le crabe bleu Callinectes sapidus possède une hémagglutinine pour les globules rouges de poulet et de lapin. Le sérum de Maia squinado renferme une agglutinine qui immobilise le cilié Anophrys magii (Rabin, 1970)...

Chez les vertébrés, les réponses humorales impliquent la prolifération et la différenciation de lymphocytes B qui synthétisent et libèrent des anticorps, les immunoglobulines. L'immunité cellulaire est due aux lymphocytes T qui ne secrètent pas ou peu d'anticorps, mais sont responsables du rejet des greffes de tissus et des réponses d'hypersensibilité (Ada, 1970; Nossal et Ada, 1971).

Deux caractéristiques majeures des réponses immunitaires des vertébrés manquent dans l'immunité des Arthropodes : la spécificité, c'est-à-dire la complémentarité anticorps-antigène et la mémoire immunologique.

Chez un mammifère, un anticorps distinct réagit avec un antigène spécifique; chez un arthropode, ce sont tous les phagocytes ou des facteurs de l'hémolymphe qui réagissent au contact d'un seul corps étranger. La spécificité est donc bien différente.

Se peut-il que les invertébrés aient des facteurs humoraux non spécifiques, capables de remplir le rôle des anticorps ? Salt (1970) pense que si les immunoglobulines ne peuvent être invoquées dans les réactions de défense chez les invertébrés, les mucopolysaccharides, par contre, seraient des candidats plus que probables. Ce point sera développé dans le chapitre suivant.

Il est fort possible qu'un système, originaire des Invertébrés les plus primitifs, basé sur les mucopolysaccharides, ait été transmis aux Arthropodes et aux Vertébrés; mais, chez ces derniers, un système parallèle, basé sur les immunoglobulines, est venu suppléer au manque de spécificité du processus primitif.

CHAPITRE III. L'ENCAPSULATION

INTRODUCTION

L'encapsulation est une réponse impliquant l'agrégation, l'adhésion et l'aplatissement des hémocytes sur des surfaces étrangères trop grandes pour être englouties par des cellules individuelles. Généralement, l'encapsulation s'accompagne d'un dépôt extra- et intracellulaire de mélanine (Salt, 1963 et 1970; Poinar, 1969; Shapiro, 1969; Whitcomb et al, 1974).

Quand elle a lieu, un stimulus doit être communiqué à des milliers de cellules qui se combinent alors, éventuellement, pour former une capsule. Quel est le degré de reconnaissance nécessaire ? Quels sont les stimuli qui vont déclencher les réactions cellulaires ? Pour résoudre de tels problèmes, il est nécessaire de rechercher les réactions à des corps étrangers implantés artificiellement.

MATERIEL ET METHODES

In_vivo

L'encapsulation se fait, expérimentalement, en introduisant dans l'abdomen de différents crabes, un fil de coton ou de soie ou ce qui donne de meilleurs résultats, un cheveu stérile ou

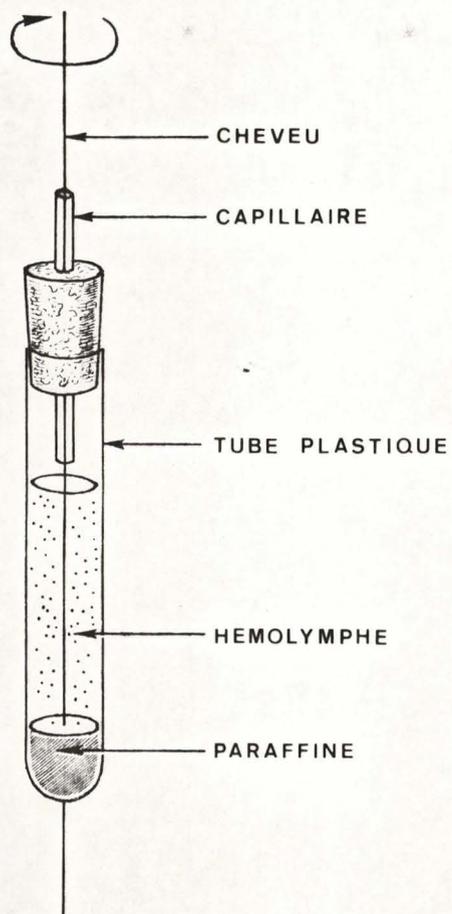


Fig. 1. Montage pour l'examen de l'encapsulation in vitro d'un cheveu par les hémocytes.

non. Les crabes sont alors tués à des temps différents : après 5 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 3 et 10 semaines. Les capsules sont examinées au microscope optique et au microscope électronique.

In vitro

La formation de capsules nécessite un petit "montage". Dans un tube de polyallomère, on introduit à l'aide d'une aiguille, un cheveu plus ou moins long, que l'on fixe avec de la paraffine. On verse alors quelques gouttes de tampon PO_4 0,1 M pH 7,2 - NaCl 3,8 % et la même quantité de sang. Puis, très vite, on referme le tube à l'aide d'un bouchon traversé par un fin capillaire, on colmate les trous avec de la paraffine et on adapte le tout à un appareil rotatif réglé sur une faible vitesse (3).

Les cellules sanguines sont, de ce fait, maintenues en suspension et peuvent continuellement entrer en contact avec le cheveu.

On laisse les hémocytes réagir autour du cheveu pendant 5, 10, 30 minutes, 1 et 4 heures puis on fixe les capsules, directement dans les tubes.

Microscopie optique

Trois types de fixation sont utilisés :

- pour les capsules "in vitro"

glutaraldéhyde 2,5 % dans un tampon PO_4 0,1 M pH 7,2 + NaCl 1,8 %
lavage dans ce même tampon.

- pour des abdomens "entiers" :

formol neutre à 10 %

décalcification pendant une semaine dans une solution à 5,5 % de versène pH 7,2.

- pour des abdomens "sans exosquelette"

liquide de Bouin.

Une fois la fixation terminée, déshydratation dans les différents alcools, clarification par le toluène, inclusion à la paraffine, débitage des pièces et coloration.

Trois type de coloration :

- Trichrome de Masson : mode opératoire préconisé par Goldner (1938)
- coloration régressive par l'hématoxyline de Regaud (1910) avec comme coloration de fond un vert lumière
- Azan de Heidenhaim (1916)

Ces méthodes et colorations sont détaillées et discutées dans les livres suivants : Histochimie normale et pathologique I et II. Ganter et Jollès, 1970. Gauthier-Villars-Paris.

Techniques histologiques. Gabe, 1968.

Masson-Paris.

Remarque : tous les temps préconisés ont dû être réduits de moitié.

Microscopie électronique

Fixation

Glut. 5 % dans un tampon PO_4 0,1 M; pH 7,2 + NaCl 2,04 % .

Lavage dans ce même tampon.

Acide osmique 2 % dans un tampon PO_4 0,15 M pH 7,2 + NaCl 2,04 %.

Lavage dans ce même tampon.

Ensuite, déshydratation, inclusion à l'EPON 812, débitage et coloration.

Coloration

Pour les semi-fines : bleu de toluidine

Pour les coupes sur grilles : citrate de plomb (Reynolds)

acétate d'uranyl 1 %

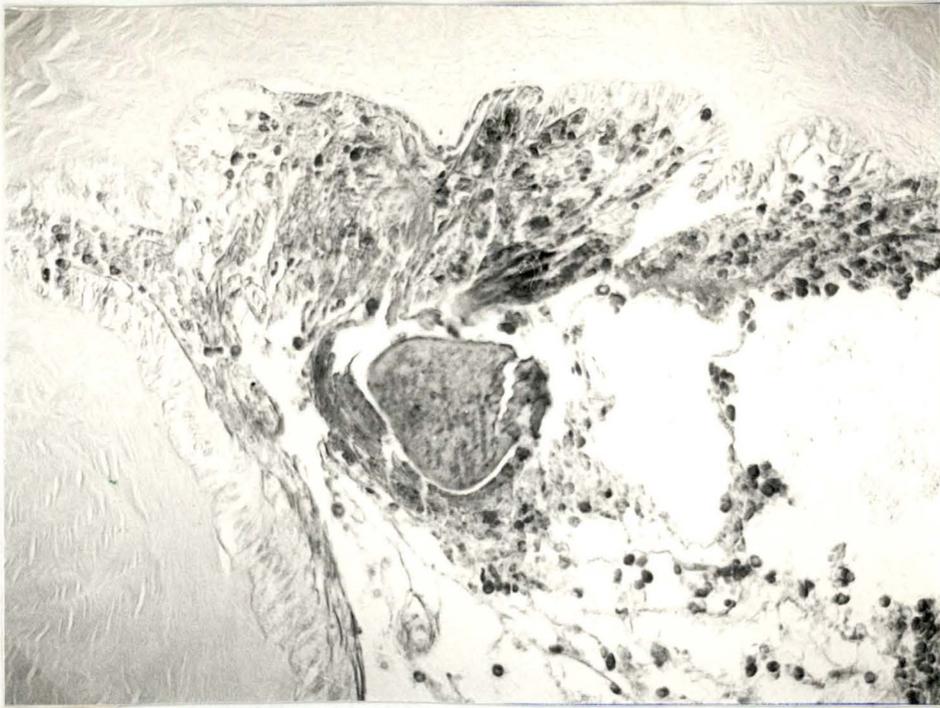


Photo 1. Encapsulation in vivo après 4-5 heures. Le cheveu est entouré par des cellules formant une couche mince, lâche, aux contours mal définis, souvent avec des projections irrégulières. 100 x (Azan de Heidenhain).

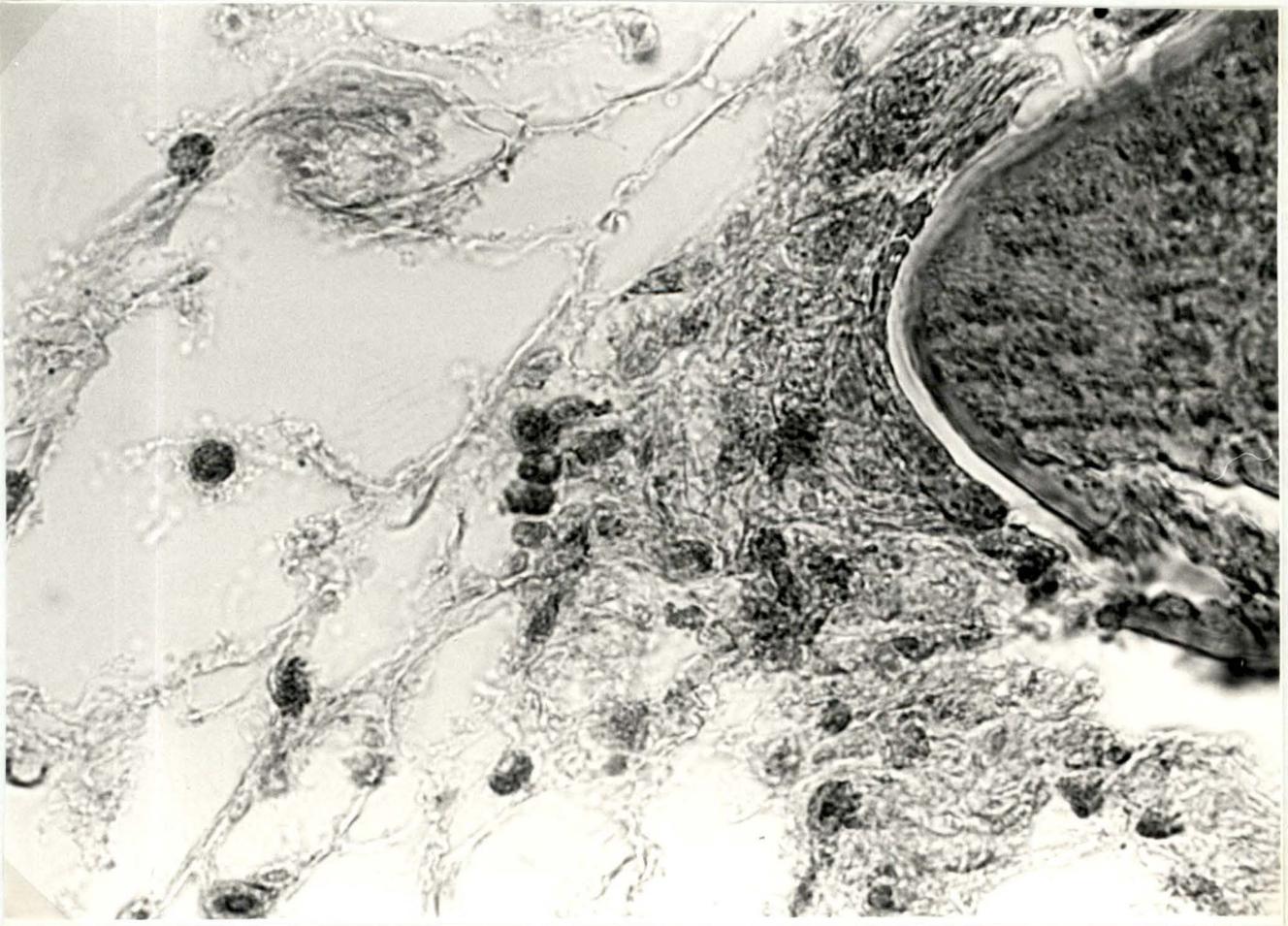


Photo 2. Encapsulation in vivo après 4-5 heures. Les projections irrégulières sont bien visibles. 400 x (Azan de Heidenhain).

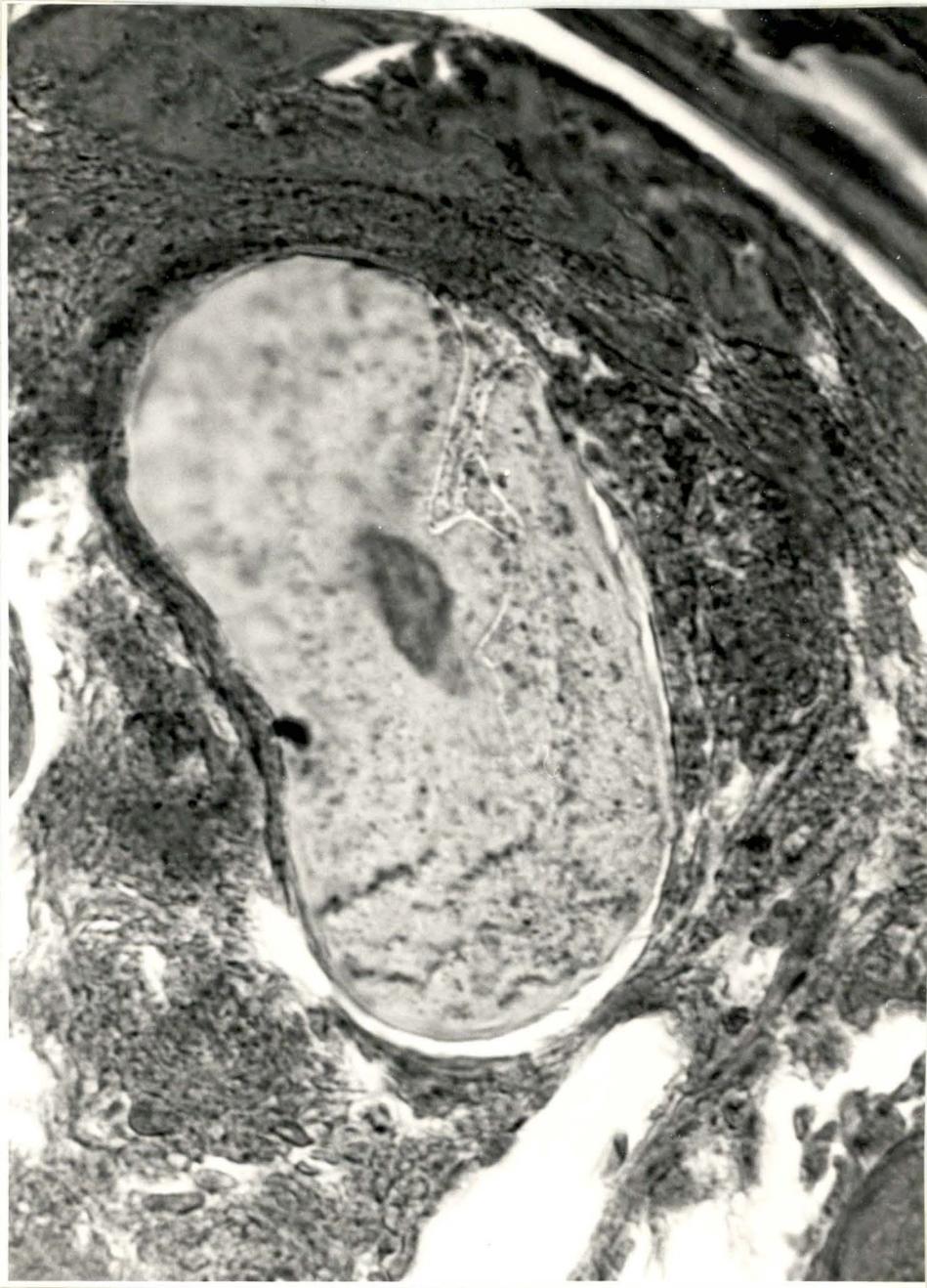


Photo 3. Encapsulation in vivo après 12 heures. La couche d'hémocytes est plus épaisse et plus cohérente. Les cellules les plus externes s'aplatissent déjà. 400 x (Hématoxyline de Regaud).

Le mode opératoire est expliqué dans le cours de T.P. de M.F. Ronveaux : "Techniques d'analyse en morphologie".

Appareils

Philips EM 201 et 301.

RESULTATS

I. Encapsulation in vivo

1. Développement

Bien que le temps nécessaire pour une encapsulation complète soit relativement long, la séquence des événements peut être décrite en examinant les hôtes à des intervalles fréquents.

- Après 4-5 heures : le cheveu se trouve enveloppé par des cellules formant une couche mince, lâche, aux contours mal définis, souvent avec des projections irrégulières (photos 1 et 2).
- Après 12 heures : la couche d'hémocytes est devenue plus épaisse et plus cohérente. Généralement, son pourtour est bien défini et presque régulier. Les cellules les plus externes commencent déjà à s'aplatir (Photo 3).
- Après 24 heures : la capsule est bien consolidée; on peut y compter jusqu'à 50 assises cellulaires (photos 4 et 5).
- Après 48 heures : l'épaisseur est généralement la même, mais la capsule est plus compacte et son tissu qui précédemment était relativement homogène devient "opaque" dans sa moitié interne, plus "transparent" dans sa moitié externe.
- Après 72 heures : les capsules cellulaires sont complètement développées; leur épaisseur est légèrement inférieure à ce qu'elle était auparavant, probablement à cause de la consolidation des cellules (photos 6 et 7).

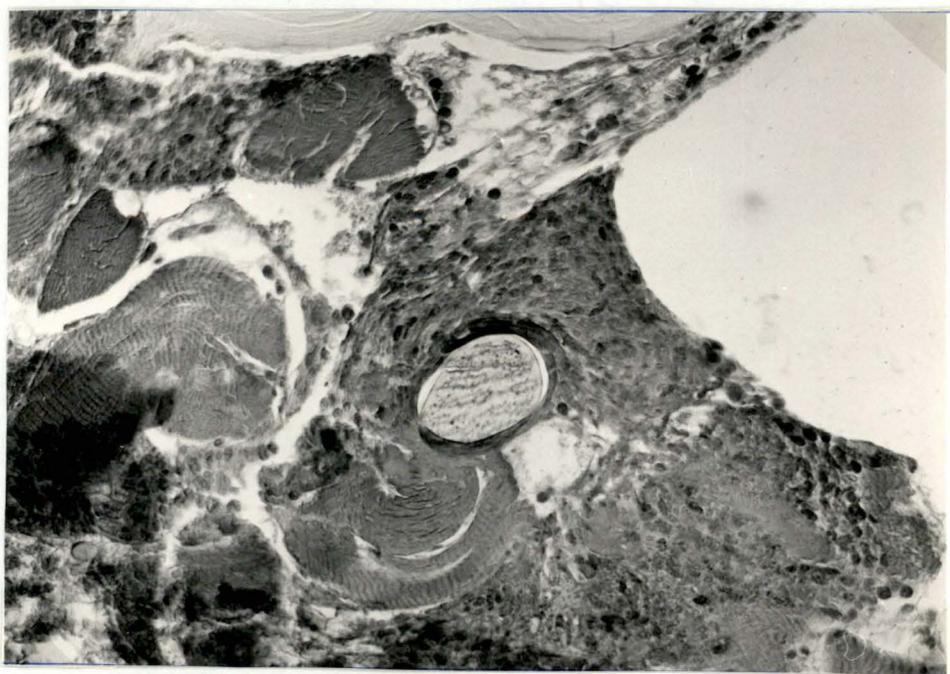


Photo 4. Encapsulation in vivo après 24 heures. La capsule est bien consolidée. 100 x (Hématoxyline de Regaud).

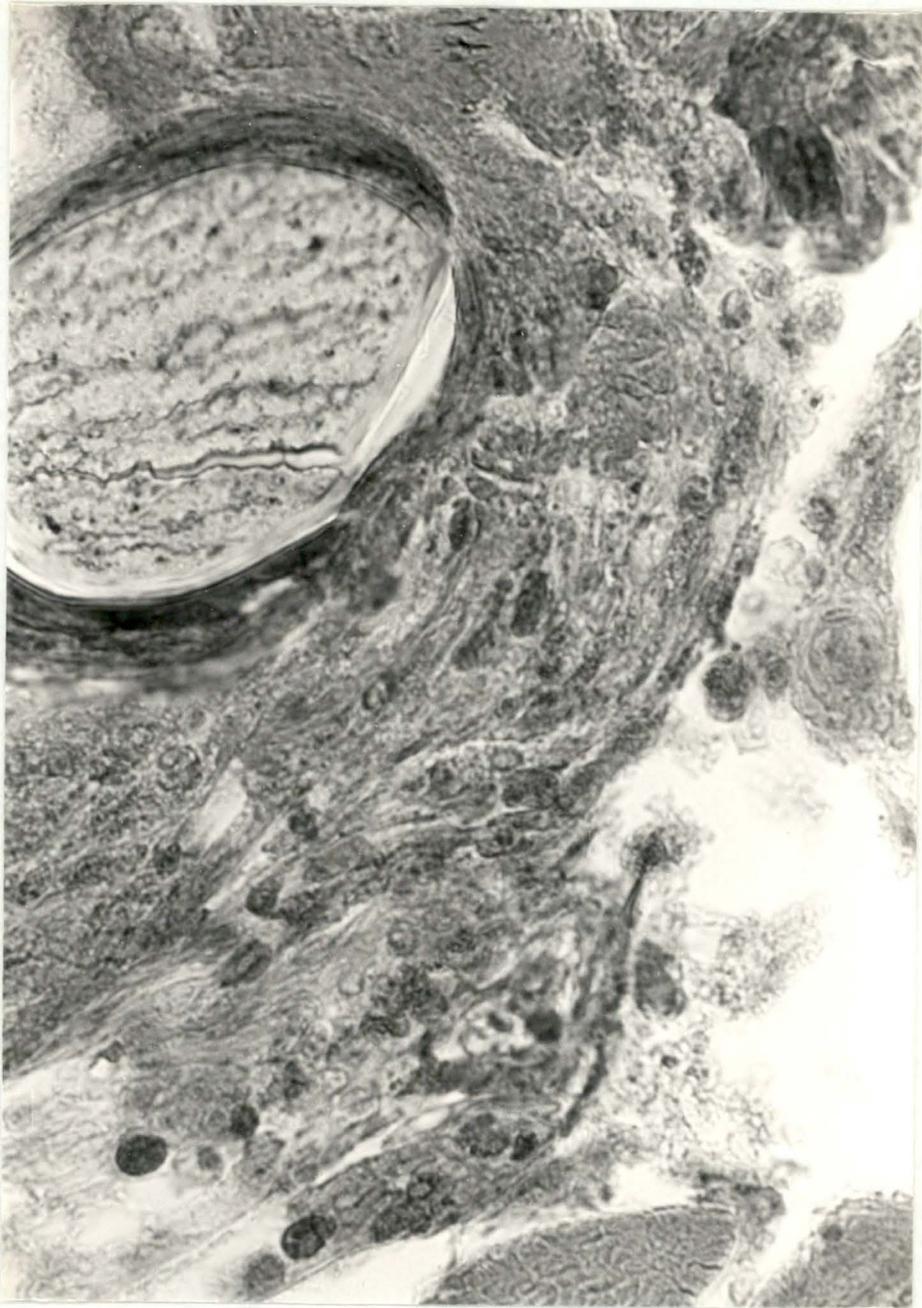


Photo 5. Encapsulation in vivo après 24 heures. On peut compter jusqu'à cinquante assises cellulaires autour du cheveu. 400 x (Hématoxyline de Regaud).



Photo 6. Encapsulation in vivo après 72 heures. La capsule est complètement développée. 100 x (Hématoxyline de Regaud).

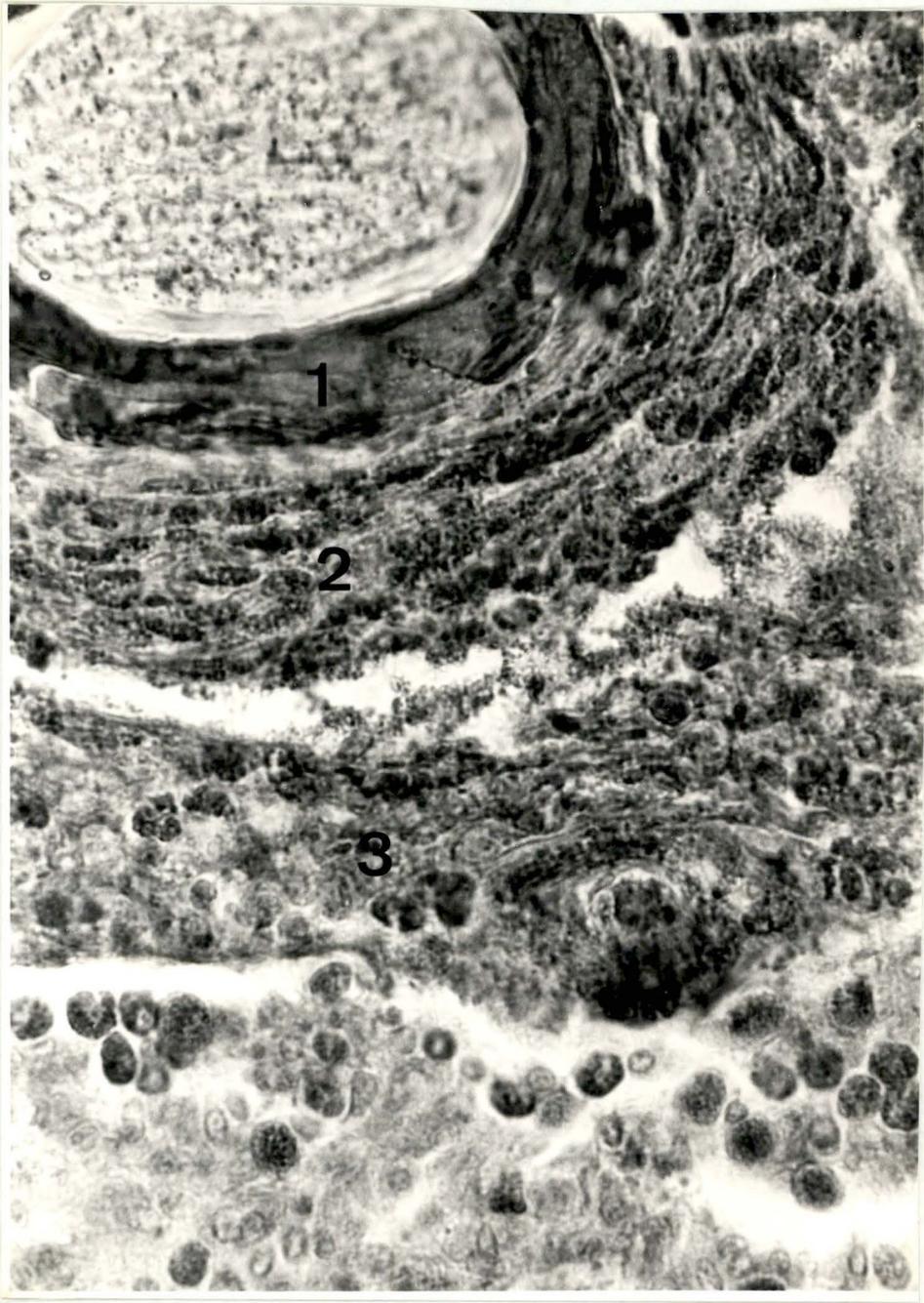


Photo 7. Encapsulation in vivo après 72 heures. On distingue aisément les trois couches (1 : couche interne; 2 : couche médiane; 3 : couche externe). 400 x (Hématoxyline de Regaud).

- A partir du quatrième jour, les capsules se réduisent considérablement. Beaucoup de cellules périphériques retournent dans le courant sanguin.

2. Structure et ultrastructure

Les capsules complètes sont formées de trois couches. La couche médiane représente environ la moitié de l'épaisseur de la capsule. Les hémocytes y sont très étirés et aplatis parallèlement à la surface de l'implant. Cette couche a un aspect feuilleté en "pelures d'oignon" selon l'expression de François (1975). Les couches interne et externe comprennent des cellules qui, pour la plus grande part, sont arrondies ou seulement légèrement aplaties.

Le changement le plus frappant, c'est-à-dire l'aplatissement des hémocytes centraux, commence à se manifester entre 12 et 24 heures après le début de l'encapsulation; il est très net après 48 heures et terminé au bout de 3 jours.

- La couche externe compte 5 à 6 strates cellulaires. Les hémocytes les plus externes sont pratiquement sphériques; les autres sont très peu aplatis. Toutes ces cellules ont la même ultrastructure que les cellules sanguines libres. L'espace intercellulaire est rempli par un dépôt floconneux : François (1975) s'est demandé s'il s'agissait d'une précipitation de l'hémolymphe.

- Les cellules aplaties de la couche médiane (photo 8) sont les plus caractéristiques des capsules. Chaque hémocyte a la forme d'un disque mince, plus épais au niveau du noyau, extrêmement atténué à ses deux pôles. En dépit de cet aplatissement important, ces cellules ont aussi une ultrastructure comparable à celle des cellules sanguines libres et ne montrent aucun signe de nécrose. A l'intérieur des cellules sanguines, le nombre de microtubules augmente considérablement (photos 9 et 10). Les granules des granulocytes se déchargent (par extrusion) dans l'espace intercellulaire; celui-ci est d'ailleurs rempli de fibrilles disposées

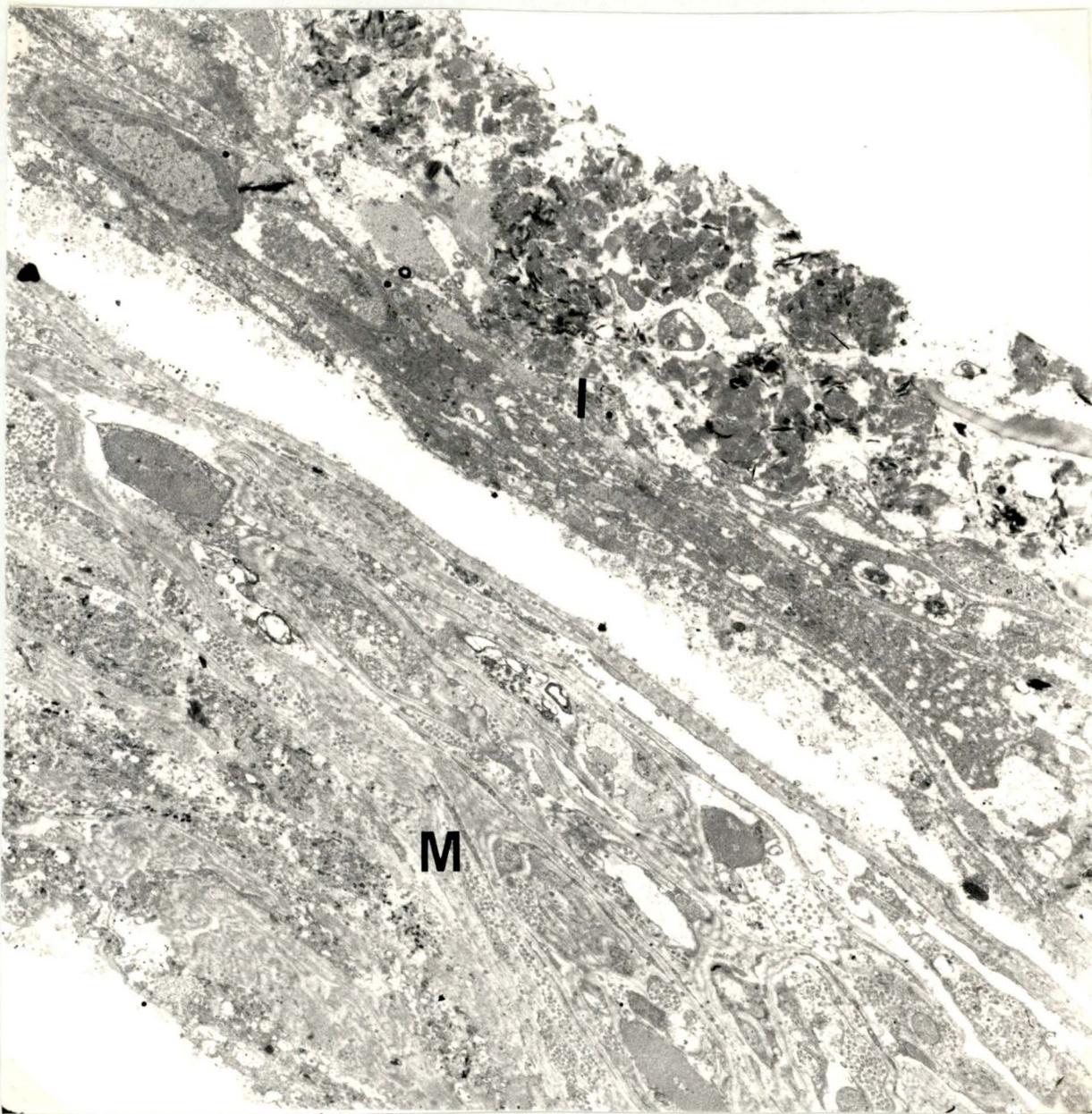


Photo 8. Encapsulation in vivo après 48 heures. Vue d'ensemble montrant la couche interne nécrosée, mélanisée (I) et la couche médiane (M), fortement aplatie. 8940 x.

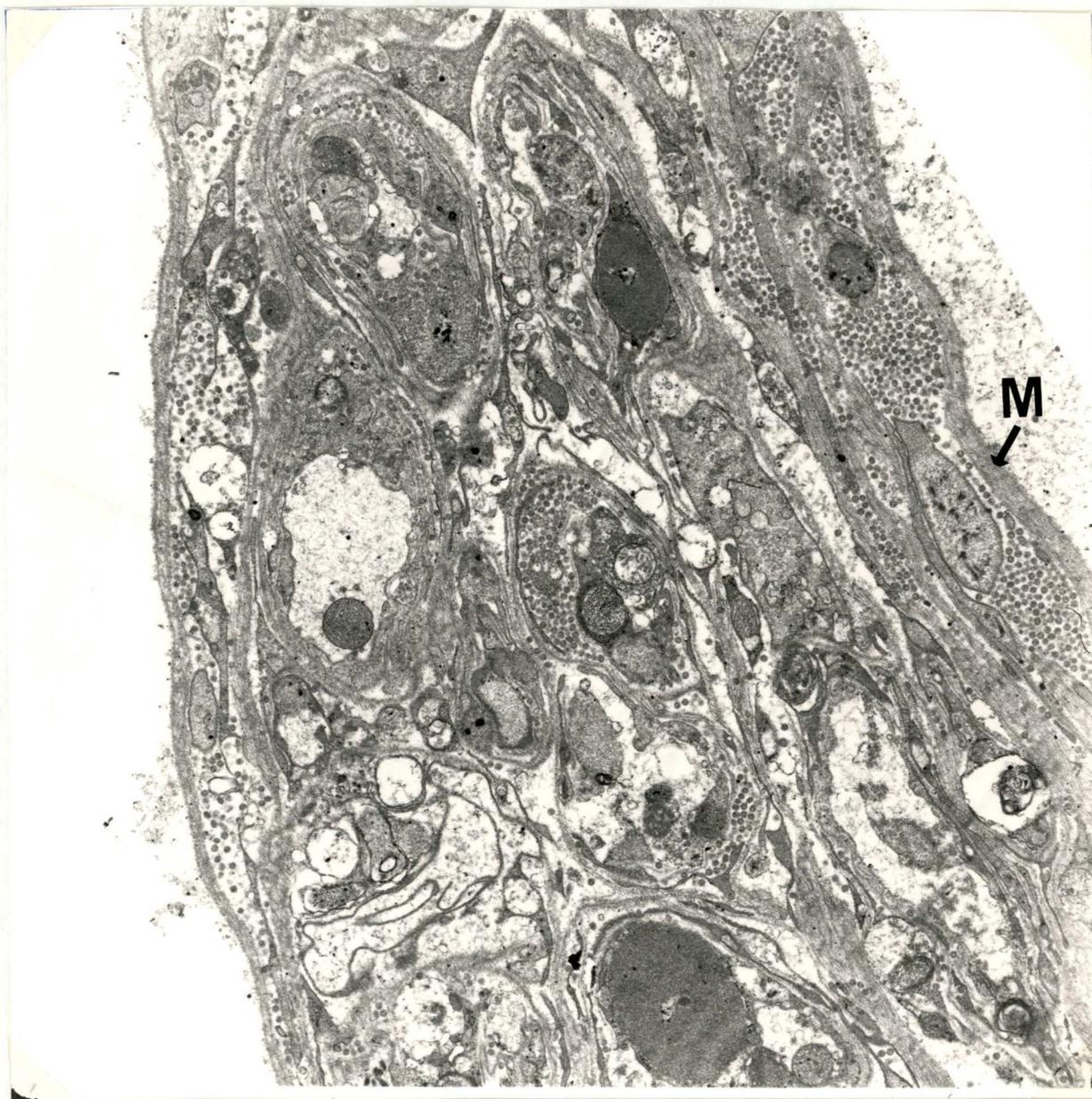


Photo 9. Encapsulation in vivo après 48 heures. Dans la couche médiane, fortement aplatie, le nombre de microtubules (M) augmente. Ces microtubules sont parallèles ou perpendiculaires à la surface du cheveu. 13440 x.



Photo 10. Encapsulation in vivo après 48 heures. Micrographie montrant l'importance des microtubules (M) dans la couche médiane. 19200 x.

parallèlement à la surface de l'implant (photo 11). Wigglesworth (1956) parlait de "membranes de tissu conjonctif".

- La couche interne, formée d'une dizaine de strates, comprend des cellules ayant plus ou moins le même diamètre, parfois légèrement aplaties. La plupart des hémocytes apparaissent nécrosés dans des capsules de 72 heures. Ces signes de nécrose se manifestent déjà après 24 heures, mais surtout après 48 heures : à ce moment, les cellules contiennent beaucoup de petits lysosomes. Au bout de 3 jours, on y trouve beaucoup de grands lysosomes, des corps résiduels et des mitochondries gonflées (Photos 12 et 13).

A l'intérieur des hémocytes, le nombre de microtubules est encore plus élevé (photo 14); la dégranulation est encore plus marquée. Les cellules sont imbriquées les unes dans les autres grâce à des desmosomes (maculae occludentes) (photo 15). Entre l'implant et la première couche cellulaire, il y a un dépôt très dense de mélanine.

Les cellules des trois couches de la capsule gardent leur indépendance ; on n'a aucune preuve de la formation d'un syncytium.

Les cellules ne sont pas les seuls constituants des capsules cellulaires : en effet, des substances sont libérées dans les espaces intercellulaires. Nous avons déjà noté un dépôt floconneux au niveau de la couche externe et une sécrétion fibrillaire entre les cellules aplaties de la couche médiane. Dans la couche interne de la capsule nous observons en outre une substance dense intercellulaire (photo 16).

Dans des sections de capsules de 48 heures et plus, examinées au microscope électronique, la moitié interne de la capsule apparaît dense aux électrons, la ligne de démarcation passant entre les hémocytes aplaties de la couche centrale (photo 8). Salt (1970) observait la même chose chez les insectes. Ce qui provoque cette différence entre les moitiés interne et externe n'a pas encore été élucidé.



Photo 11. Encapsulation in vivo après 48 heures. Les microtubules (M) sont surtout disposés parallèlement à l'implant. 19200 x.

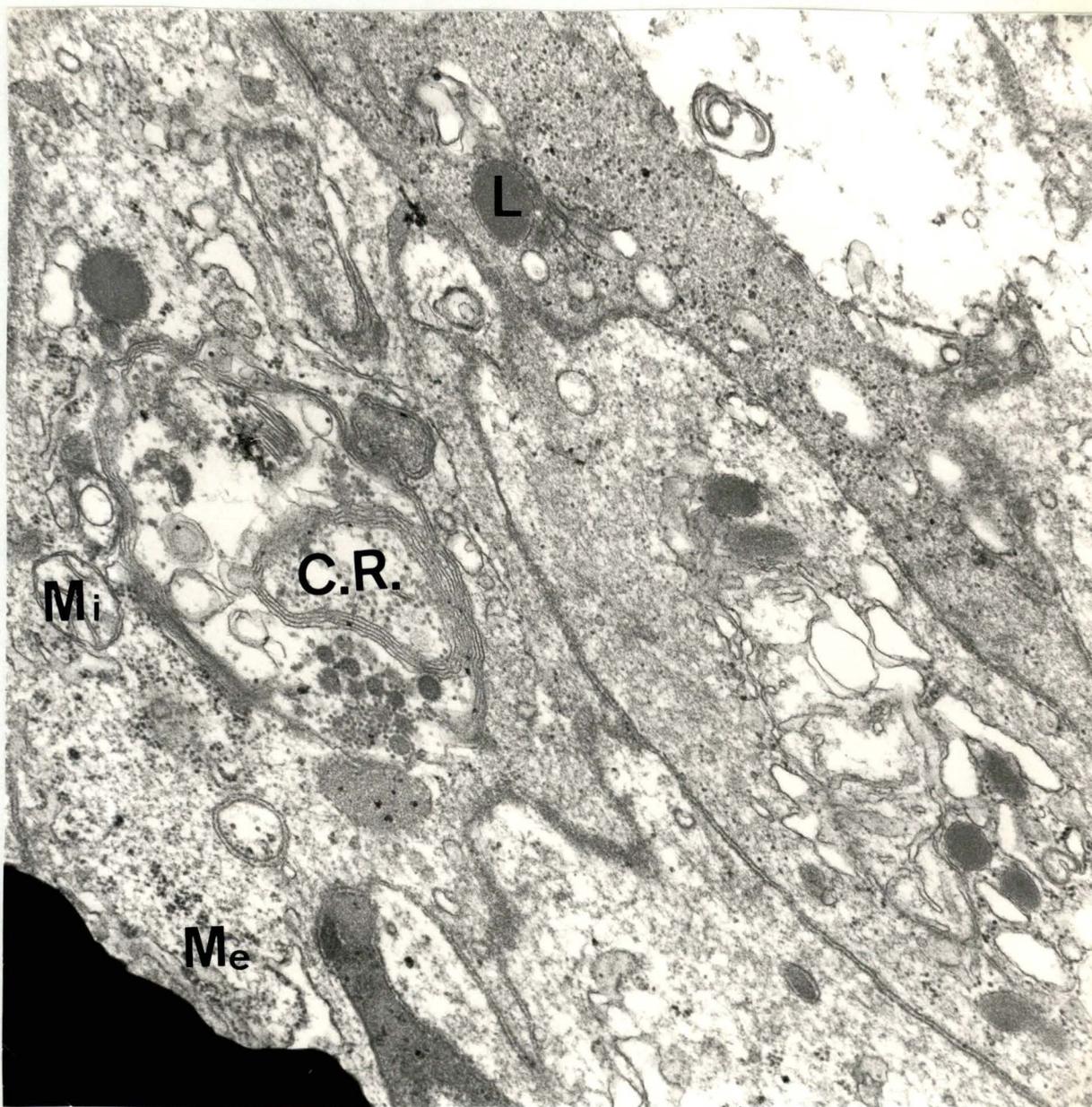


Photo 12. Encapsulation in vivo après 72 heures. Les cellules de la couche interne renferment de la mélanine (Me), de grands lysosomes (M), des corps résiduels (C.R.) et des mitochondries gonflées (Mi). 26280 x.

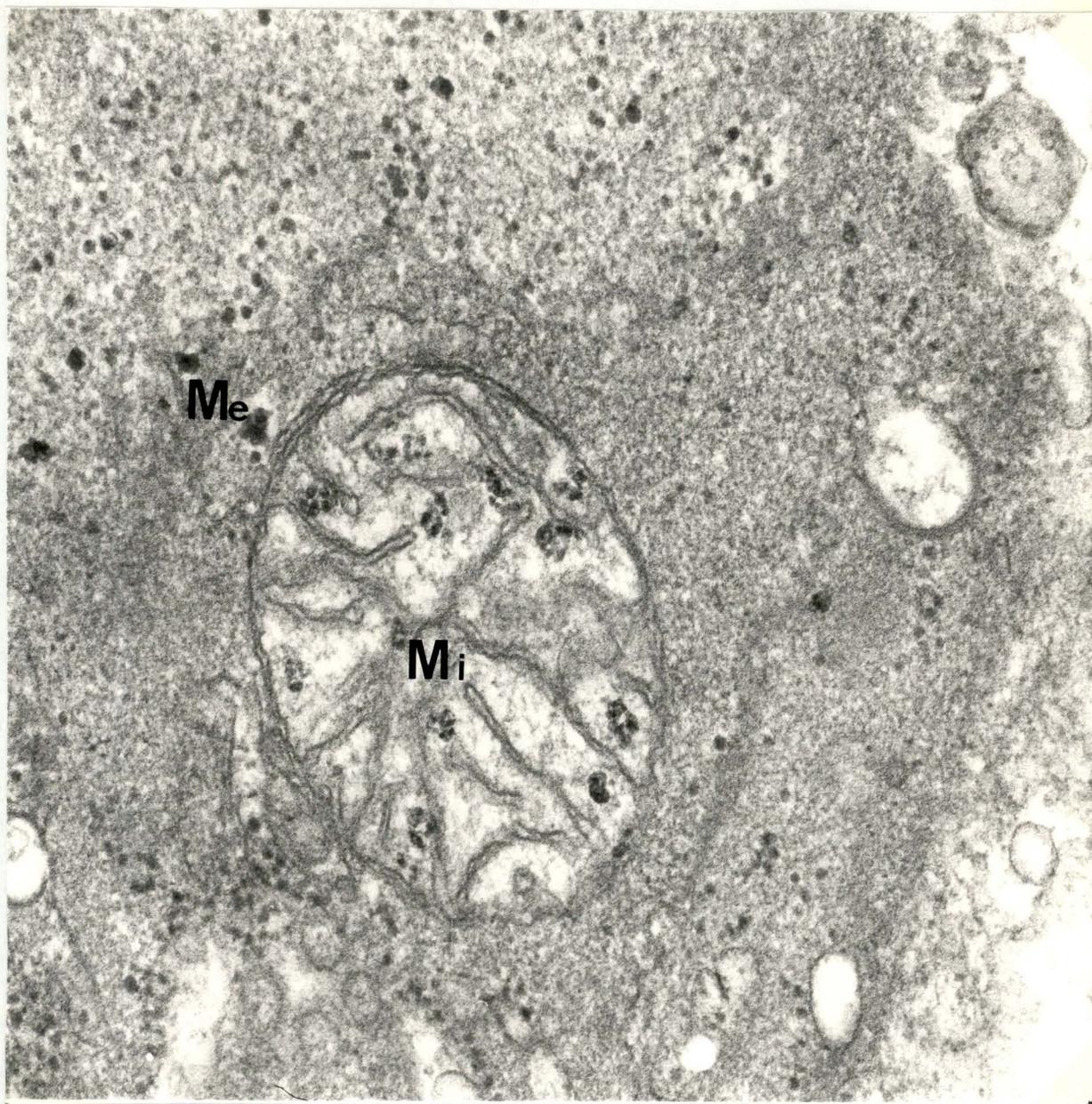


Photo 13. Encapsulation in vivo après 72 heures. Mélanine (Me) et mitochondrie gonflée (Mi) dans la couche interne. 83400 x.



Photo 14. Encapsulation in vivo après 72 heures. Microtubules (M) et mélanine (Me) de la couche interne. 36450 x.

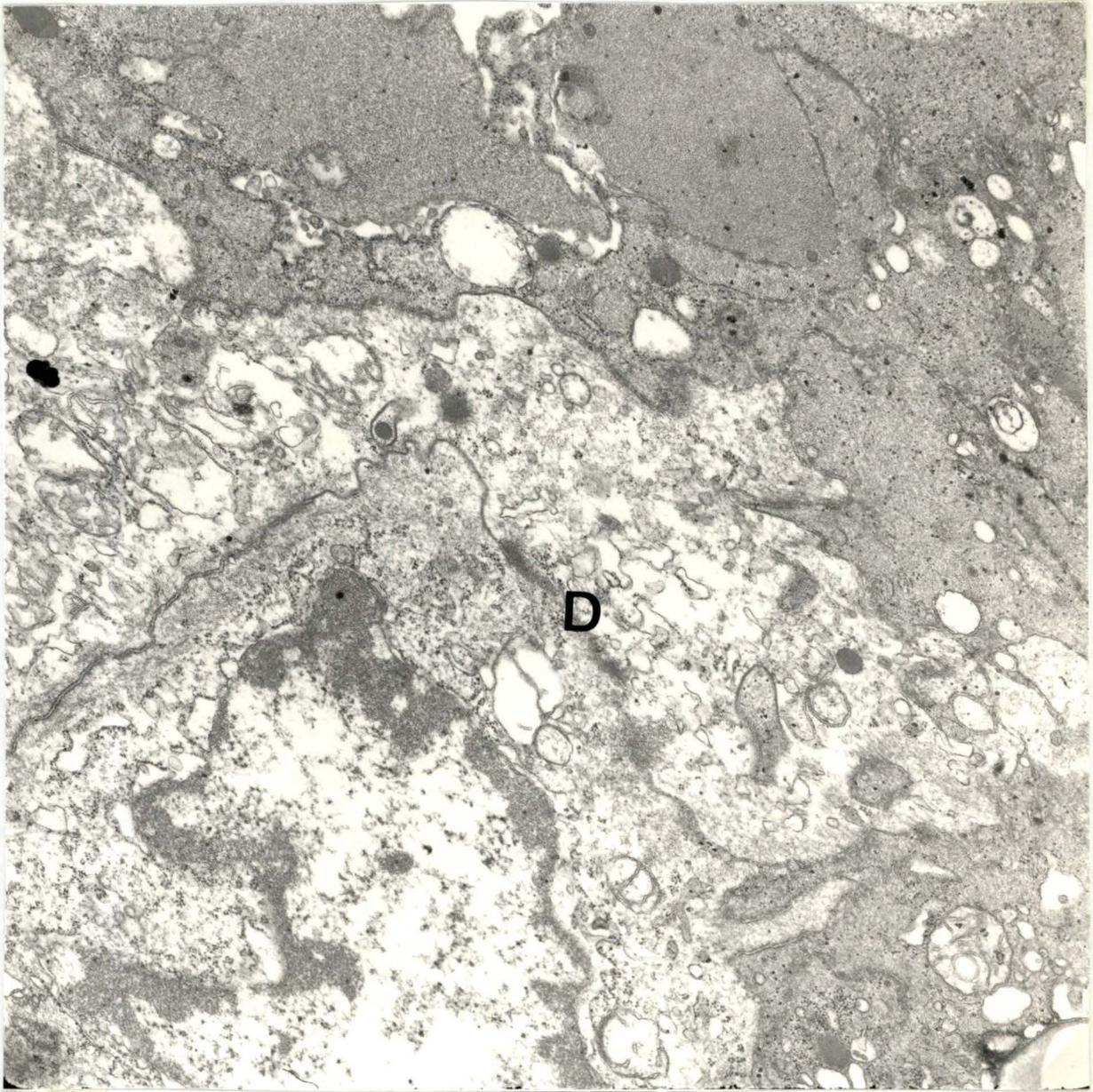


Photo 15. Encapsulation in vivo après 72 heures. Les cellules internes sont imbriquées les unes dans les autres grâce à des desmosomes (D). 19200 x.

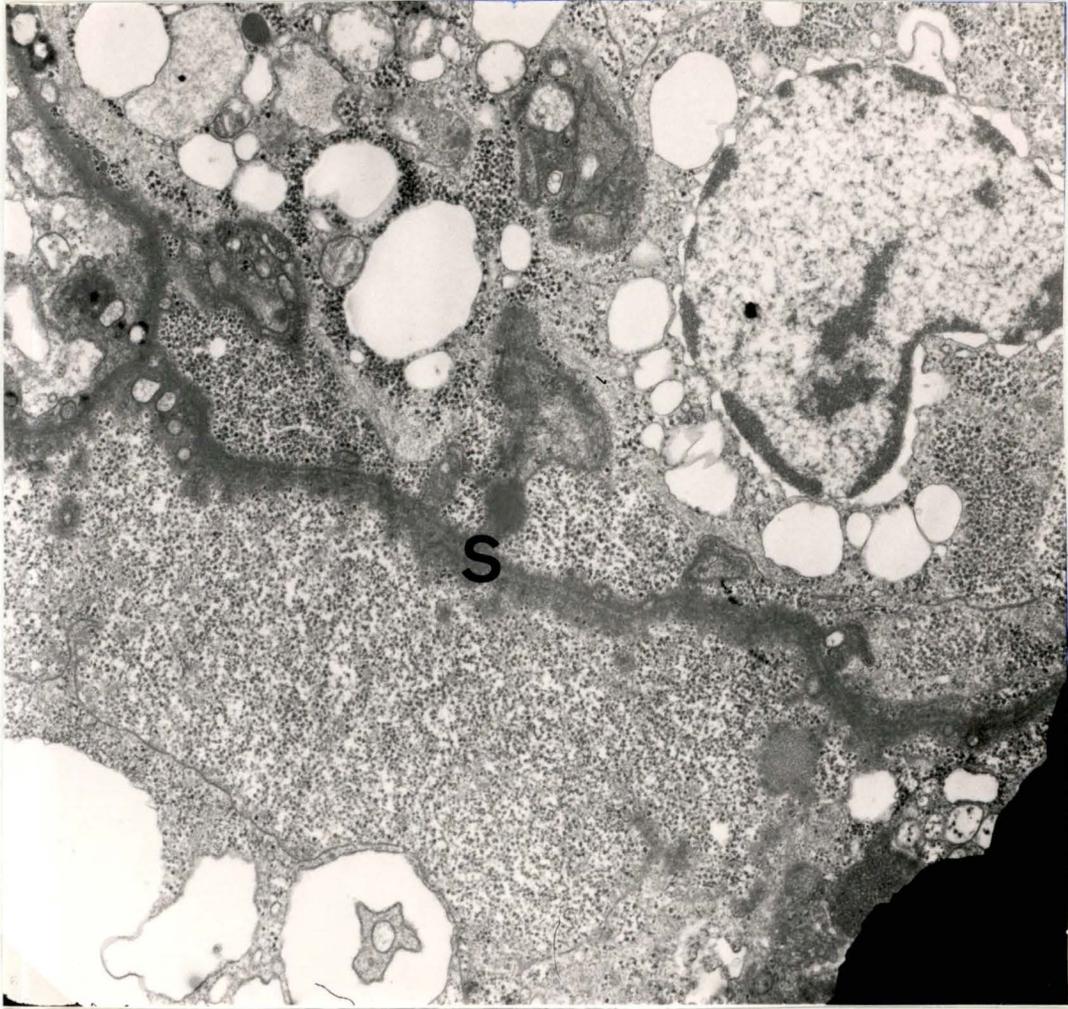


Photo 16. Encapsulation in vivo après 12 heures. Dans la couche interne de la capsule, nous observons une substance dense intercellulaire (S). 13440 x.

L'encapsulation cellulaire prend fin lorsque le corps étranger est enfermé dans une enveloppe fibreuse, non cellulaire, de tissu conjonctif. Matz (1965) parlait de "capsule conjonctive stabilisée". Tout autour de l'implant, des fibres, probablement analogues au collagène, s'accumulent et se disposent, toujours parallèlement à sa surface. Selon certains auteurs, cette enveloppe est composée de cellules transformées : il reste parfois des débris cellulaires et quelques cellules vivantes. Pour d'autres et notamment Salt (1963, p. 561), elle est sécrétée par les hémocytes eux-mêmes.

Dans des capsules de 10 semaines, le cheveu est véritablement emprisonné par une "épaisse matrice de fibres." En fait, il s'agit de cellules fortement aplaties, bourrées de lysosomes. Comme Salt le faisait remarquer en 1970 : "Des sections d'une telle structure, observées au microscope optique, pouvaient bien apparaître fibreuses et, parce que les noyaux semblent dispersés parmi les cellules fort aplaties, elles peuvent avoir été décrites comme non-cellulaires !".

3. Mélanisation

Des objets inertes implantés dans des insectes n'induissent, généralement aucune mélanisation, probablement parce qu'ils ne désorganisent pas les cellules (pas de mouvements, pas de lyse). Comme Salt (1956) le faisait remarquer : "si un objet inerte est continuellement déplacé du fait qu'il est attaché ou du moins très proche d'un organe musclé, comme l'intestin, les hémocytes peuvent être détruits et déposent de la mélanine."

De fait, dans nos expériences où le cheveu introduit juxta des masses musculaires, l'encapsulation cellulaire est suivie par l'apparition d'un pigment sombre à la surface du cheveu et dans les hémocytes de la couche interne, surtout. Le dépôt de mélanine n'est pas très important : dans des capsules de 3 jours, on observe des petites masses, çà et là, principalement dans les

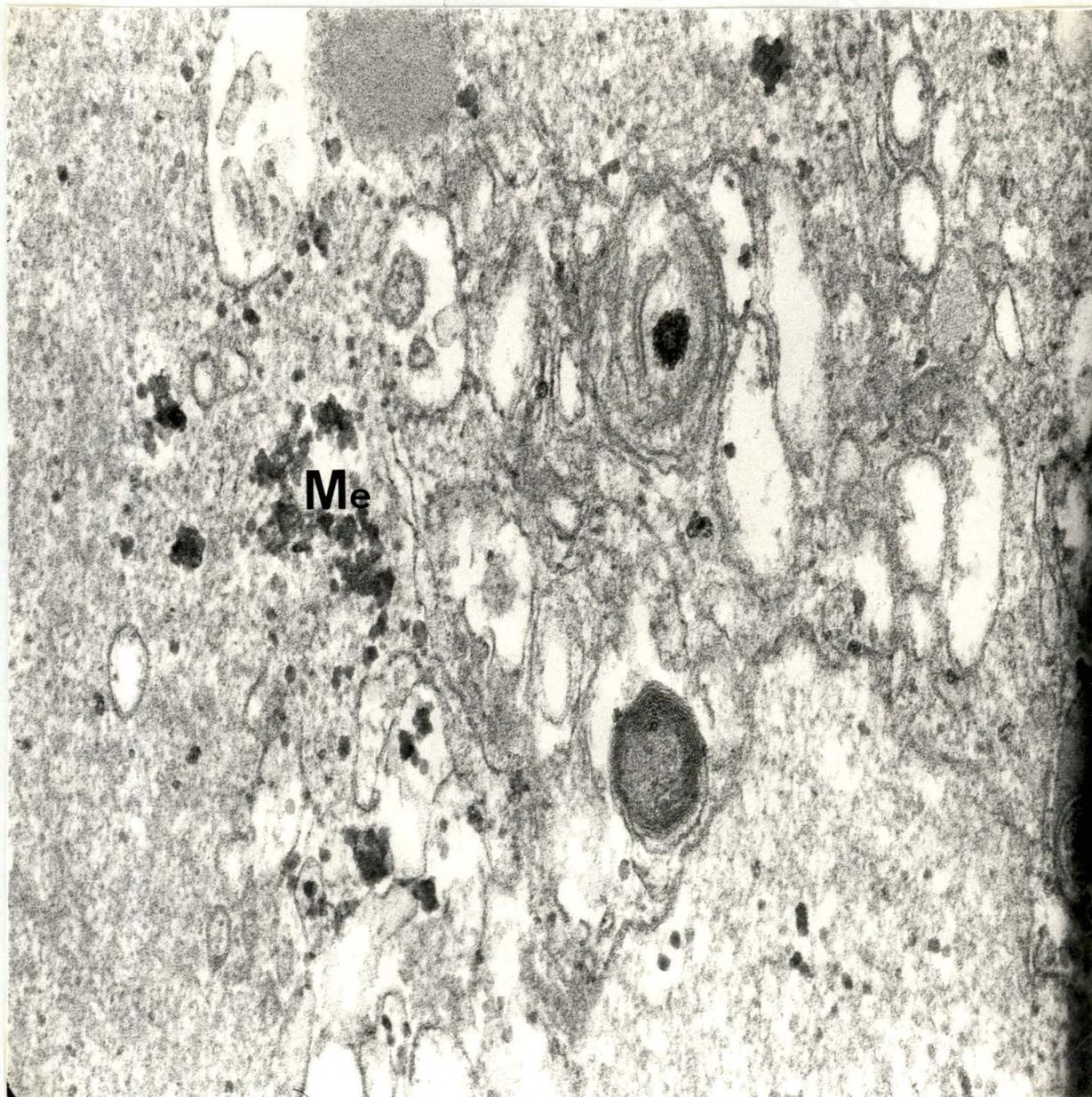


Photo 17. Encapsulation in vivo après 72 heures. La mélanine (Me) forme de petits amas dans la couche la plus interne de la capsule. 19200 x.

cellules les plus internes (photo 17).

Le pigment a parfois été appelé "mélanine" alors que le mot ne signifiait rien de plus qu'une substance fort noire; mais Eckstein (1931) en vint à la conclusion qu'il était formé par l'action de la tyrosinase sur la tyrosine et il est maintenant prouvé qu'il s'agit de mélanine au sens chimique du terme. Salt en 1950 a d'ailleurs montré que le dépôt de pigments dans les capsules était inhibé par la phénylthiourée, un inhibiteur de la réaction tyrosine \rightarrow mélanine.

Danneel (1946) a étudié du point de vue chimique les différentes étapes de la "mélanisation". Salt en 1970 a montré la présence de tyrosinase et dans le sang et dans les tissus des insectes. D'après lui, quand les cellules sanguines sont détruites, des réactifs peuvent se rassembler et entreprendre une réaction qui mène, après trois étapes au moins, à la formation de mélanine. Declair et Vercauteren (1965) ont confirmé la présence de phénoloxydase dans les hémocytes en particulier les granulocytes, de différentes espèces de crabes. Par contre elle manque dans les hémocytes hyalins. Cet enzyme activé détermine une déshydrogénation des O-diphénols et les produits de la réaction sont généralement des pigments.

Pourquoi, quand et comment la mélanisation a-t-elle lieu ? Il est difficile de répondre à ces questions d'après nos observations : en effet, nous avons vu que dans des capsules de 3 jours, la réaction était relativement faible. Nous pouvons ajouter que le dépôt de mélanine n'augmente guère par la suite. Les mouvements des masses musculaires ne sont-ils pas suffisants ? La capsule est-elle trop éloignée ?

Dès lors, pour résoudre ce problème, nous nous référerons à d'autres auteurs. Voici, par exemple, ce que Poinar et ses coéquipiers ont suggéré pour les Coléoptères. Les premiers hémocytes qui entrent en contact avec un parasite sont lysés et abandonnent leur cytoplasme sur la cuticule du parasite. Le cytoplasme libéré est transformé en une couche dense aux électrons, identifiée comme

étant de la mélanine. La réaction initiale est considérée comme une autolyse résultant du contact des cellules sanguines avec la surface du parasite. Cependant, la majorité des cellules qui forment la capsule ne sont pas détruites mais présentent divers degrés de nécrose et contiennent beaucoup d'inclusions opaques : stades intracellulaires dans la production de mélanine.

Misko (1972) propose une autre théorie pour Periplaneta americana. Durant les premiers stades de la formation de la capsule, les espaces extracellulaires à la surface du corps étranger contiennent un matériel amorphe; on y trouve des noyaux libres et des fragments cytoplasmiques d'hémocytes rompus, sous la forme de vésicules. Lorsque l'encapsulation se poursuit, ces vacuoles se pigmentent et s'étendent extracellulairement pour former des nappes de pigment qui se déposent sur le parasite. Il a aussi observé que les cellules à la surface de l'implant contiennent beaucoup de microvésicules denses. Mais pour lui, ces petites vésicules fusionnent pour former une couche amorphe, non pigmentée, qui joue un rôle dans l'adhérence des cellules et il ne s'agit pas des stades intracellulaires dans la formation de mélanine !

4. Les capsules gaines

Parfois, la mélanisation est précoce : une couche relativement fine de cellules couvre le parasite et se mélanise très vite pour former une enveloppe brune, résistante : une capsule-gaine. Ces capsules sont donc beaucoup plus minces que les capsules cellulaires. Elles ont été décrites, chez les insectes, par Salt (1970) (photo 18).

Après 72 heures, la capsule est complètement formée : on y distingue une couche interne mélanisée contenant du matériel cellulaire désintégré; une fine couche d'hémocytes nécrosés; une couche de cellules aplaties, formée de trois à quatre assises; et une couche de cellules sanguines arrondies d'aspect normal.

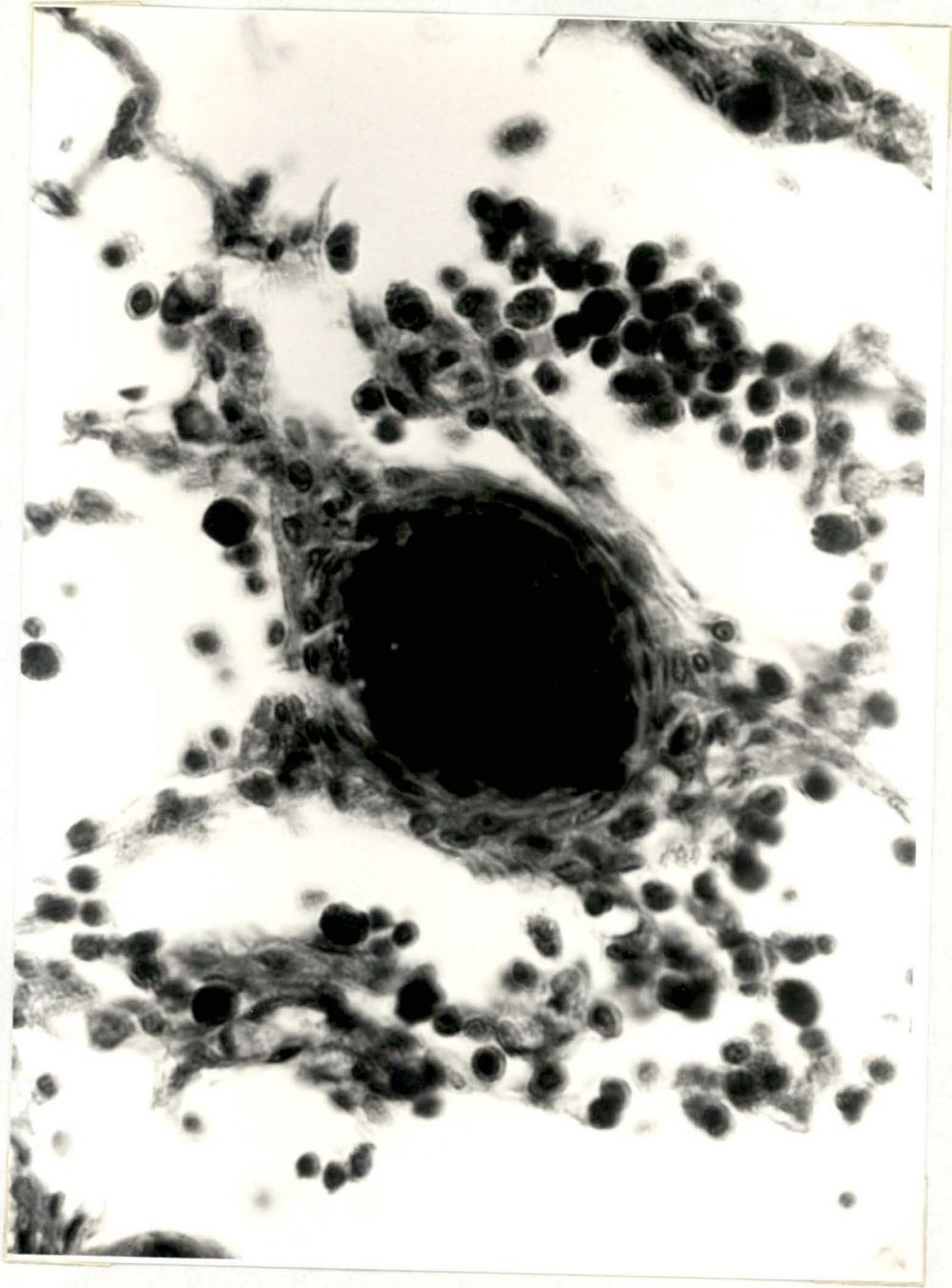


Photo 18. Capsule-gaine complètement développée.
400 x (Hématoxyline de Regaud).

5. Effets de l'encapsulation

Dans la nature, l'effet principal des capsules cellulaires est métabolique : elles privent le parasite d'oxygène et probablement d'autres substances. Les parasites encapsulés suffoquent et meurent; ceci explique pourquoi l'encapsulation doit être complète pour être efficace.

La mélinisation et les capsules-gaines ont surtout un effet physique : elles emprisonnent définitivement le parasite, empêchant sa croissance, mais lui permettant de rester vivant pendant un temps considérable (Salt, 1970).

Selon Matz et al (1971), les hémocytes en contact avec l'implant phagocytent le voile microbien, lorsque celui-ci n'est pas stérile.

6. Discussion

Beaucoup d'auteurs ont étudié l'encapsulation chez les insectes. Nos observations sur les crustacés concordent avec celles de Salt (1970), de Reik (1968) et de François (1975) qui a étudié le problème plus particulièrement chez le lépisme Thermobia domestica

Grimstone et al (1967) se sont intéressés aux différentes jonctions présentes dans les capsules d'insectes : "tight junctions" (zonulae occludentes) et desmosomes (macula et zonula adherens) (note ci-dessous).

Note : jonctions intercellulaires

- localisées = macula (taches)

- étendues = zonula (font le tour des cellules)

occludens : réduisent ou obstruent l'espace intercellulaire

adherens : laissent un espace de 150 à 200 Å

macula adherens = desmosome

zonula occludens = tight junction

zonula adherens = gap junction

Salt (1970) distingue une "capsule" d'un "granulome" : en effet, dans la première, il n'y a pas de cellules géantes, pas de fibrilles de collagène; pourtant, on y trouve de la mélanine et un grand développement des microtubules et des microfilaments. Ceux-ci auraient, avec les différents types de jonctions, un rôle de cytosquelette. Ils remplaceraient donc peut-être le collagène.

Matz et al (1971) ont mis en évidence chez les Orthoptères une réaction de défense un peu spéciale : l'enkystement épithélial. Il s'agit, en somme, d'une capsule cellulaire ordinaire, dans laquelle un épiderme se forme. "Entre les cellules dégénérées, au contact de l'implant et les assises externes intactes, apparaissent des cellules épithéliales d'origine épidermique ou trachéenne. Ces cellules sécrètent une cuticule fibreuse, très épaisse par endroits." Donc, ce néo-épiderme se met en place au milieu de la capsule, laissant plusieurs assises cellulaires entr lui et l'implant. A l'extérieur du néo-épiderme, la capsule devient conjonctive. Une fois cet épiderme mis en place, l'épaisseur de la capsule diminue.

Le néo-épiderme semble correspondre, chez les autres insectes et chez Carcinus maenas, à la couche médiane, formée de cellules fortement étirées et de "fibrilles conjonctives". Ces fibrilles représentent-elles une ébauche de cuticule ? Selon François (1975), il s'agirait de mucopolysaccharides acides non-sulfatés; dès lors, cette hypothèse est plausible et renforce l'idée de Salt (1970) : "les microtubules et microfilaments auraient un rôle de cytosquelette".

Brehelin et al (1975) ont réétudié les capsules cellulaires chez deux Orthoptères Locusta migratoria et Melolontha melolontha. Selon eux, seuls les hémocytes contenant de grands granules opaques (= hémocytes granuleux) constituent les capsules. Dans les couches internes, ils n'observent pas de modification, c'est-à-dire, pas de nécrose. Dans les couches externes, les gros granules sont progressivement détruits et ne sont plus reformés; en même temps, ils confi

ment l'apparition de microtubules et de microfilaments intracellulaires et intercellulaires, parallèles au corps étranger ("réaction microtubulaire").

Pour Salt (1970), l'encapsulation et les processus de phagocytose sont fondamentalement semblables. "L'aplatissement des hémocytes durant l'encapsulation peut représenter des essais, vains, de cellules trop petites pour englober de grandes particules". Comme, chez les insectes, la phagocytose est uniquement réalisée par les cellules hyalines, ces cellules sont les seules à former des capsules. "Evidemment, d'autres types de cellules peuvent être emprisonnés par hasard."

Chez Carcinus maenas, par contre, et les cellules hyalines et les granulocytes sont présents. Comme nous le verrons un peu plus loin, ces deux types de cellules participent "activement" à la réaction et semblent même indispensables.

II. Encapsulation in vitro

Salt, en 1970, semblait plutôt sceptique : "L'encapsulation n'a jamais pu être observée in vitro et le processus est dès lors connu grâce à l'examen d'hôtes disséqués à différents intervalles, après implantation d'un parasite ou d'un autre corps étranger."

Depuis, Unestam et Nylund (1972) sont parvenus à suivre les différentes étapes du processus chez l'écrevisse Astacus sp. Nous avons nous-mêmes mis au point un système de culture, qui mime la situation in vivo, dans lequel les hémocytes sont continuellement maintenus en suspension et, plus ou moins, en "circulation".

Les cellules sanguines réagissent avec une extrême rapidité. Après cinq minutes déjà, un manchon cellulaire continu enrobe entièrement le cheveu (photo 19). Les hémocytes hyalins et granuleux participent les uns et les autres à la réaction. Celle-ci va se poursuivre pendant une heure, donnant parfois naissance à de volumineux cylindres cellulaires (photo 20). Les hémocytes s'im-

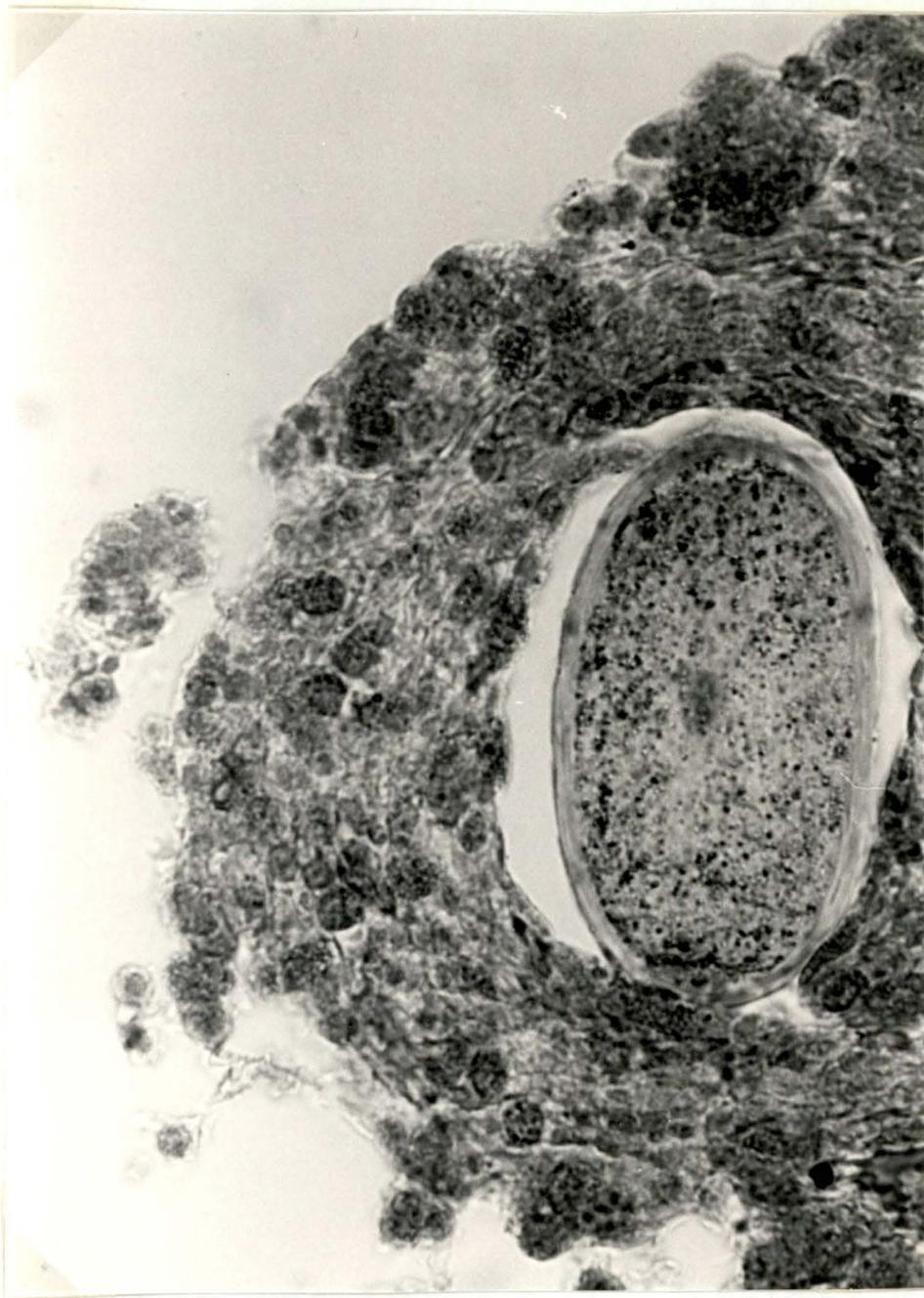


Photo 19. Encapsulation in vitro après 5 minutes. Un manchon cellulaire continu enrobe entièrement le cheveu. 400 x (Hématoxyline de Regaud).

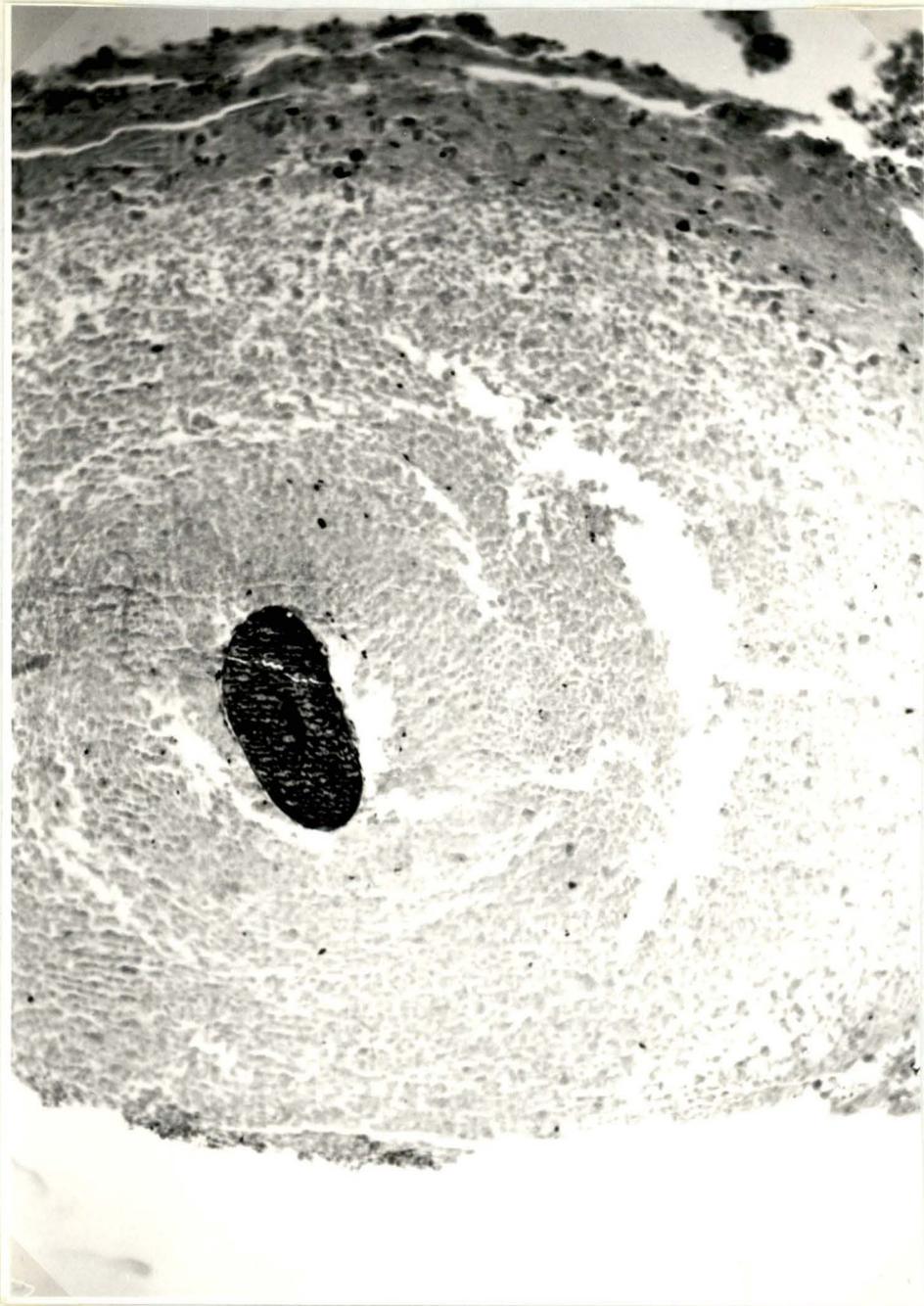


Photo 20. Encapsulation in vitro après 30 minutes. Le cheveu est entouré par un volumineux cylindre cellulaire. 100 x (vert lumière).

briquent les uns dans les autres. Dans certains cas, il semble que deux couches se différencient plus ou moins nettement. La couche la plus interne compte des cellules plus arrondies, tandis que la stratification se marque mieux à hauteur de la couche médiane; en périphérie l'adhérence hémocytaire se révèle plus lâche (photo 21).

Ultérieurement les cellules se lysent et le manchon devient transparent. Nous avons essayé de prolonger la réaction en renouvelant le sang toutes les heures, et cela pendant 4 heures. Aucune transformation ne s'est manifestée. En particulier nous n'avons pas observé la formation de dépôts mélaniques.

Ceux-ci peuvent cependant apparaître *in vitro* comme Unestam et Nylund (1972) l'ont observé dans le cas d'hémocytes mis en présence d'hyphes du champignon Aphanomyces. Ces auteurs décrivent le processus comme suit : "En quelques minutes, les granules sont libérés; ils explosent et émettent de petites particules qui s'attachent aux hyphes du champignon Aphanomyces astaci. En quelques heures, la polyphénol oxydase contenue dans de petites particules devient active. Le ou les enzymes de même que le ou les substrats pour la réaction de mélanisation semblent provenir des hémocytes. Le pigment est déposé surtout à la périphérie des granulocytes, dans les pseudopodes et dans les granules externes aux cellules. Les granules internes sont rarement mélanisés : l'enzyme est-il activé à l'extérieur des hémocytes ?"

Une couche légèrement réfringente se dépose à la surface de l'hyphe, qui se mélanise progressivement. Toutefois lorsqu'un hyphe vivant parvient à rompre cette couche de mélanine et à reprendre sa croissance, ce nouveau segment échappe au processus de mélanisation. Celui-ci réclame apparemment la présence d'hémolymphe fraîche. Dans nos expériences cependant des apports répétés de sang n'ont pas amorcé le noircissement superficiel.

III. Réaction à la Sacculine

Certains parasites ne sont pas détruits, bien qu'ils soient "encapsulés". Ils ont été qualifiés par Salt (1968) de



Photo 21. Encapsulation in vitro après 10 minutes. On voit très nettement la couche interne (I) lâche, arrondie et la couche médiane (M) stratifiée, aplatie. 400 x (Azan de Heidenhain).

parasites habituels. "Les parasites habituels d'une espèce donnée d'insecte sont, par définition, ceux contre lesquels ses réactions de défense sont inefficaces".

La Sacculine (Sacculina carcini) se range parmi les "parasites habituels" de Carcinus maenas. Au stade adulte, elle est formée de deux parties : la partie interne se présente comme une tumeur avec de longues racines qui se ramifient dans le corps de l'hôte, tandis que la partie externe constitue un sac viscéral qui après avoir percé le tégument fait hernie au niveau de l'abdomen de l'hôte.

Les hémocytes de Carcinus entreprennent une réaction de défense autour de chaque ramification parasitaire, mais cette "encapsulation" reste très réduite vu le diamètre et surtout vu le nombre de racines. En général, on peut compter de 1 à 7 assises cellulaires : les hémocytes, aussi bien hyalins que granuleux, sont arrondis ou à peine aplatis et gardent la même ultrastructure que les cellules sanguines libres (photo 22). Tout contre la surface du parasite, des déchets cytoplasmiques et des granules s'accumulent (photo 23). Dans le cytoplasme, on observe des amas de glycogène et divers signes de nécrose.

Plusieurs auteurs ont essayé de comprendre et de justifier cette "tolérance" du parasite. Cheng (1974) émit l'hypothèse suivante : incompatibilité de la surface du corps du parasite avec les enzymes de l'hôte. Selon von Brand (1973), les constituants des cuticules des parasites seraient protégés contre les hydrolases de l'hôte, soit en les inhibant, soit en présentant une surface imperméable ou résistante. Une autre possibilité peut être envisagée : les enzymes, concentrées dans les cellules de la "capsule" ne sont pas libérées pour l'une ou l'autre raison (Harris, 1974).

D'autre part, Salt (1968) a montré que les parasites habituels utilisaient des stratagèmes multiples parfois très complexes pour échapper aux réactions de leurs hôtes habituels. Dans ce même ordre d'idées, Salt (1970) notait, par exemple, que si un corps étranger était complètement recouvert par une membrane de tissu

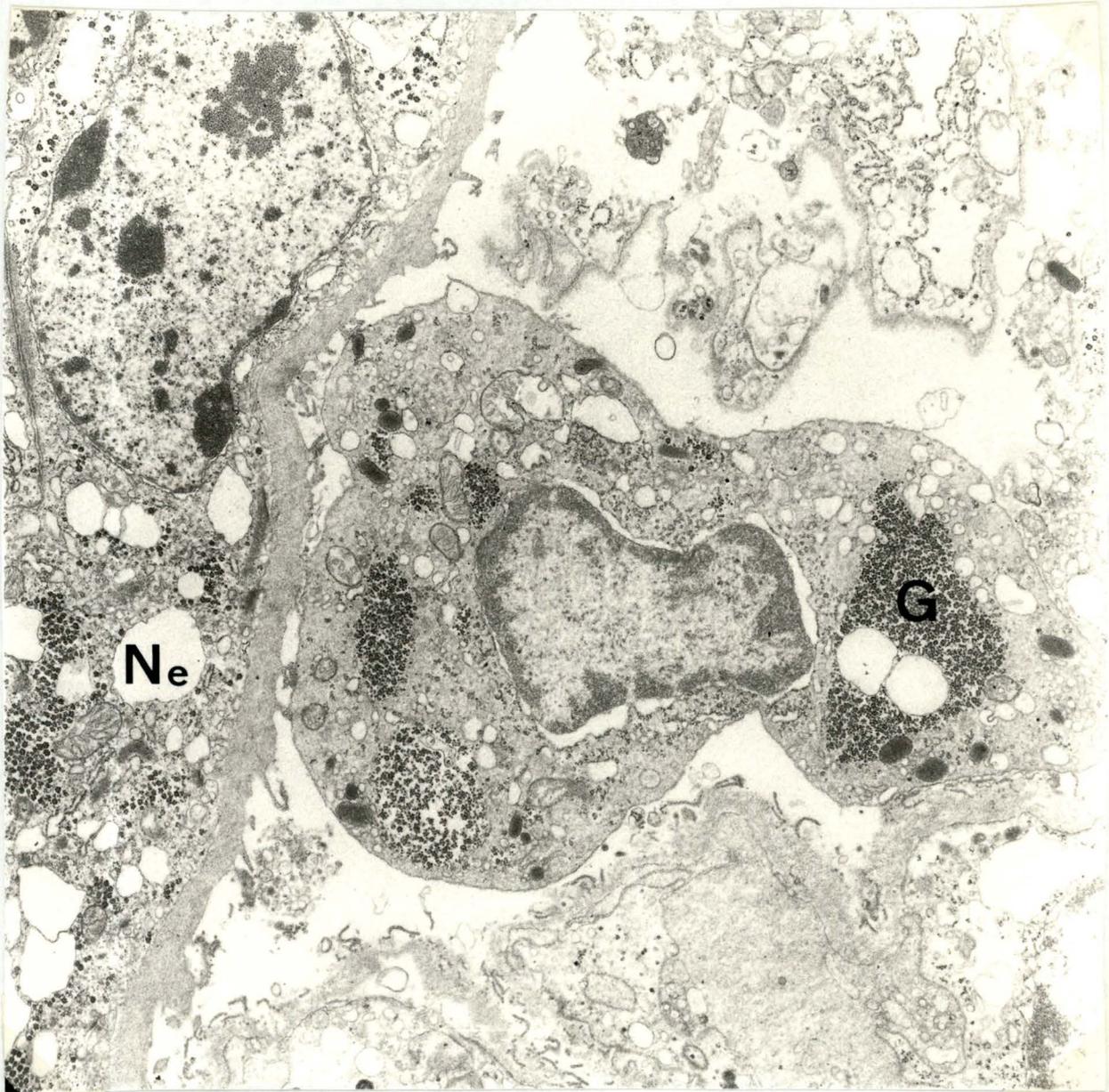


Photo 22. Réaction à la Sacculine. On observe, et dans la Sacculine et dans les hémocytes des amas de glycogène (G) et divers signes de nécrose (Ne). 13440 x.

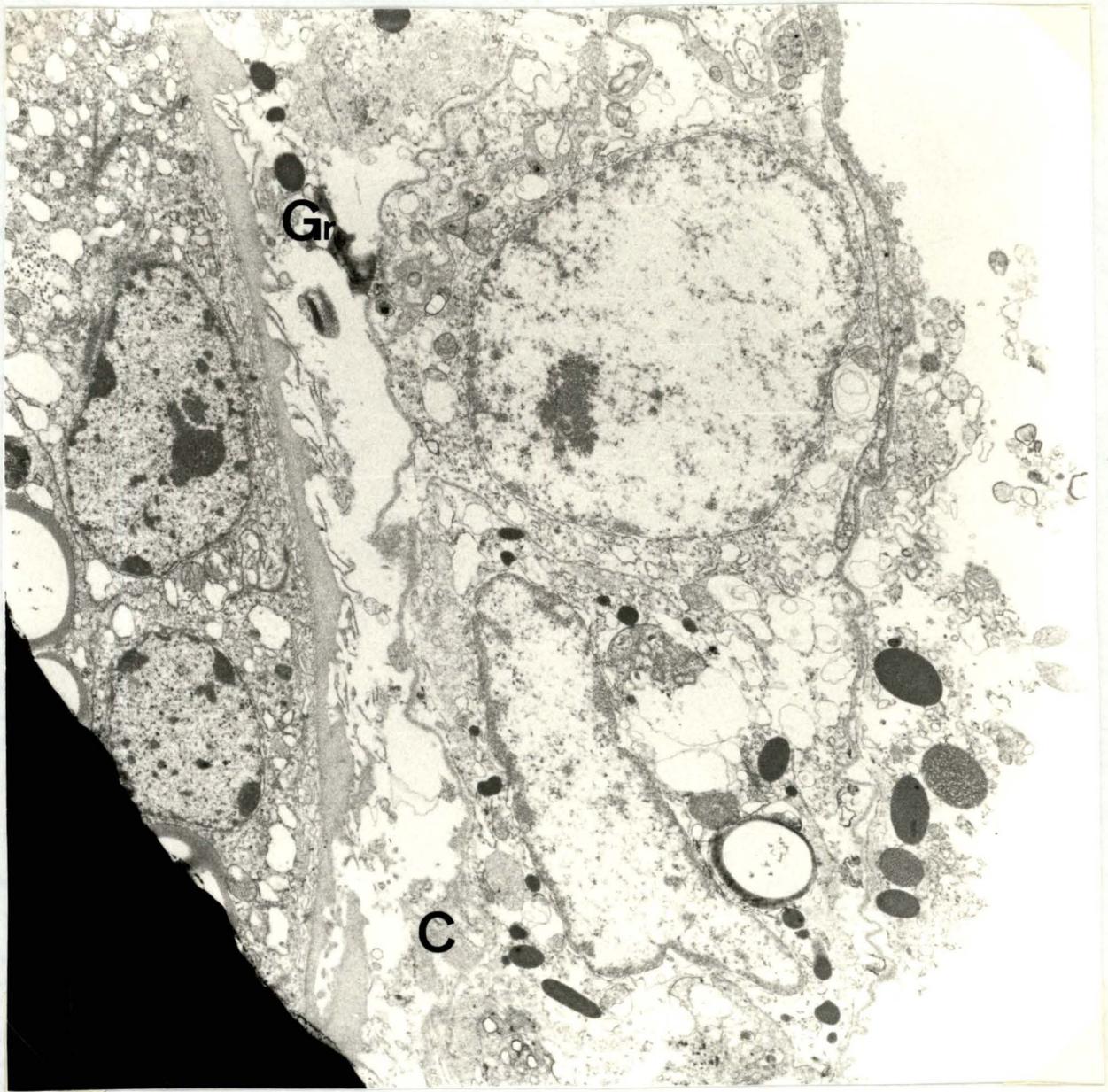


Photo 23. Réaction à la Sacculine. Tout contre la surface du parasite des déchets cytoplasmiques (C) et des granuels (Gr) s'accumulent. 8940 x.

conjonctif approprié, les cellules sanguines ne réagissaient plus contre lui. Mais une rupture de cette membrane, comme par exemple lors de la croissance, déclenchait une réponse locale : "quelques hémocytes la réparent et colmatent la brèche". Toute décomposition ou altération de la membrane menait à l'encapsulation ou à la phagocytose si le contenu dégénérait; l'absence de membrane stimulait l'encapsulation complète.

Cette explication semble la plus exacte dans le cas qui nous occupe ici. En effet, si on observe une "racine" de Sacculine au microscope électronique, on trouve, à sa surface, un manchon homogène, probablement de tissu conjonctif. Le revêtement semble envoyer des "projections" sur lesquelles les hémocytes de l'hôte viennent se fixer. Apparemment, ces cellules tolèrent la présence de la Sacculine, comme s'il s'agissait d'un tissu de l'hôte lui-même.

Le problème est évidemment de savoir d'où vient cette couverture de tissu conjonctif : de l'hôte ou du parasite ? Pour Damian (1964) et pour Salt (1968), les parasites seraient recouverts par une couverture de mucopolysaccharide provenant de l'hôte et c'est elle qui empêcherait les cellules sanguines de les considérer comme étrangers. Damian a d'ailleurs donné à ce processus le nom de "parodie moléculaire". C'est vrai dans le cas d'une encapsulation "normale" mais ici ? Il semblerait plutôt que ce soit la Sacculine elle-même qui cherche à passer "inaperçue".

En conclusion, nous pouvons reprendre ces quelques mots de Salt (1970) : "... tous les insectes encapsulent un parasite qui envahit leur hémocoel à moins que ce dernier n'ait, et n'utilise quelque moyen spécifique pour éviter ce destin."

IV. Formation de nodules

Le moyen de défense entre en action contre des micro-organismes (amas de bactéries) et autres petites particules introduits à la suite d'une perforation de la paroi intestinale ou d'une

blesseure externe. Ils peuvent former alors des amas dans l'hémo-coele. Le nodule correspond à une combinaison de la phagocytose et de l'encapsulation : les cellules sanguines s'infiltrant dans l'amas et s'accumulent tout autour. Certaines phagocytent des particules ou des bactéries isolées; d'autres y adhèrent. Un agglomérat de particules étrangères, de phagocytes nécrosés et de cellules sanguines vivantes se développe alors et constitue une capsule composite (photo 24).

Selon Metalnikov (1924), les micro-organismes isolés dans des nodules sont pour la plupart détruits : digestion progressive, dégénérescence et mélanisation.

Parce que les nodules sont formés par les cellules circulantes, susceptibles d'amorcer la phagocytose et l'encapsulation, il est évident qu'ils sont composés et de cellules hyalines et de granulocytes.

Nous avons observé, aux environs des capsules, de grands nodules à structure lamellaire : en effet, ce sont des capsules dont la couche interne ne constitue pas une surface continue, mais s'engage dans un agglomérat de cellules sanguines dégénérées, de particules étrangères et de débris mélanisés (photo 25). Le même genre de nodules a été décrit chez les insectes par Salt en 1970.

D'après Metalnikov (1924), les phagocytes, au contact d'un amas de bactéries tendent à s'agglomérer et à former des "cellules géantes" par disparition des parois cellulaires et confluence du protoplasme. Ceci, pensait-il, servait à emprisonner de grandes masses de bactéries et permettait aussi une digestion rapide des microbes par transfert efficace des enzymes intracellulaires.

Cependant, l'examen de nodules au microscope électronique révèle sur notre matériel la persistance des parois cellulaires. Il n'est pas exclu cependant que des phagocytes, confrontés avec une quantité excessive de particules à ingérer, tendent à former des syncytia soit par division incomplète, soit par fusion des cellules (Salt, 1970).

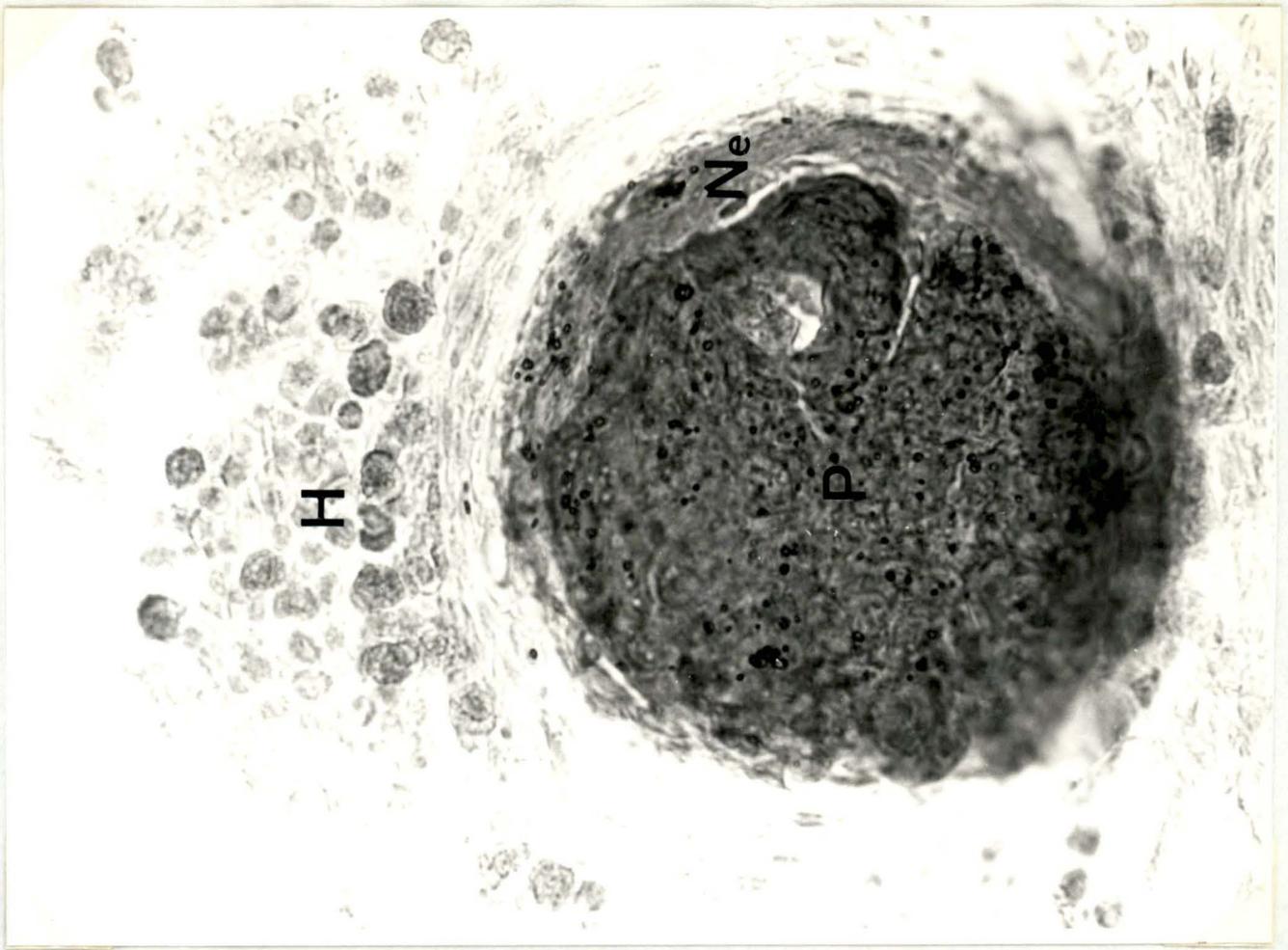


Photo 24. Nodule : agglomérat de particules étrangères (P), de phagocytes nécrosés (Ne) et de cellules sanguines vivantes (H). 400 x (Trichrome de Masson)

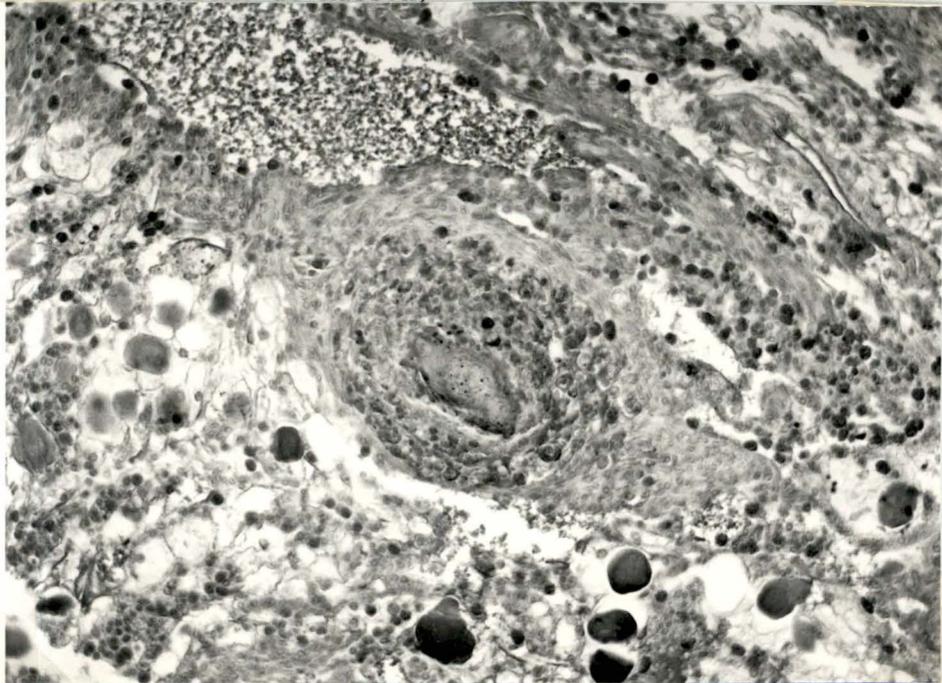


Photo 25. Nodule "lamellaire". 100 x (Trichrome de Masson).

V. Discussion générale du phénomène d'encapsulation

Les cellules sanguines réagissent en six étapes successives :

- 1) contact entre une cellule sanguine et le corps étranger
- 2) adhérence des deux
- 3) la réaction à un corps étranger volumineux implique la cohésion de cellules qui n'ont aucun contact direct avec la surface étrangère
- 4) cela implique aussi l'agrégation d'un grand nombre de cellules.
- 5) développement de la capsule : quelques cellules se nécrosent; d'autres s'étalent fortement.
- 6) déclin de la capsule

Tous ces problèmes ont été examinés par Salt (1970); ils n'en sont pas résolus pour autant.

1. Contact

Les cellules sanguines de l'hôte sont-elles attirées, à distance, vers le corps étranger ou entrent-elles en contact avec sa surface par hasard, au cours de leur circulation, ce qui les stimule alors à adhérer ? Aucune réponse sûre ne peut être donnée : aucune preuve de chimiotactisme n'a été trouvée. De plus, il a été démontré, expérimentalement, que les hémocytes adhèrent moins à un corps étranger situé en-dehors du flux sanguin principal qu'à un corps étranger localisé au beau milieu de ce flux (Salt, 1956).

Les cellules sanguines réagissent probablement après contact plutôt que sous l'action d'un stimulus agissant à distance.

2. Adhérence

Au cours de leur circulation, les hémocytes touchent fréquemment d'autres cellules sanguines ainsi que les membranes de tissu conjonctif limitant l'hémocoèle. Ils n'y adhèrent pourtant

que rarement. Mais lorsqu'ils rencontrent une surface différente, celle de la plupart des corps étrangers, beaucoup d'entre eux s'y attachent. Vu le nombre impressionnant de particules et de corps étrangers auxquels les hémocytes adhèrent, il paraît invraisemblable qu'ils aient une caractéristique positive commune; ils se ressemblent uniquement par le fait qu'il leur manque quelque chose.

Nous sommes donc conduits à envisager un stimulus général pour adhérer, en même temps qu'un mécanisme qui, dans quelques cas, inhibe ce stimulus. Les hémocytes réagiraient à un stimulus négatif (l'absence de quelque chose); ou alors, cette caractéristique commune, négative, se transformerait en un stimulus positif. Une transformation de ce genre pourrait résulter de la fixation de substances du plasma sur des surfaces étrangères. Le plasma dans lequel les hémocytes circulent constitue un fluide complexe dont certains éléments pourraient réagir au contact d'un corps étranger. Certaines protéines pourraient être dénaturées ou du moins, modifiées à sa surface. Si ces molécules altérées du plasma stimulent les cellules sanguines, elles pourraient bien constituer le stimulus positif requis.

Salt (1965) propose un argument contre cette théorie : des substances inertes, comme le verre, stimulent les cellules aussi fort que les surfaces des tissus hétérologues ou des parasites, mais il n'est pas démontré que le verre n'ait aucune action sur le plasma. Dès lors le problème reste posé.

3. Cohésion

Si les premières cellules qui adhèrent à un corps étranger réagissent à un stimulus reçu à sa surface, les autres n'entrent plus en contact avec elle et doivent dès lors recevoir leur stimulus de la surface des premiers hémocytes et donc, seulement indirectement, de la surface du corps étrangers qu'elles encapsulent. Quel est le facteur qui stimule les hémocytes à la cohésion pour former une capsule pluristratifiée autour d'un parasite alors que seule la couche la plus interne est en contact direct

avec lui ? Les cellules émettent facilement des pseudopodes; ceci augmente certainement la fréquence des contacts et altère peut-être les propriétés de surface, "si bien que les cellules deviennent étrangères aux autres" (Grimstone et al, 1967).

Une cohésion analogue s'observe aussi après une phagocytose excessive : si un phagocyte engloutit beaucoup de particules, il en stimule d'autres et les fait adhérer à lui; il peut alors être lui-même phagocyté (Hollande, 1930), ou encore se voir entouré par d'autres cellules et former le centre d'un nodule (Metalnikov, 1924; Wigglesworth, 1956). Une phagocytose intensive pourrait conduire à un raccourcissement de la membrane plasmique et changer les propriétés de surface de sorte que d'autres hémocytes soient stimulés à y adhérer.

La cohésion des cellules durant l'encapsulation représente le cas critique. Des milliers d'hémocytes s'agglutinent autour d'un corps étranger avec lequel quelques centaines d'entre elles seulement sont en contact. Qu'est-ce qui fait que ces cellules, au départ indépendantes, se joignent aux couches externes de la capsule ?

Différentes hypothèses sont proposées :

On pourrait supposer qu'un stimulus venant du corps étranger serait transmis ou diffuserait à travers les couches internes de la capsule. Une telle hypothèse est séduisante parce que le stimulus s'affaiblirait probablement en traversant les strates cellulaires successives, ce qui expliquerait pourquoi les hémocytes cessent finalement de s'agréger à une capsule. Mais on peut prouver qu'elle est fautive. En effet, la diffusion d'une substance chimique est concevable quand l'objet encapsulé est un organe implanté ou un parasite, (par exemple, transmission d'une charge électrostatique) mais pas quand il s'agit d'un bout de verre ou de polyfluorocarbonate (Salt, 1966). Si on considère une capsule complète, avec des cellules nécrosées près de la surface étrangère et des cellules fortement aplaties à l'extérieur, deux remarques s'imposent. Les hémocytes nécrosés stimulent les cellules sanguines qui les touchent. L'aplatissement marqué des cellules des couches médianes implique une augmentation de

leur surface : celle-ci est multipliée par cinq (Grimstone et al., 1967). La surface de ces cellules se voit modifiée par l'extension et suscite la cohésion des autres cellules.

Mais ces suggestions sont "balayées" lorsqu'on considère une capsule en train de se développer : les cellules les plus internes ne montrent aucun signe de nécrose, même après avoir adhéré pendant plusieurs heures au corps étranger et bien avant d'être couvertes par d'autres couches d'hémocytes. C'est donc plutôt le tassement des cellules qui explique la dégénérescence des couches internes. De même, les cellules de la région médiane amorcent leur étalement caractéristique bien après leur attachement à la capsule : elles s'agrègent aux capsules comme des cellules morphologiquement intactes et c'est seulement suite à leur contact et à leur adhésion qu'elles s'aplatissent et montrent des changements pathologiques (Grimstone et al, 1967). Elles sont encore sphériques ou commencent à peine à s'aplatir quand d'autres cellules sanguines sont stimulées à s'accoller. Reik (1968) émit une hypothèse différente : les cellules situées sur la face externe d'une capsule en croissance sécrètent un matériel micro-fibrillaire à leur surface, y compris du côté externe, resté libre. Le contact avec la surface de la capsule stimule apparemment la production de ce matériel, qui contient assurément un mucopolysaccharide acide. "A mon point de vue, l'élaboration de ce matériel est responsable d'une augmentation non spécifique de la "viscosité" de la surface cellulaire et les cellules sanguines libres qui le touchent sont "attrapées" et fixées à la surface de la capsule."

En conclusion, il semble probable que le facteur commun s'identifie avec une modification de la surface cellulaire. En sécrétant un matériau conjonctif, peut-être aussi en multipliant les pseudopodes ou après une phagocytose répétée, les cellules sanguines modifient leur surface au point de stimuler la cohésion des autres cellules.

4. Développement de la capsule

Par l'adhérence, la cohésion et l'agrégation des cellules sanguines, un corps étranger est vite entouré par une masse épaisse d'hémocytes. Mais ces cellules ne sont pas initialement disposées en couches. Le développement de la capsule nécessite plusieurs étapes : l'étalement de beaucoup de cellules, la sécrétion de substances dans les espaces intercellulaires et l'établissement de jonctions entre les cellules finalement la dégénérescence et la mort des cellules les plus internes. Considérons tout d'abord la sécrétion : un matériel fibrillaire contenant un mucopolysaccharide acide apparaît à la surface des cellules peu après le contact et le stimulus pour sa libération vient probablement de l'adhésion. Une autre substance, qui semble agir comme un ciment liant les cellules de la capsule entre elles, est sécrétée à un stade ultérieur : elle apparaît entre 12 et 24 heures après le début de la formation de la capsule. La sécrétion semble donc associée à l'étalement des cellules et pourrait être provoquée par cela. Venons-en aux contacts entre les cellules de la capsule : ces jonctions n'apparaissent pas durant les premiers stades de l'encapsulation et on n'en trouve pratiquement que dans les couches médianes. Elles semblent donc aussi associées à l'aplatissement extrême des hémocytes; mais on ignore si c'est la formation de contacts qui mène à l'étalement ou si c'est l'étalement qui conduit à la formation de jonctions. Comment expliquer l'aplatissement des cellules ? Selon Weiss (1958), les cellules qui adhèrent à un objet s'étalent généralement et s'étendent au maximum pour augmenter leur surface de contact. Il n'est pas difficile de comprendre pourquoi les cellules les plus internes ne s'étalent pas sur la surface du corps étranger : les hémocytes s'attachent à la surface en si grand nombre et la couvrent si fermement qu'aucune cellule ne pourrait s'étendre sans déloger une cellule adjacente. De plus, cet étalement extrême nécessite probablement de l'énergie; or les cellules internes sont de plus en plus séparées des réserves d'oxygène et de sub-

stances nutritives qui sont par contre beaucoup plus à la portée des cellules médianes; le dépôt simultané de ciment intercellulaire pourrait accentuer l'isolement des cellules internes et contribuer à la fois à leur étalement réduit et à la nécrose qui les affecte.

6. Déclin de la capsule

A partir du troisième jour, très peu de cellules s'attachent encore à la capsule. Le signal qui détermine l'affaiblissement et finalement l'arrêt de l'agrégation est inconnu : le nombre de cellules qui sécrètent le matériel finement fibrillaire de Reik pourrait décroître. Le seul indice du mécanisme du déclin de la capsule est la chronologie : le taux de recrutement d'attachement diminue quand les cellules médianes s'étaient et quand le ciment intercellulaire est sécrété; il s'annule quand ces processus sont terminés. Après avoir atteint sa taille maximale, la capsule commence à se rétrécir : ce changement de diamètre indique clairement que certains hémocytes sont capables de quitter la capsule et de rentrer dans la circulation. Dans le cas des cellules superficielles arrondies, il n'y a pas de problème; par contre le retrait des cellules extrêmement aplaties de la région médiane demande une explication (il en reste, oui, mais très peu). Bien que la sécrétion intercellulaire puisse agir comme un ciment, il ne peut s'agir d'un ciment rigide ou permanent. Comme on le voit, le nombre des problèmes à résoudre est important. Ils touchent aux mécanismes cellulaires fondamentaux, ce qui souligne tout l'intérêt biologique de l'étude des phénomènes d'encapsulation.

RESUME

Le but de ce travail est d'examiner les réactions de défense mises en oeuvre par les cellules sanguines (hémocytes) des Crustacés, lorsque des corps étrangers ont pénétré dans le milieu intérieur. Nos expériences ont été faites sur le crabe Carcinus maenas, L., un décapode brachyoure.

Trois types hémocytaires principaux peuvent être distingués d'après la richesse du cytoplasme en granules : les cellules hyalines, semi-granuleuses et granuleuses.

1. Après avoir quitté l'hémocoèle, le sang coagule rapidement de façon à obturer une plaie ouverte et à éviter tout saignement prolongé. L'obtention d'un échantillon sanguin conservant sa liquidité implique donc l'utilisation d'inhibiteur de la coagulation.

Les pH acides compris entre 5 et 6 arrêtent ou du moins freinent très nettement aussi bien l'agglutination des cellules que la gélification du plasma. L'agglutination ne dépend d'ailleurs pas de la présence du plasma car des hémocytes isolés gardent leur intégrité et leur indépendance dans un tampon phosphate à un pH variant entre 5 et 6. Leur morphologie se conserve cependant mieux lorsqu'ils baignent dans le plasma.

L'emploi simultané d'un pH acide et d'un chélateur du Ca^{++} comme l'EDTA se révèle plus efficace encore et réduit au minimum les déformations hémocytaires. Ce procédé est donc tout indiqué lorsqu'il s'agit d'examiner séparément les propriétés des cellules et du liquide plasmatique.

L' AMP_c , à une concentration de 10^{-2} M, inhibe également la coagulation mais étant donné le caractère acide de cette solution, il est probable qu'il ne s'agit pas là d'une action spécifique.

2. La phagocytose de petites particules est un phénomène courant chez les Crustacés, la nature chimique de ces particules joue cependant un rôle non négligeable. Les hémocytes captent plus

rapidement et plus fréquemment des particules de charbon actif ou des cellules de levure que des grains d'une poudre de carmin.

Le traitement préalable de ces différents corps par le plasma ne modifie pas le taux de phagocytose de telle sorte qu'un phénomène d'opsonisation n'a pu être mis en évidence sur notre matériel.

3. Un corps étranger (fil de coton, cheveu) implanté dans l'hémocoèle se voit rapidement encapsulé par les hémocytes de Carcinus. Complètement développée, la capsule est constituée de trois couches cellulaires : une couche interne de cellules plus ou moins arrondies ou étirées, souvent nécrosées et mélanisées; une couche médiane très importante de cellules fort aplaties, où l'on découvre également des faisceaux de microfilaments et de microtubules intra- et extra-cellulaires, tassés parallèlement à la surface de l'implant; une couche externe, lâche, constituée par des cellules bien rondes.

A proximité de ces capsules, nous avons trouvé des capsules-gaines et une série de beaux nodules lamellaires, comparables au point de vue structural aux capsules elles-mêmes. Il s'agit vraisemblablement de bactéries ou de particules étrangères introduites accidentellement dans l'hémocoèle lors de l'implantation et qui suscitent une réaction hémocytaire.

La mise en présence in vitro d'hémolymphe et d'un cheveu permet de suivre la progression des phénomènes observés in vivo; toutefois dans ce cas, nous n'avons pas constaté de mélanisation.

D'autre part la Sacculine est un des "parasites habituels" du crabe Carcinus. Sa présence stimule les hémocytes dans une certaine mesure mais n'aboutit pas à la formation d'une capsule, soit que le parasite neutralise les tentatives hémocytaires, soit qu'un mimétisme moléculaire lui permette d'éviter le déclenchement d'une réaction importante.

Ces résultats soulignent l'homogénéité des mécanismes de défense cellulaire dans l'embranchement des Arthropodes. Les réactions hémocytaires des Crustacés et des Insectes s'avèrent en effet parfaitement comparables.

BIBLIOGRAPHIE

- ADA, G.L., 1970. Transplant. Rev. 5, 105-129 (cité par Maramorosch et Shope - 1975).
- ANDRE, M., 1970. Les Ecrevisses françaises. Lechevalier. Paris.
- BANG, F.B., 1962. Serological aspects of immunity invertebrates. Nature, 196, 88-89.
- BANG, F.B., 1967. Defense reactions in invertebrates. Fed. Proc., 26, 1664-1715.
- BANG, F.B., 1967. Serological responses among invertebrates other than insects. Fed. Proc., 26, 1680-1684.
- BANG, F.B., 1971. A factor in crab amebocytes which stimulates in vitro clotting of crab blood. J. Invert. Pathol., 18, 280-283.
- BAUCHAU, A.G. - DE BROUWER, M.-B., 1972. Ultrastructure des hémocytes d'Eriocheir sinensis, Crustacé décapode brachyoure. J. Microsc., 15, 171-180.
- BAUCHAU, A.G. - DE BROUWER, M.-B., 1974. Etude ultrastructurale de la coagulation de l'hémolymphe chez les crustacés. J. Microsc., 19, 37-46.
- BAUCHAU, A.G. - DE BROUWER, M.-B. - PASSELECQ-GERIN, E. - MENGEOT, J. 1975. Etude cytochimique des hémocytes des Crustacés décapodes brachyoures. Histochemistry, 45, 101-113.
- BONAMI, J.R. - VAGO, C. - DUTHOIT, J.L., 1971. Une maladie virale chez les Crustacés décapodes due à un virus d'un type nouveau. C.R. Acad. Sci. Paris, 272, 2087-3088.
- BREHELIN, M. - HOFFMANN, J.A. - MATZ, G. - PORTE, A., 1975. Encapsulation of implanted foreign bodies by hemocytes in Locusta migratoria and Melolontha melolontha. Cell. Tiss. Res., 160, 282-289.

- CHENG, T.C., 1974. Electron microscope studies on reactions in molluscs to helminths. Proc. 3rd Inter. Congress Parasitol., Munich, 3, 1707-1708.
- CHENG, T.C. - CALI, A., 1974. An electron microscope study of the fate of bacteria phagocytized by granulocytes of Crassostrea virginica. Contemp. Top. Immunobiol., 4, 25-35.
- CHENG, T.C. - FOLEY, D.A., 1974. Morphology, hematologic parameters, and behavior of hemolymph cells of the Quahaug clam, Mercenaria mercenaria. Biol. Bull., 146, 343-356.
- CHENG, T.C., - RODRICK, G.E. - FOLEY, D.A. - KOEHLER, S.A., 1975. Release of lysozyme from hemolymph cells of Mercenaria mercenaria during phagocytosis. J. Invert. Pathol., 25, 261-265.
- CROSSLEY, A.C.S., 1964. An experimental analysis of the origins and physiology of hemocytes in the blue blow-fly Calliphora erythrocephala (Meig). J. Exp. Zool., 157, 375-398.
- CUENOT, L., 1895. Etudes physiologiques sur les crustacés décapodes. Arch. Biol., 13, 245-303.
- DALL, W., 1964. Studies on the physiology of shrimp Metapenaeus mastersii (Haswell). (Crustacea : Decapoda : Penaeidae) I. Blood constituents. Aust. J. Mar. Freshw. Res., 15, 145-161.
- DAMIAN, R.T., 1964. Molecular mimicry : antigen sharing by parasite and host and its consequences. Amer. Natur., 98, 129-149.
- DANNEEL, R., 1946. Melaninbildende Fermente bei Drosophila melanogaster. II. Nachweis einer Dehydrase Neuformulierung der Tyrosinase - Tyrosin - Reaktion. Biol. Zbl., 65, 115-119.
- DECLAIR, W. - VERCAUTEREN R., 1965. Activité phénoloxydasique dans les leucocytes de Crabe au cours du cycle d'intermue. Cah. Biol. Mar., 6, 163-172.

- DUCHATEAU, G. - FLORKIN, M., 1954. La coagulation du sang des Arthropodes. IV. Sur le fibrinogène et sur la "coaguline" musculaire du homard. Bull. Soc. Chim. Biol., 36, 295-305.
- ECKSTEIN, F., 1931. Uber Immunität bei Insekten. Anz. Sckäd-
lingsk., 7, 49-55.
- FAURE-FEMIET, E., 1927. Arch. Anat. Microbiol., 23, 99. (Cité par Maramorosch et Shope - 1975).
- FENG, S.V. - FENG, J.S. - BURKE, C.N. - KHAIRALLAH, L.H., 1971. Light and electron microscopy of the leucocytes of Crassaostrea virginica (Mollusca : Pelecypoda). Z.Zellforsch. Mikrosk. Anat., 120, 222-245.
- FOLEY, D.A., 1974. Studies on hemolymph cells of marine pelecypods. Ph.D.Thes., Lehigh University, Bethlehem, PA.
- FONTAINE, C.T. - LIGHTNER, D.V., 1973. Observations on the process of wound repair in Penaeid shrimp. J. Invert. Pathol., 22, 23-33.
- FRANCOIS, J., 1975. L'encapsulation hémocytaire expérimentale chez le lépisme Thermobia domestica. J. Insect. Physiol., 21, 1535-1546.
- GEORGE, W.C. - NICHOLS, J., 1948. A study of the blood of some Crustacea. J. Morph., 83, 425-440.
- GREGOIRE, C., 1951. Blood coagulation in arthropods. II. Phase contrast microscopic observations on haemolymph coagulation in sixty-one species of insects. Blood, 6, 1173-1198.
- GREGOIRE, C., 1964. Hemolymph coagulation. In Physiology of Insecta (ed. M. Rockstein), 3, 153-188. New York : Acad. Press.
- GRIMSTONE, A.V. - ROTHERAM, S. - SALT, G., 1967. An electron-microscope study of capsule formation by insect blood cells. J. Cell. Sci., 2, 281-292.
- HARDY, W.B., 1892. The blood corpuscles of the crustacea, together with a suggestion as to the origin of the crustacean fibrin-ferment. J. Physiol., 13, 165-190.

- HARRIS, K.R., 1974. Studies on encapsulation in Biomphalaria glabrata. Ph.D.Thes., Lehigh University, Bethlehem, PA.
- HARRIS, K.R. - CHENG, T.C., 1975. The encapsulation process in Biomphalaria glabrata experimentally infected with the Metastrongylid Angiostrongylus cantonensis : enzyme histochemistry. J. Invert. Pathol., 26, 367-374.
- HOLLANDE, A.C., 1930. La digestion des bacilles tuberculeux par les leucocytes du sang des chenilles. Arch. Zool. Exp. Gén., 70, 231-280.
- HOLTER, H., 1965. Passage of particles and macromolecules through cell membranes. Symp. Soc. gen. Microbiol., 15, 89-114.
- JONES, J.C., 1956. The hemocytes of Sarcophaga bullata Parker. J. Morph., 99, 233-257.
- JONES, J.C., 1962. Current concepts concerning insect hemocytes. Amer. Zool., 2, 209-249.
- KOLLMANN, M., 1908. Recherches sur les leucocytes et le tissu lymphoïde des invertébrés. Ann. Sci. Nat. Zool., 9, 1-238.
- LEUTENEGGER, R., 1967. Early events of Sericesthis iridescent virus infection in hemocytes of Galleria mellonella (L.). Virology, 32, 109-116.
- MARAMOROSCH, K. - SHOPE, R.E., 1975. Invertebrate immunity. New York Acad. Press.
- MATZ, G., 1965. Implantation de fragments de cellophane chez Locusta migratoria L. (Orthoptère). Bull. Soc. Zool., 90, 429-433.
- MC KAY, D. - JENKIN, C.R. - ROWLEY, D., 1969. Immunity in the invertebrates. I. Studies on the naturally occurring haemagglutinins in the fluid from invertebrates. Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 47, 124-134.

- MC KAY, D. - JENKIN, C.R., 1970. Immunity in the invertebrates. Correlation of the phagocytic activity of haemocytes with resistance to infection in the crayfish Parachaeraps bicarinatus. Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 48, 609-617.
- MC KAY, D. - JENKIN, C.R., 1970. The role of serum factors in phagocytosis of erythrocytes by haemocytes of the freshwater crayfish Parachaeraps bicarinatus. Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 48, 139.
- METALNIKOV, S., 1924. Phagocytose et réactions des cellules dans l'immunité. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 38, 787-826.
- METCHNIKOFF, E., 1892. Leçons sur la pathologie comparée de l'Inflammation. 239. Paris : Masson.
- MISKO, I.S., 1972. The cellular defense mechanisms of Periplaneta americana (L.). Ph.D.Thes. Australian National University.
- NEWSOME, J., 1967. Phagocytosis by human neutrophils. Nature, Lond., 214, 1092-1094.
- NOLF, P., 1909. Contribution à l'étude de la coagulation du sang. La coagulation chez les crustacés. Arch. Intern. Phys., 7, 411-461.
- NOSSAL, G.I.V. - ADA, G.L., 1972. Antigens Lymphoid Cells, and the Immune Response. New York. Acad. Press.
- ORICHEL, T.C., 1975. The peritrophic membrane : its role as a barrier to infection of the Arthropod host. 65-73 (cité par Maramorosch et Shope - 1975).
- PEREZ, C., 1904. Sur une Microsporidie parasite de Carcinus maenas. C.R. Séanc. Soc. Biol., 57, 214-215.
- POINAR, G.O. - LEUTENEGGER, R. - GOTZ, P., 1968. Ultrastructure of the formation of the melanotic capsule in Diabrotica (Coleoptera) in response to a parasitic nematode (Mermithidae). J. Ultrastruct. Res., 25, 293-306.

- POINAR, G.O., 1969. Immunity to parasitic animals. ed. G.J. Jackson, R.A. Herman, and I. Liner, 1, 173-210. New York. Applaton - Century - Crofts.
- RABIN, H., 1970. Hemocytes, hemolymph and defense reactions in Crustaceans. J. Reticuloendoth. Soc., 7, 195-207.
- RAVINDRANATH, M.H., 1973. The hemocytes of a millipede Thyropygus proxidon. J. Morph., 141, 257-268.
- RAVINDRANATH, M.H., 1974. The hemocytes of an isopod Ligia exotica Roux. J. Morph., 144, 11-22.
- REIK, L., 1968. Contacts between insect blood cells, with special reference to the structure of the capsules formed about parasites. M. Sc. Dissertation Cambridge Univ.
- ROOSEBOOM, M., 1937. Contribution à l'étude de la cytologie du sang de certains insectes, avec quelques considérations générales. Arch. Néerl. Zool., 2, 432-559.
- SALT, G., 1956. Experimental studies in insect parasitism. IX. The reactions of a stick insect to an alien parasite. Proc. Roy. Soc., B146, 93-108.
- SALT, G., 1963. The defence reactions of insects to metazoan parasites. Parasitology, 53, 527-642.
- SALT, G., 1965. Experimental studies in insect parasitism. XIII. The haemocytic reaction of a caterpillar to eggs of its habitual parasite. Proc. Roy. Soc., B 162, 303-318.
- SALT, G., 1966. Experimental studies in insect parasitism. XIV. The haemocytic reaction of a caterpillar to larvae of its habitual parasite. Proc. Roy. Soc., B 165, 155-178.
- SALT, G., 1968. The resistance of insect parasitoids to the defense reactions of their hosts. Biol. Rev., 43, 200-232.
- SALT, G., 1970. The cellular defence reactions of insects. Cambridge Monographs in Exp. Biol., 16.

- SHAPIRO, M., 1969. Immunity to Parasitic Animals ed. G.J. Jackson, R.A. Herman, and I. Singer, 1, 173-210. New York. Appleton - Century Crafts.
- SHAPIRO, H.C., 1975. Immunity in Decapod Crustaceans. Amer. Zool., 15, 13-19.
- SMITH, D.S., 1968. Insect cells, their Structure and Function. 372 pp. Edinburgh, Oliver et Boyd.
- SOLUM, N.O., 1970. Coagulation in Limulus. Some properties of the clottable protein of Limulus polyphemus blood cells in : Symposium of the Zoological Society of London, n° 27, 207-216.
- STEWART, J.E. - DINGLE, J.R. - ODENSE, P.H., 1966. Constituents of the hemolymph of the lobster Homarus americanus Milne Edwards. Can. J. Biochem., 44, 1447-1459.
- STUTMAN, L.J. - DOLLIVER, M., 1968. Mechanism of coagulation in Gecarcinus lateralis. Amer. Zool., 8, 481-489.
- TAIT, J., 1911. Types of crustacean blood coagulation. J. Mar. Biol. Assoc., U.K., 9, 191-198.
- TAIT, J. - GUNN, J.D., 1918. The blood of Astacus fluviatilis : a study of crustacean blood with special reference to coagulation and phagocytosis. Quart. J. Exp. Physiol., 12, 35-80.
- TONEY, M.E., 1958. Morphology of the blood cells of some Crustacea. Growth, 22, 35-50.
- UNESTAM, T. - WEISS, D.W., 1970. The host-parasite relationship between fresh water crayfish and the crayfish disease fungus Aphanomyces astaci : responses to infection by a susceptible and a resistant species. J. Gen. Microbiol., 60, 77-90.
- UNESTAM, T. - NYLUND, J.E., 1972. Blood reactions in vitro in crayfish against a fungal parasite, Aphanomyces astaci. J. Invert. Pathol., 19, 94-106.

- VAGO, C., 1966. A virus disease in Crustacea, Nature, 209, 1290.
- VEILLET, A., 1945. Recherche sur le parasitisme des Crabes et des Galathées par les Rhizocéphales et les Epicarides. Ed. Masson et Cie, Paris.
- VIVARES, C.P., 1973-73. Le parasitisme chez les Brachyoures (Crustacea, Decapoda) de la côte méditerranéenne française et des étangs du Languedoc-Roussillon. Vie Milieu, 23, 191-218.
- VON BRAND, T., 1973. Biochemistry of Parasites. New York. Acad. Press.
- WEISS, P., 1958. Cellcontact. Int. Rev. Cytol., 7, 391-423.
- WHITCOMB, R.F. - SHAPIRO, M. - GRANADOS, R.R., 1974. The physiology of Insects. Ed. M. Rockstein, New York, Acad. Press.
- WIGGLESWORTH, V.B., 1956. The haemocytes and connective tissue formation in an insect, Rhodnius prolixus (Hemiptera). Quart. J. Microsc. Sci., 97, 89-98.
- WOOD, P.J. - VISENTIN, S.P., 1967. Histological and histochemical observations of the hemolymph in the crayfish Orconectes virilis. J. Morph., 123, 559-567.
- WOOD, P.J. - PODLEWSKI, J. - SHENK, T.E., 1971. Cytochemical observations of hemolymph cells during coagulation in the crayfish Orconectes virilis. J. Morph., 134, 479-488.