

ETUDE SUR L'ULTRA-STRUCTURE DU PROTOPLASMA DES THROMBOCYTES AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

par

M. BESSIS ET M. BRICKA

avec l'assistance technique de

J. TABUIS

Laboratoire de Recherches du Centre National de Transfusion Sanguine, Paris (France)

Dans des travaux antérieurs^{1, 2} en collaboration avec M. BURSTEIN, nous avons signalé, que le protoplasma des thrombocytes étalés se prêtait très bien à l'étude au microscope électronique, étant donnée sa très faible épaisseur, et nous avons pu décrire une structure fibrillaire qui rappelait celle observée par A. CLAUDE et ses collaborateurs dans le cytoplasme des macrophages. Mais nous avons en outre, sur des préparations particulièrement réussies, précisé la morphologie de ces fibres, constituées par une succession de sphérules, et leur disposition tantôt radiée, tantôt circulaire.

La méthode dite de "l'ombrage" appliquée à ces préparations nous a permis de confirmer ces faits et d'obtenir des images très nettes, avec un très bon effet de relief³. Dans cette note, nous nous proposons de décrire d'une manière plus complète nos premiers résultats, d'indiquer les modifications observées en faisant varier les techniques de préparation, et de discuter brièvement la signification des images obtenues.

I. TECHNIQUE DES PRÉPARATIONS

La technique générale de préparation a déjà été décrite dans un travail antérieur^{1, 2}, les seules modifications apportées viennent de la fixation et de l'ombrage.

Fixation

Nous avons étudié l'action de divers fixateurs et de divers modes de fixation. L'alcool absolu, l'alcool-éther, le formol pur et à 0.8%, le formol-alcool, l'acide osmique en solution et en vapeurs, les sels de cuivre (selon FAURÉ-FREMIET⁴) ont été essayés. Nous avons fait agir ces différents fixateurs, soit en trempant directement la lame, après lavage dans le sérum physiologique, dans la solution du fixateur, soit en ne l'y trempant qu'après dessication. Les résultats de ces diverses fixations sont indiqués plus loin.

Ombrage

L'ombrage a été fait directement sur le frottis, avec de l'or; l'angle d'ombrage variait de 15° à 20°. D'après la quantité de métal utilisé (1 mg) et la distance du creuset à l'objet (60 mm environ), on peut considérer que la couche d'or ne dépasse pas 50 Å d'épaisseur.

Bibliographie p. 350.

II. RÉSULTATS DE L'OBSERVATION

Nous ne parlerons pas ici des formes circulantes et dendritiques des thrombocytes, pour lesquelles l'ombrage n'apporte que des images plus agréables à regarder, sans aucun détail nouveau (du moins avec nos techniques actuelles); cette étude se bornera à la description du hyalomère étalé sur le verre, à la manière du hyaloplasme de beaucoup de macrophages.

Nous rappellerons brièvement la description des images obtenues antérieurement: les thrombocytes étalés se présentent comme des plages arrondies ou ovalaires, comprenant une zone centrale très dense, arrondie également, dans laquelle sont groupés les grains du chromomère. Le hyalomère, qui entoure cette zone, présente une structure fibrillaire, comprenant des fibres radiées et, plus rarement, circulaires. Le pourtour de ces cellules est nettement plus dense que le reste du hyalomère. Sur quelques préparations particulièrement réussies, certaines fibres, apparaissent, formées par une succession de petites sphérules d'une taille de l'ordre de 0.1 microns, séparées les unes des autres par un mince pont de substance.



Fig. 1. Forme étalée de thrombocyte montrant les granules du chromomère rassemblés au centre de la cellule et la structure réticulée du hyalomère.



Fig. 2. Même cellule, à un plus fort grossissement montrant la structure des fibrilles cytoplasmiques.

Cependant, les résultats diffèrent sensiblement d'une préparation à l'autre et, en première approximation on peut les classer en trois grandes catégories, bien mises en évidence par l'ombrage. Les trois ordres d'images obtenues dépendent grossièrement de la technique de fixation, bien que nous ayons observé occasionnellement les trois aspects avec tous les fixateurs employés; mais des images semblables sont le plus souvent obtenues avec le même fixateur, aussi distinguerons-nous ces catégories d'après le fixateur employé.

1. Fixation à l'acide osmique

L'aspect obtenu évoque parfaitement le nom de "hyaloplasme". On constate une plage uniforme, semi-transparente, donnant l'impression d'une goutte de gélatine étalée, dans laquelle on ne distingue souvent aucune structure, mais quelquefois on observe

un léger relief granuleux et la présence d'une ou deux fibres circulaires ou, plus rarement, de fibres radiales. Le même aspect est observé sur des préparations séchées rapidement sans fixation.

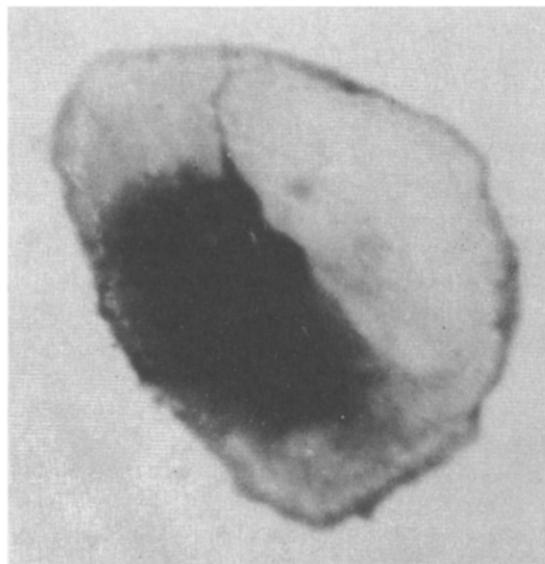


Fig. 3. Aspect hyalin du cytoplasme d'un thrombocyte étalé fixé à l'acide osmique.

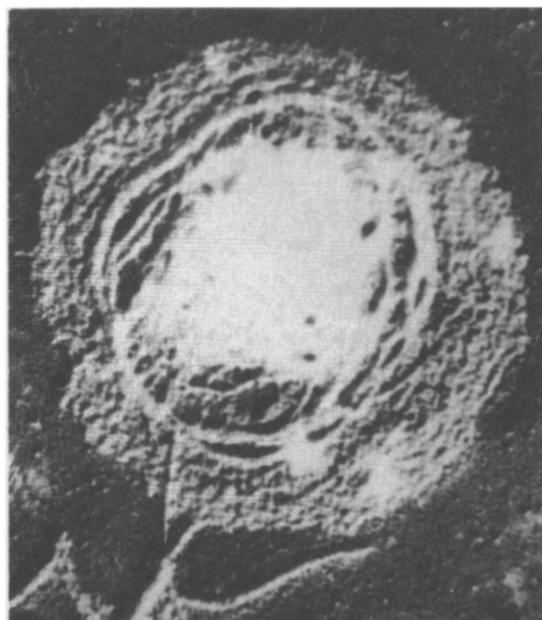


Fig. 4. Autre aspect de thrombocyte étalé fixé à l'acide osmique et ombré. Dans cette image, on voit particulièrement bien la structure granuleuse.

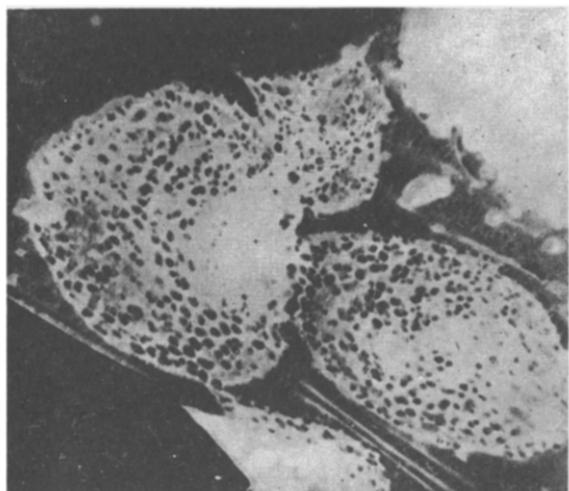


Fig. 5. Fixation au formol. Aspect de grossière structure alvéolaire.

à la matière vivante, et particulièrement la structure alvéolaire du cytoplasme et du noyau des globules blancs du sang observés récemment par REBUCK ET WOODS⁴.

3. Fixation à l'alcool absolu

Lorsque les cellules sont fixées à l'alcool absolu suivant la technique déjà décrite, on observe, après ombrage, des images très saisissantes. C'est en effet dans *presque toutes* les préparations que l'on voit très nettement les fibres composées de petites sphérolites, dont l'ombrage permet de préciser la morphologie.

1. *Les sphérolites* semblent parfaitement régulières, sauf dans quelques endroits, où elles affectent une forme légèrement ovoïde, mais que l'on peut penser due à deux éléments de différent diamètre situés très près l'un de l'autre.

En considérant diverses photographies, on peut admettre que le diamètre moyen de ces sphérolites est de 50 à 75 milli-microns, c'est-à-dire supérieur au diamètre moyen des macro-molécules (10 milli-microns) et voisin de celui des particules colloïdales (50 milli-microns).

2. *Les "ponts"* reliant les boules entre elles ont une longueur qui varie de 75 milli-microns dans des régions denses à 160 milli-microns dans des chaînes isolées et étirées. Il semble que leur épaisseur puisse descendre au 1/3 de celle des sphérolites.

3. *Les fibres radiales* ont une longueur de l'ordre d'un demi-diamètre de la cellule étalée (soit 1 à 2 microns).

4. *Les fibres arquées* ou circulaires sont constituées le plus souvent d'une seule chaîne de sphérolites, mais certaines préparations montrent des plaquettes présentant

Bibliographie p. 350.

2. Fixation au formol (à 1/50)

L'aspect obtenu le plus souvent est celui d'une nappe de substance plus ou moins homogène, bourrée de vacuoles arrondies ou ovalaires de toutes tailles, donnant un aspect spongieux. On reconnaît cependant une bordure légèrement plus dense, sans vacuoles. Ces images échappent à toute description précise, étant données l'absence de détails et la variabilité de la disposition des vacuoles. Elles rappellent la "structure alvéolaire" que beaucoup d'observateurs prétendent

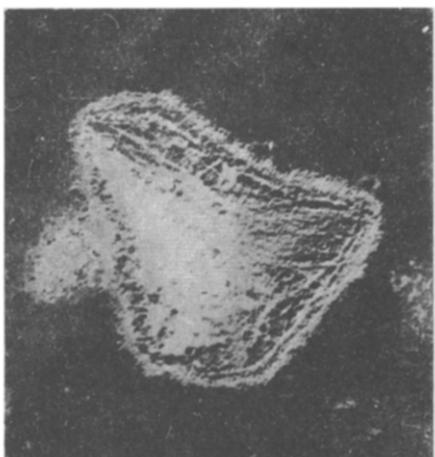


Fig. 6. Fixation au formol. Aspect de structure fibrillaire avec quelques alvéoles.

des fibres arquées ou entièrement circulaires, concentriques au pourtour de la cellule, pouvant atteindre l'épaisseur de 150 à 200 milli-microns (ce dernier aspect est souvent constaté sur les préparations fixées à l'acide osmique.)

5. Dans les *formes de transition* des plaquettes, on peut observer des *dendrites* fins, qui semblent pouvoir être assimilés à des fibres radiales pseudopodiques. Ceux-ci sont composés, suivant les cas, soit de 3 ou 4 chaînes isolées, soit quelquefois d'une seule chaîne dont les boules et les ponts sont parfaitement visibles.

6. Dans la plupart des thrombocytes étalés, on distingue une *bordure* plus dense composée de 5 à 10 rangées concentriques de petites sphérules tassées les unes contre les autres. On ne distingue pas, sur nos préparations, de ponts entre ces sphérules.

Enfin, dans quelques préparations, et surtout lorsque les plaquettes ont été fixées longtemps après l'étalement, on voit des *sphérules isolées* au pourtour des cellules et souvent très loin d'elles. Ces sphérules, *parfaitement* régulières, ont le même diamètre que celles qui sont intra-plaquettaire. La distance minima qui les sépare les unes des autres dépasse généralement 150 milli-microns. Il est intéressant de noter qu'après destruction des plaquettes par la poudre de verre selon la technique de M. BURSTEIN⁵, on retrouve dans le plasma un très grand nombre de ces sphérules, qui semblent donc avoir été libérées lors de la destruction.

III. DISCUSSION

Nous avons encore bien peu d'éléments pour discuter de la signification des images que nous venons de décrire; il s'agit très probablement dans tous les cas d'artéfacts: nous voulons dire par là de structures très différentes de celles qui doivent exister dans la cellule à l'état vivant; cependant, il semble que parmi tous ces artéfacts, (conditionnés naturellement par la structure réelle), certains soient plus près de la réalité.

a. Un grand nombre d'images montrent des fibres radiées, décelant une certaine orientation dans la structure du hyalomère. FAURÉ-FREMIET⁶, travaillant sur des cellules de plus grandes dimensions (amibocytes, macrophages) et grâce à certains artifices d'observation (auto-collimation) a pu constater, *in vivo*, de telles orientations du hyaloplasme. Il a observé également des sortes de vagues circulaires se propageant vers la périphérie et que la fixation lui permettait d'arrêter *in situ*. Certaines de nos microphotos montrent de telles vagues.

Ces aspects s'expliquent facilement si l'on pense que les cellules, pour passer de la forme circulante à la forme de repos, subissent une sorte d'écoulement radial dont les fibres précitées matérialisent les lignes de courant et les lignes d'émission.

b. Si la signification des fibres est assez évidente, l'interprétation de l'aspect globulaire rencontré dans la plupart des préparations est plus incertaine.

Ces petites sphères préexistent-elles dans la plaquette *in vivo*? Sont-elles le résultat d'une coagulation, les molécules protéiques se rassemblant lors de la fixation de centres d'attraction? Que l'on adopte l'une ou l'autre hypothèse, il semble bien que chaque sphérule est l'indice de l'existence d'un grain de matière au point correspondant.

Toutefois, qu'on les obtienne dans un étalement après action d'un fixateur quelconque, ou à l'état isolé par divers procédés de destruction des plaquettes (vieillissement, congélation, agitation avec de la poudre de verre), le diamètre des sphérules reste remarquablement constant. Ce serait là, peut-être, un argument en faveur de l'hypothèse de leur préexistence.

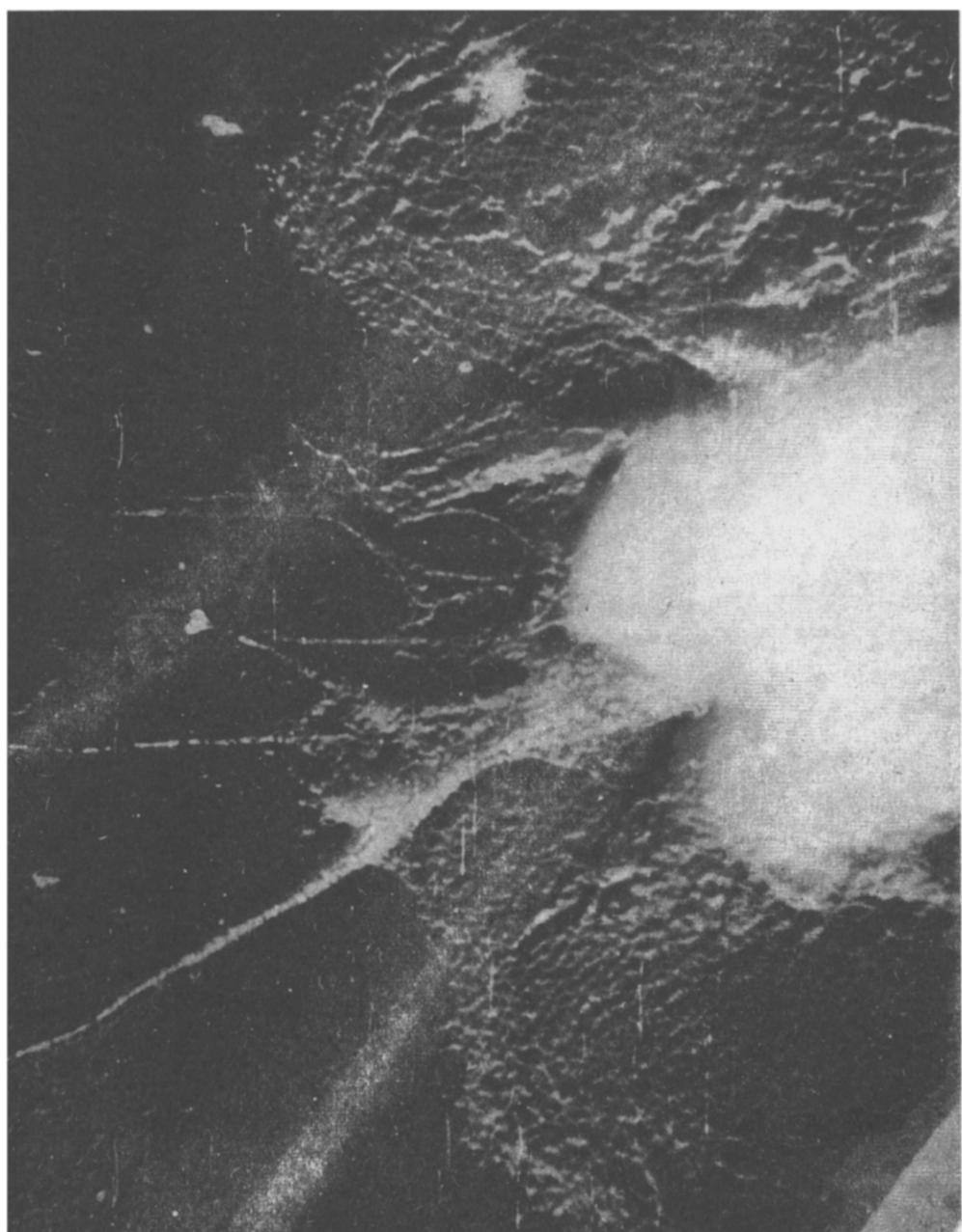


Fig. 7. 3 Thrombocytes étalés. Remarquer que celui du centre, incomplètement étalé, montre des dendrites formés d'une scelle charne de sphérules.

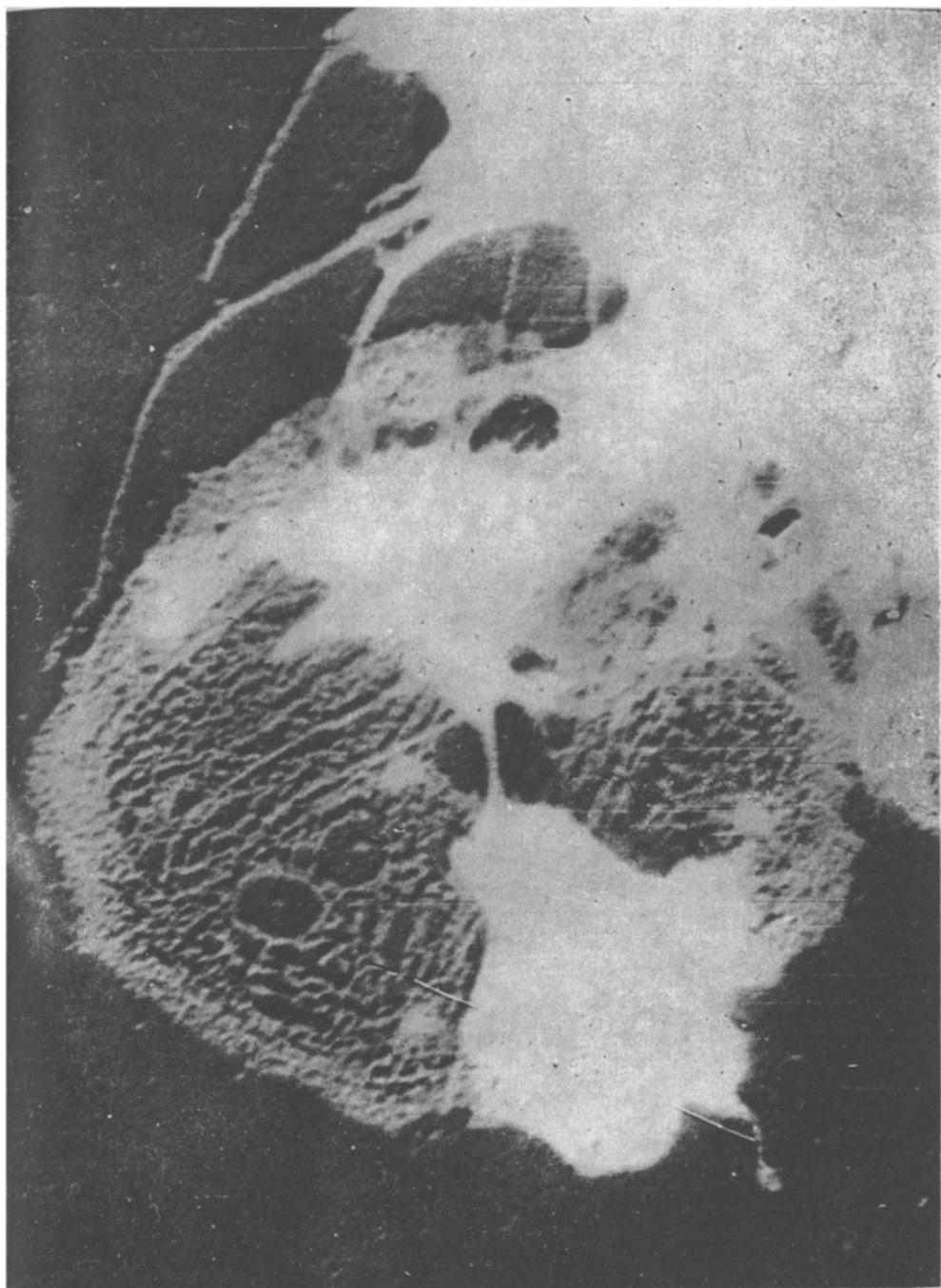


Fig. 8. Hyaloplasme de thrombocyte montrant le bord cellulaire et deux plages arondies centrées par un point. ("Petits corps" antérieurement décrits?)

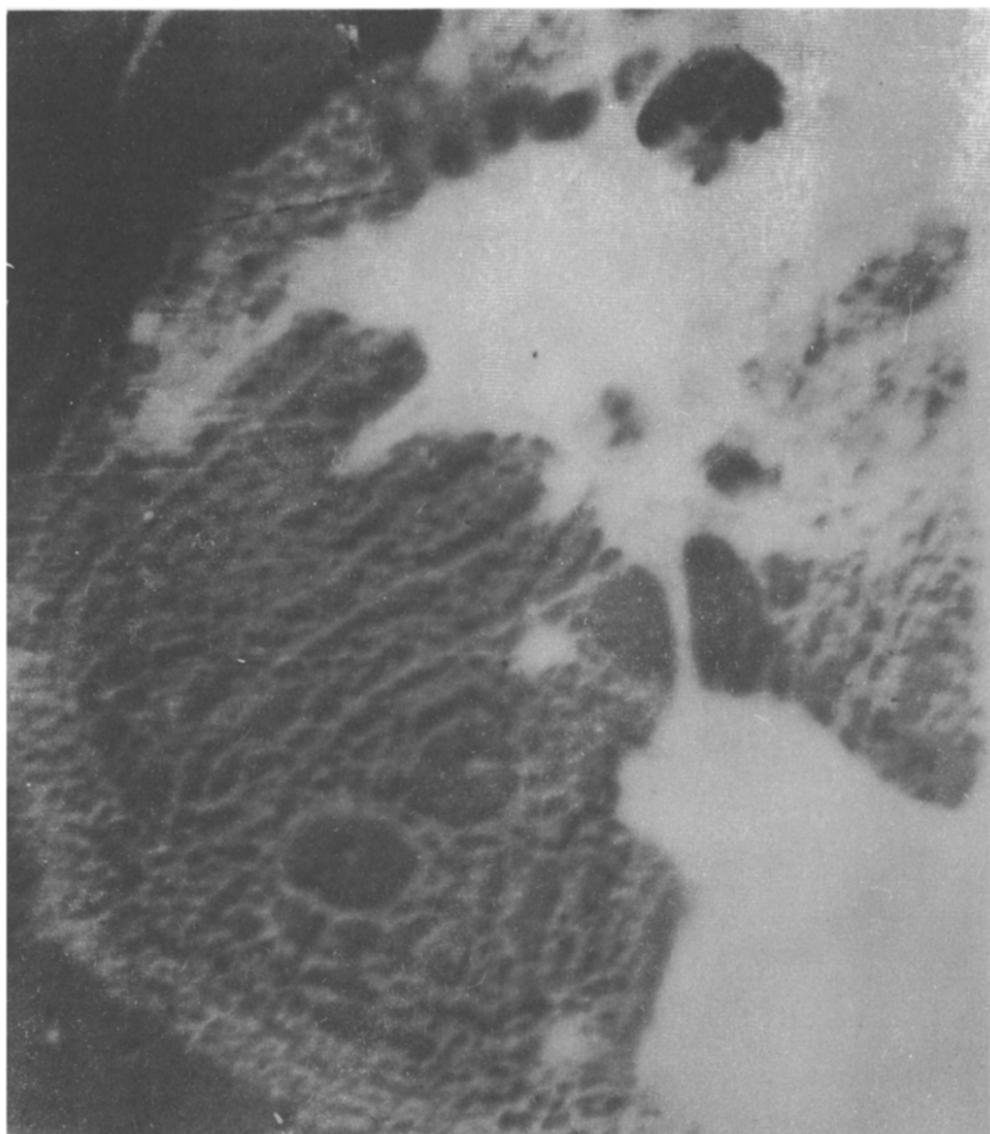


Fig. 9. Même image à un plus fort grossissement.

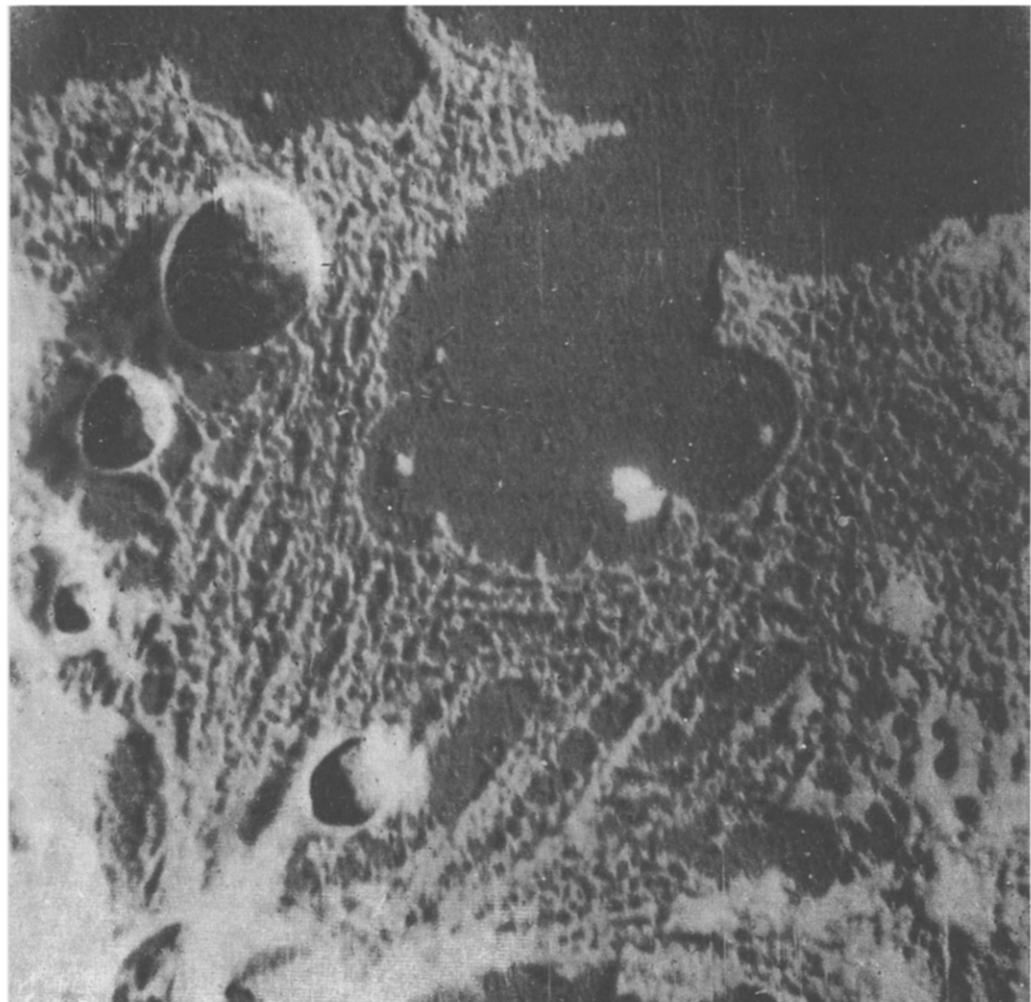


Fig. 10. Autre hyaloplasme étalé de thrombocyte.



Fig. 11. Sphérides isolées hors des thrombocytes.



Fig. 12. Sphérides isolées, dans le plasma après destruction des thrombocytes par la poudre de verre (technique de BURSTEIN).

Il est assez probable que ces sphérules correspondent aux "microsomes" de A. CLAUDE⁷, qui, pour cet auteur, sont l'un des constituants généraux de tout protoplasma. Signalons enfin la grande similitude des résultats que nous avons obtenus avec ceux obtenus par d'autres auteurs sur des objets biologiques différents: FAURÉ-FREMIET ET BESSIS⁸, ont constaté la même structure dans le protoplasma des amibocytes de triton et d'escargot: HALL et ses collaborateurs⁹ dans la structure du muscle, REED ET RUDALL¹⁰ dans celle de la cuticule du ver de terre.

RÉSUMÉ

Le protoplasma des thrombocytes étalés est étudié avec la technique de l'ombrage.

Le protoplasma des plaquettes sanguines se présente différemment suivant les fixations. *Grosso modo*, on peut distinguer un aspect hyalin du cytoplasme observé après fixation à l'acide osmique, un aspect alvéolaire observé surtout après fixation au formol dilué, et enfin un aspect fibrillaire observé surtout après fixation à l'alcool absolu. (Le problème de la fixation des objets biologiques doit donc être reconstruit pour l'étude au microscope électronique).

Les images données par la dernière technique citée sont décrites plus en détail. On constate :

- a. Que le protoplasma des thrombocytes étalés est formé d'un réseau de fibrilles s'étendant dans deux directions, les unes radiées, les autres circulaires ou arquées; la périphérie semble formée de la juxtaposition de plusieurs fibrilles arquées.
- b. Ces fibrilles sont constituées par de petites sphérules de 50 à 75 milli-microns, reliées entre elles par de minces ponts de matière.
- c. On constate un certain nombre de sphérules disséminées autour des plaquettes.
- d. Ces sphérules isolées augmentent considérablement en nombre lorsque les plaquettes sont détruites par autolyse ou après agitation avec de la poudre de verre.

Dans la discussion sont envisagées la signification de ces aspects, et en particulier celle des sphérules qui semblent se retrouver dans tout protoplasma et correspondre peut-être aux "microsomes" de A. CLAUDE.

SUMMARY

The protoplasm of spreaded thrombocytes has been studied by the shadow technique.

Depending upon the fixation the protoplasm of the platelets has a different aspect. *Grosso modo* we may distinguish a hyaline aspect of the cytoplasm observed after fixation by osmic acid, an alveolar aspect observed especially after fixation by diluted formol and, lastly, a fibrillar aspect seen after fixation by absolute alcohol (the fixation of the biological objects must therefore be reconsidered by a study with the electronic microscope).

The pictures given by this last technique have been described more in detail. One can see :

- a. That the protoplasm of the spreaded thrombocytes is composed of a network of small fibres spreading in two directions, some radiating, and others circular or curved; the periphery seems to be formed by the pre-fixation of many small curved fibres.
- b. Those small fibres are composed of little spheres, 50/75 millimicrons large, joined by small bridges of material.
- c. A small number of scattered little spheres are seen around the platelets.
- d. The isolated spherules increase greatly when the platelets are destroyed by autolysis or after shaking with glass powder.

In the discussion the significance of these aspects is regarded and particularly the significance of the little spheres which seem to be formed in each protoplasm and perhaps correspond to the "microsomes" of A. CLAUDE.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Protoplasma ausgeschmierter Thrombozyten wurde mit dem Schattenverfahren untersucht.

Je nach der Fixierung bietet das Protoplasma der Blutplättchen einen verschiedenen Anblick. Im grossen und ganzen können wir einen Hyalinaspekt des Zytoplasmas nach Fixierung mit Osmiumsäure, einen Alveolaraspekt insbesondere nach Fixierung mit verdünntem Formol und schliesslich einen Fibrillaraspekt vor allem nach Fixierung mit absolutem Alkohol unterscheiden. (Das Problem der Fixierung biologischer Objekte muss also durch Untersuchung mit Hilfe des Elektronenmikroskops neu betrachtet werden).

Die mit Hilfe der letzterwähnten Methode erhaltenen Bilder werden ausführlicher beschrieben. Es wird festgestellt:

a. Dass das Protoplasma ausgeschmierter Thrombozyten aus einem Fibrillennetzwerk besteht, das sich in zwei Richtungen ausdehnt, wobei die einen radial, die anderen kreis- oder bogenförmig verlaufen; die Peripherie scheint durch Aneinanderlegen mehrerer bogenförmiger Fibrillen gebildet zu werden.

b. Diese Fibrillen bestehen aus kleinen Kugelchen von 50–75 m μ , die untereinander durch dünne Stoffbrücken verbunden sind.

c. Eine gewisse Anzahl Kugelchen befindet sich verstreut rundum die Plättchen.

d. Die Zahl dieser isolierten Kugelchen nimmt bedeutend zu, wenn die Plättchen durch Autolyse zerstört werden, oder nach Schütteln mit Glaspulver.

In der Diskussion wird die Bedeutung dieser Funde und insbesondere die der Kugelchen, die in jedem Protoplasma vorzukommen scheinen, betrachtet, welche mit den "Mikrosomen" von A. CLAUDE identisch zu sein scheinen.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ M. BESSIS ET M. BURSTEIN, *Compt. rend. soc. biol.*, 142 (1948) 27.
- ² M. BESSIS ET M. BURSTEIN, *Rev. Hémat.*, 3 (1948) 48.
- ³ M. BESSIS, *Compt. rend. soc. biol.*, 142 (1948) (sous presse).
- ⁴ W. REBUCK ET L. WOODS, *Blood*, 3 (1948) 175.
- ⁵ M. BURSTEIN, *Rev. Hémat.*, 2 (1947) 498.
- ⁶ E. FAURÉ-FREMIET, *Protoplasma*, 6 (1929) 522.
- ⁷ A. CLAUDE, *Science*, 97 (1943) 451; In *Frontiers in Cytochemistry*, N. L. Hoerr, editor; *J. Expt. Med.*, 84 (1946) 51–89.
- ⁸ E. FAURÉ-FREMIET ET M. BESSIS, Communication au Congrès International de Zoologie, Paris 1948 (sous presse).
- ⁹ C. E. HALL, M. A. JAKUS ET F. O. SCHMITT, *Biol. Bull.*, 90 (1946) 32.
- ¹⁰ R. REED ET K. M. RUDALL, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 7.

Reçu le 24 juin 1948