

M. SAUCIN-MEULENBERG, J.C. BUSSERS et Ch. JEUNIAUX

Université de Liège
Institut Ed. Van Beneden
Laboratoire de Morphologie, Systématique
et Ecologie animales

COMPOSITION CHIMIQUE DE LA THEQUE DE QUELQUES THECAMOEBIENS (PROTOZOAIRES)

ABSTRACT

The thecae of 7 species of Thecamoeba, belonging to 3 different families (Arcellidae, Plagiopyxidae, Diffugiidae) have been submitted to some chemical tests. In one species of Arcella, the theca was not mineralized; the inorganic constituents of the thecae of the 6 other species have been identified as SiO_2 . In 4 species, the silica flakes were protected by an organic cover, which explains the resistance offered by the thecae to fluorhydric acid.

In the 7 species so far studied, the organic cement was found to be proteic in nature, and to be devoid of chitin or cellulose

INTRODUCTION

Les Protozoaires Thécamoebiens sont caractérisés par la possession d'une thèque dont la morphologie dans les différents groupes systématiques est bien connue, mais dont la nature chimique est loin d'être précisée. Selon la provenance intra- ou extra-cytoplasmique des éléments inorganiques incorporés à la thèque, on distingue classiquement les thèques endogènes et les thèques exogènes.

Dans le cas des thèques exogènes, les éléments inorganiques sont le plus souvent considérés comme siliceux (Deflandre, 1953), sans arguments expérimentaux; la nature du ciment organique est inconnue. Dans le cas des thèques endogènes, la présence de constituants inorganiques a peu préoccupé les auteurs, mais la portion organique de ces thèques a fait l'objet de quelques travaux.

Awerinzew (1907) considère que la thèque des Thécamoebiens est faite d'une substance riche en soufre, rappelant la kératine, qu'il dénomme « pseudochitine », ainsi que de silice en quantité variable. Cambar et coll. (1963), étudiant la microstructure de la thèque de quelques espèces d'*Arcella*, montrent l'existence d'un réseau microprismatique

(Bull Biol. Fr. Belg., 1943, 107, 107-113)

de nature organique, ultérieurement comblé par un « composé organo-siliceux ». Jeuniaux (1963) signale la présence de chitine (1,6 % du poids sec) dans un lot de Plagiopyxidae extraits d'une litière forestière. Pour Charret (1964), la thèque d'*Hyalosphenia papilio* contient une mucoprotéine. Enfin, Moraczewsky (1971) analyse la thèque d'*Arcella discoïdes* par histochimie et chromatographie: la thèque semble démunie de mucopolysaccharides et est riche en protéines ressemblant à la kératine.

Il apparaît clairement que ces données sont éparées et contradictoires. De plus, la présence de chitine chez les Plagiopyxidae, signalée par l'un de nous (Jeuniaux, 1963), reste douteuse à cause de la nature exogène des thèques et du manque d'homogénéité du matériel analysé (1). De nouvelles recherches sur la composition chimique des thèques des Thécamoebiens s'imposait donc; tel est l'objet du présent travail.

MATERIEL ET METHODES

1. Espèces étudiées.

Les espèces suivantes ont été examinées (2): famille des Arcellidae: *Arcella* sp., *Arcella hemisphaerica* Perty et *Arcella catinus* Pénard; famille des Difflogiidae: *Difflogia acuminata* Ehr. et *Pontigulasia bigibbosa* Pénard; famille des Plagiopyxidae: *Plagiopyxis callida* Pénard et *Plagiopyxis declivis* Thomas.

Seule, *Arcella hemisphaerica* a été tenue en culture en lame creuse, dans de l'eau de source (« Spa Reine »), avec *Chilomonas paramecium* et *Aerobacter aerogenes* comme source de nourriture. Dans ces conditions, un clone a été maintenu pendant 6 mois, de manière à obtenir un nombre de thèques suffisant pour des analyses quantitatives, auxquelles nous avons dû renoncer, étant donné que le poids sec de 2 000 thèques était de 0,22 mg, ce qui est très inférieur aux poids obtenus par Moraczewsky (1971).

Les autres *Arcella* et les Difflogiidés ont été récoltés à partir d'eaux de mares des environs de Liège. Les Plagiopyxidés ont été extraits à l'aide du microséparateur de Chardez (1959) d'une litière de pessière des environs de Spa. Toutes les thèques ont été soigneusement triées et isolées au moyen de micropipettes sous le contrôle de la loupe binoculaire, puis lavées dans de l'eau de source.

2. Recherche de constituants inorganiques.

La présence de calcaire a été recherchée par l'action solubilisante de l'acide chlorhydrique normal. La silice a été recherchée par un test

(1) La méthode de microséparation de Chardez (1959) utilisée pour préparer le lot de thèques de Thécamoebiens étudiées par l'un de nous (JEUNIAUX, 1963) permet d'extraire facilement un grand nombre de thèques contenues dans un échantillon de sol, mais n'élimine pas nécessairement tous les débris.

(2) Nous adressons nos plus vifs remerciements à M. D. CHARDEZ, de l'Institut Agronomique de Gembloux, qui a aimablement accepté d'identifier toutes les espèces étudiées à l'exception de la première qui ne lui a pas été envoyée.

de solubilisation dans l'acide fluorhydrique. Pour ce test, la petite taille des thèques nous a conduits à employer la méthode suivante adaptée de Bronte Gatenby et Beams (1950).

Les thèques sont incluses dans un très mince film de celloïdine (1) en compagnie de grains de silice comme témoin. Le film de celloïdine est transféré dans l'alcool 96° additionné d'acide fluorhydrique (concentration finale d'environ 2.8 %) et y séjourne pendant 2 heures. Un lavage dans l'alcool 96° saturé en carbonate de lithium et de nombreux lavages à l'alcool puis à l'eau précèdent l'observation des thèques traitées puis la dissolution du film par le mélange alcool-éther et la récupération éventuelle des objets.

La disparition ou la perte de rigidité des thèques après l'un ou l'autre de ces traitements permet de conclure à la présence de carbonate ou de silice.

Dans un cas douteux, nous avons fait appel à la spectographie par rayons X (méthode des poudres) (2) pour la mise en évidence de la silice.

3. Recherche de constituants organiques.

Les protéines ont été mises en évidence par la réaction du biuret effectuée sur des thèques in toto avant et après désilicification.

Pour la recherche de polysaccharides de structure du type chitine ou cellulose, nous avons utilisé une méthode (Bussers et Jeuniaux, 1973) basée sur l'utilisation d'enzymes purifiés et concentrés. Avant de soumettre le matériel étudié à l'action spécifique des enzymes, on élimine les protéines associées aux polysaccharides de structure (« démasquage ») en traitant ce matériel par NaOH N à 100 °C ; on repère les structures résistantes, qui sont devenues parfaitement transparentes, en les colorant par le Rouge Congo (conc. finale : 1 ‰). La chitine et la cellulose se colorent rapidement et intensément, ce qui permet d'observer éventuellement l'altération de la forme de la structure étudiée, et de transvaser le matériel dans les solutions enzymatiques.

RESULTATS

1. Arcellidés.

a) *Arcella hemisphaerica*.

La thèque résiste dans l'eau bouillante, dans NaOH N à 20° et à 70°, mais est détruite après 3 heures dans le même réactif à 100° (la coloration au Rouge Congo ne fait apparaître aucune structure résiduelle).

(1) La manipulation aisée du film de celloïdine évite les dommages causés à l'observateur et aux appareils d'optique par les vapeurs d'acide fluorhydrique.

(2) Cette analyse spectrographique a été réalisée au laboratoire de chimie analytique de l'Université de Liège (Professeur G. DUYCKAERTS), grâce à la grande amabilité de M. J. FUGER, Professeur associé, que nous remercions vivement.

Le traitement par HCl N ne modifie en rien la thèque, tandis que l'acide fluorhydrique la décolore et la ramollit sensiblement. La réaction du biuret est positive.

b) *Arcella sp.*

La thèque résiste dans l'eau bouillante, dans NaOH N à 20°, 70° et 100° pendant 3 heures, ainsi que dans H₂SO₄ concentré à froid.

Après traitement par l'acide fluorhydrique, elle devient souple et est alors rapidement détruite dans NaOH N à 100 °C. La réaction du biuret est positive.

c) *Arcella catinus.*

La thèque résiste dans l'eau bouillante et dans NaOH N à 20 °C ; à 70°, elle est rapidement ramollie puis détruite. La thèque n'est pas altérée dans HCl N ni dans l'acide fluorhydrique. La réaction du biuret est positive.

Les thèques des 3 espèces examinées ne manifestent pas la même résistance aux agents chimiques ; elles possèdent donc des constitutions différentes. Aucune coque ne contient de carbonates en quantité appréciable. Les thèques d'*Arcella hemisphaerica* et d'*Arcella sp.* sont imprégnées de silice, tandis que celle d'*Arcella catinus* en est dépourvue. La rigidité sensiblement équivalente des thèques des 3 espèces n'est donc pas entièrement due à l'imprégnation par la silice.

Les 3 thèques contiennent des protéines et sont toutes dépourvues de chitine et de cellulose, du moins sous forme d'une strate continue.

La différence de réaction au traitement par NaOH N à 100° peut s'expliquer de la façon suivante : la structure microprismatique étudiée par Cambar et coll. (1963) est complètement englobée par la silice dans le cas d'*Arcella sp.* de sorte que la soude n'a pas d'action directe sur les protéines de structure de cette thèque. Chez *Arcella hemisphaerica* et *Arcella catinus*, le ciment organique joignant les prismes n'est pas imprégné de silice, et est donc détruit plus ou moins facilement dans la soude à chaud.

2. Plagiopyxidés.

Les Thécamoebiens du sol possèdent une thèque exogène faite de minces paillettes transparentes de nature inconnue.

Les thèques de Plagiopyxidés résistent sans modification visible dans l'acide fluorhydrique, dans HCl N et 6 N et dans HNO₃ 3 N. Dans H₂SO₄ 18 N à froid, les paillettes se détachent progressivement ; elles restent intactes mais le ciment qui les unissait est détruit. Ces mêmes paillettes inorganiques, récoltées après dislocation des thèques par H₂SO₄, sont rapidement solubilisées par l'acide fluorhydrique.

La spectrographie par rayons X appliquée à des thèques des deux espèces fournit un spectre de diffraction tout à fait typique de la silice

(voir fig. 1); les paillettes sont donc siliceuses et leur résistance initiale à l'acide fluorhydrique peut s'expliquer par le fait qu'elles sont recouvertes d'un « vernis » organique non perméable à cet acide.

Le ciment et le vernis organiques qui constituent la matrice organique rigide de la thèque résistent dans l'eau bouillante, dans NaOH N à 20 °C, mais sont détruits par NaOH N à 100 °C. L'addition de Rouge Congo ne permet de déceler aucune structure résiduelle. Les thèques ne contiennent donc pas de chitine, ni de cellulose.

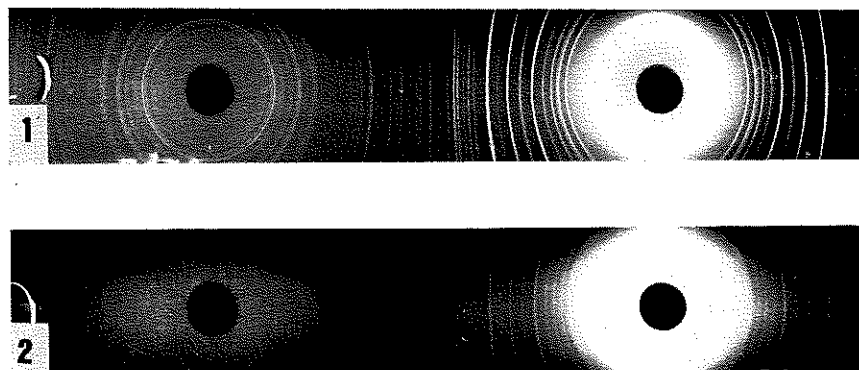


Fig. 1. — Spectres obtenus par diffraction des rayons X par des cristaux de quartz (1) et par les paillettes (2) de la thèque de 2 espèces de *Plagiopyxis*.

Le cercle noir de gauche correspond à l'orifice d'entrée des rayons X, et celui de droite à la sortie des rayons non diffractés. Chacune des circonférences entourant l'orifice de sortie correspond à des rayons diffractés par différentes faces des cristaux.

Les 2 spectres sont identiques et indiquent la même nature cristalline et chimique.

La réaction du biuret donne une réponse positive : ces structures organiques contiennent donc des protéines.

3. Diffugiidés.

Les deux espèces étudiées vivent dans les mares et possèdent une thèque exogène faite de grains cristallins très irréguliers.

L'acide chlorhydrique ne produit aucune modification visible. L'acide fluorhydrique dissout rapidement les grains de la thèque de *Difflogia acuminata* tandis que la thèque de *Pontigulasia bigibbosa* résiste parfaitement. Comme dans le cas des Plagiopyxidés (voir ci-dessus), on peut détruire le « vernis » protecteur par la soude à 100 °C ou par H₂SO₄ 18 N à froid, ce qui permet la dissolution ultérieure des grains cristallins de la thèque sous l'action de l'acide fluorhydrique.

Le ciment organique présent dans les deux thèques, de même que le vernis de *Pontigulasia*, sont rapidement hydrolysés par NaOH N à 70 °C; ils sont donc dépourvus de chitine et de cellulose. Il est impos-

sible de savoir si ces structures sont protéiques car la réaction du biuret n'est pas utilisable ici, à cause des phénomènes de réfraction produits par la grande taille et l'épaisseur irrégulière des grains constitutifs de la thèque, qui empêchent d'apprécier une éventuelle coloration du ciment organique.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Au vu des résultats qui viennent d'être résumés, on constate une certaine hétérogénéité entre les 7 espèces en ce qui concerne la composition inorganique des thèques, tandis que la composition organique apparaît au contraire très homogène.

1. Composition inorganique.

Les thèques étudiées sont dépourvues de carbonates. La silice est présente dans deux des trois thèques endogènes (*Arcella*); elle constitue les paillettes (*Diffugiidae*) ou les grains (Thécamoebiens) des quatre thèques exogènes examinées. Seule, *Arcella catinus* possède une thèque non minéralisée.

La silice est protégée par un « vernis » organique chez plusieurs espèces (*Arcella sp.*, *Plagiopyxis callida*, *P. declivis* et *Pontigulasia bigibbosa*).

Outre les différences observées ici, on ne peut exclure pour d'autres espèces l'intervention de la nature des roches de l'habitat, ou de la composition des eaux.

2. Composition organique.

La matrice organique des thèques des 7 espèces étudiées est rapidement dégradée par la soude normale à 70 °C ou à 100 °C. L'addition de Rouge Congo, colorant de repérage idéal pour la chitine et la cellulose, n'a jamais permis de retrouver trace d'une structure organique quelconque. Les thèques étudiées sont donc dépourvues de chitine et de cellulose, du moins sous forme d'une enveloppe ou d'une strate continue. Les termes « chitineux », « chitinoïde », etc., habituels dans la littérature, sont donc abusifs. La présence de chitine dans un lot de *Plagiopyxidae*, signalée par l'un de nous (Jeuniaux, 1963) était vraisemblablement due à des contaminations (fragments de cuticules d'Arthropodes) dans l'échantillon non trié qui avait été employé.

La matrice organique donne une réaction positive au test du biuret et se dissout dans la soude normale; elle contient donc toujours des protéines, qui forment une enveloppe continue chez les *Arcellidés*, chez les *Plagiopyxidés* et chez *Pontigulasia bigibbosa*. Chez *Diffugia acuminata* au contraire, la matrice organique protéique forme seulement un réseau joignant les grains de silice. Dans plusieurs cas, la matrice organique englobe ou recouvre partiellement les paillettes de silice. Ces résultats confirment les observations de Moraçzewky (1971) sur un *Arcella discoides*, Ehr.

3. Il est curieux de rapprocher les résultats de nos observations de ce que l'on sait de la constitution chimique des productions métaplasmatiques d'autres Rhizopodes. On sait que certains kystes d'amibes sont chitineux (*Pelomyxa illinoensis*, Sachs, 1954), mais que d'autres sont de nature cellulosique (*Acanthamoeba* sp., Neff et Benton, 1962 ; Tomlinson, 1963 ; Neff, Benton et Neff, 1964 ; *Naegleria gruberi*, Werth et Kahn, 1967 ; *Hartmannella castellanii*, Griffiths et Hughes, 1968). Le Foraminifère *Allogromia oviformis* élabore un test chitineux (Jeuniaux, 1963).

Cette hétérogénéité de composition chimique entre les divers types de membranes métaplasmatiques au sein des Rhizopodes est en accord avec l'opinion de nombreux auteurs au sujet du polyphylétisme de cette classe.

RÉSUMÉ

Les thèques endogènes ou exogènes de 7 espèces de Thécamoebiens, appartenant à 3 familles différentes (Arcellidae, Plagiopyxidae, Difflogiidae) ont été soumises à quelques tests d'analyse chimique. Chez une espèce d'*Arcella*, la thèque n'est pas minéralisée ; dans les autres cas, la fraction minérale est constituée de silice. Chez 4 espèces, les paillettes de silice sont protégées par un « vernis » organique, ce qui explique la résistance des thèques à l'acide fluorhydrique.

Chez les 7 espèces étudiées, la matrice organique des thèques est de nature protéique, et ne contient ni chitine ni cellulose.

BIBLIOGRAPHIE

- AWERINZEW (S.), 1909. — Die Struktur und die chemisch Zusammensetzung der Gehäuse bei den Süsswasserhizopoden. *Arch. f. Protistenkunde*, 8, 91.
- BRONTE GATENBY (J.) et BEAMS (H.W.), 1950. — *The microtometist's Vade Mecum*, J.A. Churchill Ed. London.
- BUSSERS (J.C.) et JEUNIAUX (Ch.), 1973. — Chitinous cuticle and Systematic Position of Tardigrada. *Biochem. Systematics*, 1, 77.
- CAMBAR (R.), THOMAS (R.) et LE BLANC (M.), 1963. — Recherches sur la constitution de la thèque des Arcelles : observation au microscope électronique. *C.R.Ac.Sc.*, Paris, 256, 1364.
- CHARDEZ (D.), 1959. — Thécamoebiens des terres de Belgique. *Hydrobiologia*, 14, 72.
- CHARRET (R.), 1964. — Contribution à l'étude cytologique et biologique de *Hyalosphenia papilio*, rhizopode testacé. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 98, 369.
- DEFLANDRE (G.), 1953. — Thécamoebiens, dans *Traité de Zoologie* de GRASSÉ, I, n° 2, Masson, Editeur, Paris.
- GRIFFITHS (A.J.) et HUGHES (D.E.), 1968. — Starvation and encystment of a soil amoeba, *Hartmannella castellanii* ; *J. Protoz.*, 15, 673.
- JEUNIAUX (Ch.), 1963. — *Chitine et chitinolyse*, Masson, Paris.
- MORACZEWSKY (J.), 1971. — La composition chimique de la coque d'*Arcella discoïdes* Ehr. *Acta Protozoologica*, 7, 407.
- NEFF (R.J.) et BENTON (W.F.), 1962. — Localisation of cellulose in the cysts of *Acanthamoeba* sp.. *J. Protoz.*, 9, suppl. 11.
- NEFF (R.J.), BENTON (W.F.) et NEFF (R.H.), 1964. — The composition of the mature cyst wall of the soil amoeba *Acanthamoeba*. *J. of Cell Biol.*, 23, 66 A.
- SACHS (J.B.), 1954. — The chemical nature of the cyst membranes of *Pelomyxa illinoensis*, *J. Protoz.*, 1, suppl. 8.
- TOMLINSON (G.), 1963. — Mechanism of cyst wall formation in *Acanthamoeba* sp. ; *Diss. Abstracts*, 23 (9), 3452.
- WERTH (J.M.) et KAHN (A.J.), 1967. — Isolation and preliminary chemical analysis of the cyst wall of the amoebflagellate *Naegleria gruberi*. *J. Bacteriol.*, 94, 1272.