

(Communication reçue le 13 mars 1970.)

**DONNÉES COMPLÉMENTAIRES
SUR LA LOCALISATION DE LA CHITINE
DANS LES ENVELOPPES DES ŒUFS
DE ROTIFÈRES**

par A. PIAVAUX (*) et N. MAGIS
Université de Liège, Institut Ed. Van Beneden
Laboratoire de Morphologie
Systématique et Écologie animales

RÉSUMÉ

En utilisant des solutions de chitinases purifiées, nous confirmons la présence de chitine dans la coque des œufs immédiats, mictiques et amictiques, ainsi que dans celle des œufs durables des Rotifères. Dans le cas des œufs durables, dont la coque comprend deux ou trois enveloppes concentriques, comme dans certains œufs immédiats à double enveloppe, la chitine est toujours localisée dans l'enveloppe la plus interne, autrement dit dans celle qui entoure directement l'embryon.

(English summary at the end of the article.)

La méthode enzymatique d'identification et de dosage de la chitine (JEUNIAUX, 1965) a été appliquée par l'un de nous, pour analyser la composition chimique de la coque des œufs de certains Rotifères (DEPOORTERE et MAGIS, 1967).

Les œufs parthénogénétiques de *Brachionus leydigii* COHN sont entourés d'une seule enveloppe composée, au moins partiellement, de chitine. Ce polysaccharide représente 14,6 % du poids sec de l'œuf (embryon compris).

L'œuf fécondé est entouré d'une coque composée de deux enveloppes concentriques. L'externe, très épaisse, est rapidement hydrolysée par la soude à 100° C. L'interne, très mince, résiste à ce traitement mais, par contre, se dissout à peu près complètement dans une solution de chitinases purifiées.

(*) Stagiaire de Recherche au F.N.R.S.

La comparaison entre les œufs immédiats (parthénogénétiques) et les œufs fécondés (œufs durables) de cette espèce a suggéré aux auteurs que la nature chimique des enveloppes embryonnaires pourrait être considérée comme un « caractère de composition », susceptible de permettre l'établissement d'homologies, selon le second critère proposé par REMANE (1956).

Les résultats obtenus sur *Brachionus leydigii* ne correspondent pas à certaines observations sur l'œuf durable d'*Asplanchna girodi*, rapportées par de BEAUCHAMP (1951), mais réalisées au moyen de techniques, il est vrai, beaucoup moins rigoureuses. Avant d'aborder l'importante question de l'homologation des enveloppes des différents types d'œufs par le biais de leur composition chimique, il était donc nécessaire d'élargir le cadre des observations, d'autant plus que la coque de l'œuf fécondé peut, comme l'a montré POURRIOT (1967), comprendre parfois plus de deux enveloppes concentriques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. — *Matériel biologique.*

Ces recherches complémentaires s'appuient sur l'examen des œufs immédiats des espèces suivantes :

— Sous-classe des MONOGONONTES :

Brachionidae :

Brachionus calyciflorus PALLAS

Epiphanes senta EHRENBERG

Euchlanidae :

Euchlanis dilatata EHRENBERG

Lepadella emarginata EHRENBERG (*sensu* DIEFFENBACH, 1912).

— Sous-classe des DIGONONTES :

Philodinidae :

Philodina roseola EHRENBERG

Macrotrachela sp.

Nous avons, d'autre part, analysé la composition chimique des enveloppes des œufs durables recueillis chez les espèces suivantes (*).

Brachionidae :

Brachionus plicatilis MULLER

Epiphanes brachionus EHRENBERG

Euchlanidae :

Euchlanis dilatata EHRENBERG

Asplanchnidae :

Asplanchna brightwelli GOSSE

Lindiidae :

Lindia torulosa DUJARDIN

Notommatidae :

Notommata copeus EHRENBERG

Comme terme de comparaison de ces différents essais, nous avons réexaminé les œufs immédiats, mictiques et amictiques, et les œufs durables de *Brachionus leydigii* COHN.

2. — *Méthodes.*

Nous rappellerons que la méthode enzymatique de dépistage de la chitine nécessite le traitement préalable des structures étudiées par une solution alcaline à chaud. Cette étape préliminaire est, en effet, indispensable pour démasquer la chitine de ses complexes glycoprotéiques et la rendre ainsi accessible à l'action des enzymes chitinolytiques. En conduisant progressivement cette phase initiale de l'analyse et en surveillant régulièrement son déroulement, on peut ainsi distinguer immédiatement les parties de la structure étudiée qui résistent à l'action des alcalis de celles qui, au contraire, sont hydrolysées dans ces solutions et sont, plus que probablement, de nature protéique.

(*) Nous remercions M. Roger POURRIOT du Centre d'Hydrobiologie du C.N.R.S. qui nous a aimablement communiqué plusieurs lots d'œufs durables.

Comme nous l'avions fait précédemment, nous avons donc soumis les différents lots d'œufs à l'action d'une solution de soude 0,5 N, laissée à la température du laboratoire (« froid »), puis maintenue à 70° et enfin à 100° C, au moyen d'une plaque chauffante.

Après trois heures de séjour à 100° C, les structures résiduelles sont colorées à l'aide d'une solution aqueuse 1 ‰ de Rouge Congo, lavées à l'eau distillée puis transférées dans la solution de chitinases purifiées, tamponnée au pH 5,2. L'incubation de la préparation enzymatique est faite à 37° C et la réaction est suivie régulièrement pendant une vingtaine d'heures.

La solution enzymatique utilisée dans cette série d'essais, titrait 820 unités néphélométriques/ml, soit environ 1,85 mg. de chitinases purifiées/ml. (Pour la définition de ces unités et la préparation de ces chitinases, voir JEUNIAUX, 1958, 1959).

RÉSULTATS

1. — Œufs immédiats.

Le tableau I rassemble les observations effectuées sur les œufs parthénogénétiques de différentes espèces. Les résultats d'un traitement déterminé sont exprimés par les signes + ou 0, selon que les structures analysées sont, ou ne sont pas, dissoutes dans le milieu réactionnel correspondant.

Ces résultats appellent les commentaires suivants :

1. — Chez toutes les espèces pour lesquelles l'analyse complète a pu être faite, la répartition exclusive des signes + dans la colonne réservée au traitement enzymatique vient confirmer les résultats obtenus précédemment sur *Brachionus leydigii*. La résistance de la coque de l'œuf immédiat de *Lepadella* et des deux espèces de Philodinidae à l'action de la solution alcaline à 100° C, suggère que cette coque est également de nature chitineuse.

2. — On ne doit pas se laisser abuser par le signe 0. En effet, le traitement par la soude entraîne l'éclaircissement des enveloppes lorsque celles-ci, comme chez *Lepadella*, sont natu-

TABLEAU I

*Action de solutions alcalines et de chitinases purifiées
sur la coque des œufs immédiats de divers Rotifères*
(+ = dissolution; 0 = absence de dissolution)

| ESPÈCES | NaOH 0,5 N | | | solution de chitinases purifiées (*) (20 H. à 37°C) |
|---|---------------------|---------------|----------------|--|
| | 2 H. « à froid » | 2 H. 70° C | 3 H. 100° C | |
| <i>Brachionus leydigii</i> œufs ♂ | 0 | 0 | 0 | + (complète après 20 H.) |
| œufs ♀ | 0 | 0 | 0 | + (complète après 20 H.) |
| <i>Brachionus calyciflorus</i> œufs ♀ | 0 | 0 | 0 | + (complète après 20 H.) |
| <i>Euchlanis dilatata</i> œufs ♂ | 0 | 0 | 0 | + (complète après 20 H.) |
| œufs ♀ | 0 | 0 | 0 | + (complète après 20 H.) |
| <i>Lepadella emarginata</i> œufs ♀ | 0 | 0 | 0 | non testée |
| <i>Philodina roseola</i> œufs ♀ | 0 | 0 | 0 | non testée |
| <i>Macrotrachela</i> sp. œufs ♀ | 0 | 0 | 0 | non testée |
| <i>Epiphanes senta</i> œufs ♀ (stade du mastax différencié) | | | | |
| enveloppe externe | 0 | 0 | + | |
| enveloppe interne | 0 | 0 | 0 | + (complète après 12 H.) |

(*) Concentration : 820 unités néphéométriques/ml.

rellement colorées. Le fait que les matériaux purement cellulaires sont régulièrement hydrolysés, dès que le milieu alcalin est porté à 70° C prouve que la (ou les) enveloppes sont, ou sont rendues, perméables à la solution. Enfin, à 100° C, toutes les enveloppes deviennent très transparentes et surtout beaucoup plus fragiles qu'avant les traitements. Le simple fait de remuer le milieu réactionnel par le courant d'une pipette, suffit parfois à les disloquer en petits fragments. C'est d'ailleurs pour cette dernière raison que le test enzymatique n'a pu être effectué sur toutes les espèces. Ces actions indéniables de la soude permettent logiquement de penser que la chitine ne se trouve pas à l'état libre mais, comme polysaccharide de structure, entre dans la composition de complexes vraisemblablement glycoprotéiques.

3. — Nous n'avons trouvé dans la littérature aucune indication sur la présence de deux membranes autour de l'œuf immédiat d'*Epiphanes senta*. C'est cependant ce que nous avons observé sur tous les œufs constituant le lot d'étude. Sans doute sont-elles très étroitement accolées dans les conditions normales, puisqu'il faut l'intervention de la soude pour les mettre en évidence. Après traitement à 100° C, ces deux enveloppes sont particulièrement reconnaissables car l'interne est beaucoup plus intensément colorée par le Rouge Congo. L'étude du lot montre que la résistance de l'enveloppe externe se modifie en fonction de l'âge des œufs. Sur ceux récoltés immédiatement après la ponte, l'action de la soude à 100° C provoque simplement la turgescence de cette membrane. Sur d'autres œufs, d'âge plus avancé, celle-ci se présente comme un voile hyalin déchiré en plusieurs endroits. Enfin, lorsque le mastax est bien différencié dans l'embryon, l'enveloppe externe est complètement hydrolysée. Pour éclaircir complètement la question de la composition chimique de cette enveloppe, nous avons répété ce dernier test sur les œufs jeunes et moyennement âgés. Après 2,30 H. de ce second passage dans la soude, nous avons observé la dislocation de la membrane en fragments plus ou moins grands. Nous avons simultanément constaté que la membrane interne ne s'était pas altérée, malgré un contact prolongé avec l'alcali. Quel que soit l'âge des œufs, la membrane interne présente des marques d'alté-

ration t
enzym
A ce m
de l'env
dans la

2. — C

Les r
sont co

Les r

1. —
firment
L'exter
le NaO
uniquer
de natu

2. —
figuré p
même f
résistan

3. —
vraimen
dissolut
particu
l'action
phériqu
interne
moins c
ment d

4. —
mata (*

(*) L'
entouré
RIOT, 19

ration très accusées après 5 heures d'incubation dans la solution enzymatique. Après 12 heures, elle est entièrement hydrolysée. A ce moment, le milieu réactionnel contient encore les lambeaux de l'enveloppe externe qui subsistaient après les deux passages dans la soude à 100° C.

2. — Œufs de durée.

Les résultats des observations effectuées sur les œufs durables sont consignés dans le tableau II.

Les résultats de ce tableau montrent que :

1. — Les nouveaux essais réalisés sur *Brachionus leydigii* confirment d'abord l'existence de deux enveloppes concentriques. L'externe, épaisse et ornementée, se dissout complètement dans le NaOH à 100° C. et est donc, vraisemblablement, constituée uniquement de protéines. L'interne, beaucoup plus mince, est de nature chitineuse.

2. — L'œuf durable de *Lindia torulosa*, récemment décrit et figuré par POURRIOT (1967), se comporte pratiquement de la même façon, à ceci près, que son enveloppe externe est moins résistante à l'action de la soude que celle du brachion.

3. — Chez *Euchlanis dilatata*, la seconde enveloppe ne devient vraiment bien visible que dans la soude à 70° C. A 100° C, la dissolution de la portion externe laisse en place une enveloppe, particulièrement reconnaissable par sa forte épaisseur (10 μ). Sous l'action des chitinases, celle-ci se dédouble en une strate périphérique, faiblement colorée par le Rouge Congo et une strate interne, plissée et contractée, mais plus densément colorée. En moins de 15 heures d'incubation, les deux strates sont complètement détruites par les enzymes chitinolytiques.

4. — Chez *Brachionus plicatilis*, les deux *Epiphanes* et *Notommata* (*), la protection des embryons est assurée par une coque

(*) L'œuf durable de *Notommata collaris* EHRENBERG est également entouré d'une coque composée de trois enveloppes concentriques (POURRIOT, 1967).

TABLEAU II
 Action des solutions alcalines et de chitinases purifiées
 sur la coque des œufs durables de divers Rotifères

| ESPÈCES | NaOH 0,5 N | | | solution de chitinases purifiées (20 H. à 37° C) |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|--|
| | 2 H. à froid | 2 H. à 70° C | 3 H. à 100° C | |
| <i>Brachionus leydigii</i> | | | | |
| enveloppe ext. * | 0 | 0 | + (5,30 H) | |
| enveloppe int. * | 0 | 0 | 0 | + (complète après 18 H.) |
| <i>Lindia torulosa</i> | | | | |
| enveloppe ext. * | 0 | + | | |
| enveloppe int. * | 0 | 0 | 0 | + (complète après 15 H.) |
| <i>Euchlanis dilatata</i> | | | | |
| enveloppe ext. * | 0 | 0 | + | |
| enveloppe int. | 0 | 0 | 0 | strate 1 + strate 2 + (complète après 15 H.) |
| <i>Brachionus plicatilis</i> | | | | |
| enveloppe ext. * | 0 | ± | + | |
| enveloppe interm. * | 0 | 0 | ± | |
| enveloppe int. * | 0 | 0 | 0 | + (complète après 15 H.) |
| <i>Epiphanes senta</i> | | | | |
| enveloppe ext. * | 0 | ± | + | |
| enveloppe interm. | | 0 | + | |
| enveloppe int. * | 0 | 0 | 0 | non testé |
| <i>Epiphanes brachionus</i> | | | | |
| enveloppe ext. * | 0 | 0 | + (5,30 H) | |
| enveloppe interm. | 0 | 0 | ± | |
| enveloppe int. * | 0 | 0 | 0 | + |
| <i>Notommata copeus</i> | | | | |
| enveloppe ext. * | 0 | + (1 H.) | | |
| enveloppe interm. | 0 | + | | |
| enveloppe int. * | 0 | 0 | 0 | + (sensible après 18 H.) |
| <i>Asplanchna brightwelli</i> | | | | |
| enveloppe ext. * | 0 | + | | |
| enveloppe interm. | 0 | 0 | 0 | non testé |
| enveloppe int. | 0 | 0 | 0 | non testé |

* : Enveloppe visible avant tout traitement.

composée d
nables aprè
intermédiaire
alors que
l'enveloppe
à 100° C. E
de la coqu
même certa
ment à 100
enzymes ch
branes inter

5. — Ch
sous l'effet
mière couch
mais surtou
profondeur,
paraît se c
membranes
Les images
sins figurés
cet auteur,
deviendrait
l'utérus. No
toutes les a
indiscutable
être « chitin
soude à 70°
mise en rap
brane. Les
naissables à
Il est même
ne modifie p
test à la ch
possible de
due à la pré
poussée des

fiées
es

 solution
de chitinases
purifiées
(20 H. à
37° C)

+ (complète
après 18 H.)+ (complète
après 15 H.)strate 1 +
strate 2 +
(complète
après 15 H.)+ (complète
après 15 H.)

non testé

+

+ (sensible
après 18 H.)non testé
non testé

composée de trois enveloppes concentriques, généralement discernables après action de la soude. Par son épaisseur, l'enveloppe intermédiaire ressemble beaucoup à la membrane interne. Mais alors que celle-ci est hydrolysée par les chitinases purifiées, l'enveloppe intermédiaire, au contraire, se dissout dans la soude à 100° C. Elle est cependant plus résistante que la portion externe de la coque. Chez *Brachionus* et les *Epiphanes*, on retrouve même certains lambeaux de cette enveloppe à la fin du traitement à 100° C, mais on les observe encore après l'action des enzymes chitinolytiques qui ont entièrement dissout les membranes internes de ces œufs.

5. — Chez *Asplanchna*, la turgescence de l'enveloppe externe sous l'effet de la soude, à froid, permet de distinguer une première couche, très caractérisée non seulement par son épaisseur, mais surtout par une striation radiaire très apparente. Plus en profondeur, on reconnaît encore une troisième enveloppe qui paraît se détacher de la précédente. L'existence de ces trois membranes est entièrement confirmée sur coupes microscopiques. Les images ainsi obtenues se superposent parfaitement aux dessins figurés par de BEAUCHAMP (fig. 14A, B et C, 1951). D'après cet auteur, cette enveloppe externe, comme celle d'*A. girodi*, deviendrait « chitinoïde », au moment où l'œuf se trouve dans l'utérus. Nos résultats, qui s'accordent avec ceux obtenus chez toutes les autres espèces de cette étude, prouvent qu'il s'agit indiscutablement d'un abus de langage. L'enveloppe ne saurait être « chitinoïde » puisqu'elle se dissout déjà au contact de la soude à 70° C. Cette faible résistance aux alcalis pourrait être mise en rapport avec la structure très vacuolaire de la membrane. Les deux autres membranes restent parfaitement reconnaissables à l'expiration du traitement de 3 heures à 100° C. Il est même intéressant de souligner que ce traitement drastique ne modifie pas l'aspect strié de l'épaisse enveloppe médiane. Le test à la chitinase n'ayant pu être réalisé, il n'est pas encore possible de savoir actuellement si cette grande résistance est due à la présence de chitine ou si elle résulte d'une sclérisation poussée des protéines.

CONCLUSIONS

1. — Les résultats de cette enquête viennent confirmer et généraliser les conclusions du travail de DEPOORTERE et MAGIS sur la présence de chitine dans les enveloppes embryonnaires des Rotifères.

2. — L'enveloppe externe de l'œuf durable d'*Asplanchna brightwelli* a été qualifiée abusivement de « chitinoïde » par de BEAUCHAMP. Comme elle se dissout déjà au contact de la soude à 70° C, elle ne contient certainement pas de chitine.

3. — En dépit de la variabilité du nombre des enveloppes qui constituent la coque, particulièrement bien mise en évidence par l'emploi de la soude, aussi bien des œufs durables que de certains œufs immédiats, on remarque que la chitine est toujours localisée dans l'enveloppe la plus interne et exclusivement à cet endroit.

4. — Cette conclusion ouvre une nouvelle perspective pour établir les homologues entre les enveloppes des différents types d'œufs. En effet, en plus de l'identité de leur composition chimique, nous voyons que les enveloppes chitineuses occupent également la même position relative. Or REMANE (1956) définit également la parenté de position comme critère d'homologation des structures anatomiques. Pour trancher cette question de parenté, il convient de poursuivre l'étude de l'origine et du mode de formation des diverses enveloppes de la coque, qui fera l'objet d'une prochaine publication.

SUMMARY

It is confirmed that chitin is present in the shell of mictic, amictic and dormant eggs of several species of Rotifers. These shells are constituted by a variable number of envelopes. It is noted that chitin is regularly and specifically present in the most internal one. The others envelopes seem to be entirely devoid of chitin.

BIBLIOGRAPHIE

- BEAUCHAMP, P. (de), (1951). — Sur la variabilité spécifique dans le genre *Asplanchna* (Rotifères). *Bull. Biol. France-Belgique*, 85 (2), 137-175.
- DEPOORTERE, H. et MAGIS, N. (1967). — Mise en évidence, localisation et dosage de la chitine dans la coque des œufs de *Brachionus leydigii* COHN et d'autres Rotifères. *Ann. Soc. R. zool. Belgique*, 97 (3), 187-195.
- DIEFFENBACH, H. (1912). — In « *Die Süßwasserfauna Deutschlands* », A. Brauer, édit., Heft 14, Jena.
- JEUNIAUX, Ch. (1958). — Recherches sur les chitinases. I. Dosage néphélométrique et production de chitinase par des Streptomycètes. *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, 66, 408-427.
- JEUNIAUX, Ch. (1959). — Recherches sur les chitinases. II. Purification de la chitinase d'un Streptomycète, et séparation électrophorétique de principes chitinolytiques distincts. *Arch. Internat. Physiol. Bioch.*, 67, 597-617.
- JEUNIAUX, Ch. (1965). — Chitine et phylogénie : application d'une méthode enzymatique de dosage de la chitine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47, 2267-2278.
- POURRIOT, R. (1967). — Mâles et œufs durables de quelques Rotifères. *Bull. Soc. Zool. France*, 92 (1), 185-192.
- REMANE, A. (1956). — *Die Grundlagen des natürlichen Systems, der vergleichenden Anatomie und der Phylogenetik*, Geest u. Portig, Leipzig.
-