

Extrait des *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique*,
Tome 97, fascicule 3, pp. 187 à 195.

MISE EN EVIDENCE, LOCALISATION ET DOSAGE
DE LA CHITINE DANS LA COQUE DES ŒUFS
DE *BRACHIONUS LEYDIGII* COHN
ET D'AUTRES ROTIFERES

par H. DEPOORTERE et N. MAGIS.

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

Résumé. — Nous confirmons que la cuticule et les pièces dures du mastax (trophi) des Rotifères ne sont pas de nature chitineuse mais vraisemblablement de nature protéique. En utilisant des solutions de chitinases purifiées, nous avons pu mettre la chitine en évidence dans la coque des œufs immédiats (parthénogénétiques) des 4 espèces étudiées. Chez *Brachionus leydigii*, la chitine représente 14,6 % du poids sec total des œufs (coque et embryon). La membrane interne de l'œuf durable (fécondé de cette même espèce renferme également de la chitine, contrairement à la membrane externe.

(English summary at the end of the article.)

Dans ses *Recherches sur les Rotifères*, de BEAUCHAMP (1909) a cherché à préciser la nature chimique du revêtement tégumentaire (cuticule ou lorica), du mastax et de l'enveloppe des œufs immédiats. Les différences de résistance de ces structures anatomiques au contact d'une lessive alcaline ou d'une solution d'acide minéral ont conduit l'auteur à postuler l'existence, soit de trois substances constitutives, soit de trois états différents d'une seule substance :

- 1) la cuticule se dissout rapidement dans les alcalis mais résiste plus longtemps à l'action des acides minéraux;
- 2) les pièces du mastax (trophi), au contraire, se solubilisent rapidement au contact des acides mais résistent plus longtemps à l'action des bases;

3) la coque des œufs immédiats (parthénogénétiques), par contre, résiste aux acides comme aux solutions alcalines plus longtemps que la cuticule et les trophi.

Observant que ces trois formations s'altèrent dans la potasse plus complètement et plus rapidement que les appendices les plus ténus d'Entomostracés, pris comme témoin; constatant, en outre, qu'aucune de ces trois formations ne donne les réactions de coloration considérées, à l'époque, comme caractéristiques de la chitine, de BEAUCHAMP réfute l'opinion d'après laquelle ces structures anatomiques seraient de nature chitineuse. HYMAN (1951) partage cet avis et suppose que la cuticule est constituée par une scléroprotéine.

En 1951, de BEAUCHAMP modifie toutefois sa conception en ce qui concerne l'œuf durable d'*Asplanchna girodi* de GUERNE. En effet, la première membrane de l'œuf fécondé est d'abord soluble dans les acides et les alcalis; cependant, un jour ou deux plus tard, lorsque l'œuf est détaché de l'ovaire et libre dans l'utérus, cette enveloppe deviendrait résistante. L'auteur décrit cette membrane comme étant de nature « chitinoïde ».

La méthode enzymatique de JEUNIAUX (1963, 1965), mettant à profit la spécificité des chitinases purifiées, permet aujourd'hui d'identifier la chitine de façon absolument rigoureuse. En raison de sa haute sensibilité, cette technique offre la possibilité de localiser et de doser la chitine sur des matériaux de dimensions microscopiques.

Dans son analyse de la distribution de la chitine dans le règne animal, JEUNIAUX (1963) n'a pas été en mesure d'étudier la classe des Rotifères. C'est à son initiative et guidés par ses conseils, que nous avons entrepris cette recherche et que nous en présentons ici les résultats.

Comme nous le montrerons dans ce travail, les Rotifères viennent s'ajouter à la liste, déjà longue, des animaux capables de réaliser la biosynthèse de la chitine. L'identification de la nature chimique des formations cuticulaires et des enveloppes embryonnaires des Rotifères peut, en outre, apporter d'intéressants arguments, susceptibles de servir à discuter les affinités systématiques des différentes classes du phylum des Aschelminthes, car la composition et l'homogénéité de cette entité systématique sont loin d'être définitivement établies.

1. — M

Nos
Brachio
de ferr
ques (œ
Cette qu
un dosa
(œufs d
obtenu
pouvoir
répétés

2. — M

Sauf
ont été
cuvette
structur
laire ou

a) *Trai*

Les i
haut, o
solubili
profité
de la c

Nous
NaOH
diées a
à 70° C
les lam
saturée
milieu

Sous
diées, b
rence t
ces con
que la
erreur

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1. — *Matériel biologique.*

Nos recherches portent essentiellement sur le Brachionidae *Brachionus leydigii* COHN, trouvé en abondance dans une mare de ferme des environs de Liège; 12.000 œufs parthénogénétiques (œufs immédiats) ont été détachés de femelles en ponte. Cette quantité de matériel s'est avérée suffisante pour effectuer un dosage quantitatif de la chitine. Un lot d'œufs fécondés (œufs durables) a été simultanément constitué, mais le nombre obtenu était insuffisant pour entreprendre le dosage. Afin de pouvoir généraliser nos résultats, les différents essais ont été répétés sur quelques individus appartenant à d'autres espèces.

2. — *Méthodes.*

Sauf pour le dosage quantitatif de la chitine, tous les essais ont été effectués en plaçant les individus et les réactifs dans la cuvette d'une lame porte-objet creuse. Les modifications des structures analysées ont été suivies sous le contrôle du binoculaire ou du microscope (JEUNIAUX, 1963).

a) *Traitement par la soude.*

Les indications publiées par de BEAUCHAMP, rappelées plus haut, obligeaient évidemment à reconsidérer la question de la solubilité de la coque des œufs en milieu alcalin. Nous en avons profité pour contrôler, en même temps, la résistance relative de la cuticule et du mastax.

Nous avons employé systématiquement une solution de NaOH 1,25N. L'action de cette solution sur les structures étudiées a été observée à la température du laboratoire (« à froid »), à 70° C sur plaque chauffante, et à 100° C. Dans ce dernier cas, les lames ont été maintenues dans une enceinte thermostatique saturée de vapeur d'eau, de façon à éviter l'évaporation du milieu réactionnel.

Sous l'action prolongée de la soude à 100° C, les pièces étudiées, bien que non disloquées, acquièrent souvent une transparence telle qu'elles en deviennent difficilement repérables. Dans ces conditions, l'observateur serait aisément amené à considérer que la dégradation des matériaux est complète. Pour éviter cette erreur d'interprétation, nous avons pris soin de rechercher les

structures traitées par la soude en les colorant à l'aide d'une solution aqueuse de Rouge Congo, à la concentration de 1 ‰.

Cette réaction de coloration n'est en aucune façon spécifique de la chitine, mais permet de retrouver les pièces étudiées et d'en suivre le comportement lors des manipulations ultérieures.

b) *Traitement par les chitinases purifiées.*

Le traitement par la soude 1,25 N à 100° C, pendant trois heures, permet de démasquer la chitine de ses complexes glycoprotéiques et de la rendre accessible à l'action des enzymes chitinolytiques.

Après traitement par la soude, les structures résiduelles, préalablement colorées par le Rouge Congo, sont lavées à l'eau distillée puis transférées dans la cuvette d'une autre lame creuse. On ajoute alors 0,1 ml de tampon de pH 5,2 puis 0,5 ml d'une solution de chitinases purifiées, préparée à partir d'un filtrat de culture de *Streptomyces antibioticus* (JEUNIAUX, 1959, 1963). La solution enzymatique utilisée dans cette série d'essais titrait 350 unités néphélométriques/ml, soit environ 0,8 mg de chitinases purifiées/ml.

Pour doser la chitine totale présente dans la coque des œufs immédiats de *B. leydigii*, nous avons suivi intégralement les différentes étapes de la manipulation décrites par JEUNIAUX (1963, 1965).

RÉSULTATS.

1. — *Lorica et mastax de Brachionus leydigii.*

A 70° C, la soude 1,25 N amène un éclaircissement du tégument et libère les trophi des chairs qui les entourent. Après deux heures, la lorica prend l'aspect d'une pellicule particulièrement transparente tandis que le mastax reste peu altéré. A ce stade, ces deux structures sont colorables par le Rouge Congo.

A 100° C, l'hydrolyse de la lorica est rapide et totale. La dissolution des trophi est tout aussi complète mais exige cependant un contact plus long avec la solution de soude (deux heures environ à 100° C).

Puisque ces deux structures ne résistent pas à l'action de la soude, il est évidemment inutile de les soumettre au test enzymatique des chitinases.

2. — Œuf durable et œuf immédiat de *Brachionus leydigii*.

a) Œuf durable.

L'œuf fécondé de ce *Brachionus* est entouré de deux enveloppes concentriques, aisément reconnaissables sur coupes microscopiques. L'enveloppe externe est épaisse et garnie d'expansions filamenteuses; intérieurement, cette coque est doublée par une membrane plus mince, prenant l'aspect d'un fin liséré.

Sous l'action de la soude à 70° C, la coque de l'œuf durable se décolle de l'enveloppe interne. Ces deux membranes se distinguent alors aussi facilement que sur les coupes microscopiques.

A 100° C, les observations, faites sous le contrôle du microscope, permettent de suivre la dégradation progressive de cette coque. Après trois heures, la membrane externe est complètement dissoute tandis que la fine enveloppe interne ne montre pas d'altération et se colore par le Rouge Congo.

Après traitement par la soude, les membranes internes des œufs durables ont été lavées et transférées dans une solution de chitinases purifiées. Après une dizaine d'heures d'incubation à 37° C, on constate une altération évidente de la membrane. Elle se traduit par un amincissement, une décoloration prononcée et, finalement, par une dissolution à peu près complète.

b) Œuf immédiat.

Les œufs immédiats (parthénogénétiques), pondus par les femelles mictiques ou amictiques, sont entourés d'une seule enveloppe. Sous l'action de la soude à 70° C, ces œufs deviennent légèrement turgescents et perdent de leur opacité.

Après un traitement de trois heures à 100° C, leur coque reste parfaitement identifiable lorsqu'on prend la précaution de la colorer au Rouge Congo.

Au contact des solutions de chitinases purifiées, la coque perd progressivement la coloration signalétique que lui donne le Rouge Congo et se dissout endéans une dizaine d'heures d'incubation à 37° C.

Le dosage de l'acétylglucosamine libérée au cours de la lyse enzymatique complète (tableau I) montre que la chitine constitue 14,6 % du poids sec total des œufs (coque et embryon).

TABLEAU I. — Résultats du dosage de la chitine dans la coque des œufs immédiats de *Brachionus leydigii*.

Etat du matériel	Poids sec (en µg)	Acétylglucosamine libérée (en µg)	Chitine totale	
			(en µg) (1)	en % du poids sec
Env. 12.000 œufs immédiats à l'état frais, desséchés à 80°C	630	100	92	14,6

(1) Quantité d'acétylglucosamine (AG) multipliée par 0,92. Ce coefficient de correction est le rapport du poids moléculaire d'un reste d'AG dans la chaîne polysaccharidique de la chitine à celui de l'AG libre (JEUNIAUX, 1963).

3. — Contrôle des résultats sur d'autres espèces.

La dissolution complète de la lorica et du mastax dans la soude 1,25 N à 100° C, a été observée chez *Keratella cochlearis* (GOSSE), *K. quadrata* (MULLER) et *Mytilina brevispina* (EHRENBERG), qui appartiennent, comme *B. leydigii*, à la sous-classe des Monogonontes et à l'ordre des Pseudotroques. Les mêmes observations ont été faites chez *Testudinella patina* (MULLER), de l'ordre des Gnésiotroques et enfin chez *Philodina roseola* (EHRENBERG), représentant l'ordre des Bdelloïdes dans la sous-classe des Digonontes (*).

Au contraire, l'enveloppe de l'œuf immédiat de ces différentes espèces résiste parfaitement à l'action de la soude à 100° C. L'action des chitinasés purifiés a été testée qualitativement sur les œufs immédiats des deux *Keratella* et sur celui de *Mytilina*. Dans ces conditions, nous avons observé la décoloration et l'hydrolyse de la coque dès la deuxième heure d'incubation chez *Keratella cochlearis*. Les enveloppes des œufs des deux autres espèces s'altèrent moins rapidement mais leur hydrolyse est incontestable après 6 heures d'incubation en présence de chitinasés purifiés à 37° C.

CONCLUSIONS.

1. — Les résultats obtenus sur *Brachionus leydigii* et d'autres Rotifères, appartenant à divers ordres de Monogonontes et

(*) Nous adoptons l'ordre systématique proposé par de BEAUCHAMP (1965) dans le *Traité de Zoologie* de P.P. GRASSE.

de Digo
en ce q
mastax
dégradé
séquent,
alcalis i
téique. L
sie ou r
tégumen
tielleme

2. —
immédi
dissoute
avait bi
aux alc
neuse.
rigoure
réfuter
comme
diat est
Chez B
sec de
de celle
lumbri
œufs en

Chez
immédi
eux-mê
remarq
tains A
bricoid
bien p
HÖNIC,
tannées
Némat
coque,
1963) (

3. —
l'œuf c

(*) Sc
réaction

de Digonotes, confirment les données acquises précédemment en ce qui concerne la nature chimique de la cuticule et du mastax. Ces différenciations épidermiques et stomodéales sont dégradées et dissoutes par la soude 1,25 N à 100° C et, par conséquent, ne renferment pas de chitine. Leur solubilité dans les alcalis indique plutôt qu'il s'agit de formations de nature protéique. Par sa nature chimique, la cuticule des Rotifères, épaisse ou non en lorica, présente donc certaines analogies avec le tégument des Nématodes, dont la nature chimique est essentiellement protéique (BIRD et DEUTSCH, 1957; WATSON, 1965 a, b).

2. — La coque entourant les œufs parthénogénétiques (œufs immédiats) de *Brachionus leydigii* et d'autres espèces n'est pas dissoute par la soude 1,25 N à 100° C. de BEAUCHAMP (1909) avait bien constaté que cette enveloppe résistait assez longtemps aux alcalis mais prétendait qu'elle n'était pas de nature chitineuse. Les résultats obtenus en appliquant la seule méthode rigoureuse de mise en évidence de la chitine, nous amènent à réfuter cette opinion. Dans la sous-classe des Monogonotes, comme dans celle des Digonotes, l'enveloppe de l'œuf immédiat est bel et bien constituée de chitine, au moins en partie. Chez *B. leydigii*, la chitine totale représente 14,6 % du poids sec de l'œuf (coque et embryon). Cette valeur est très voisine de celle obtenue par JEUNIAUX (1963) pour les œufs d'*Ascaris lumbricoides* où la chitine représente 16,6 % du poids sec des œufs embryonnés.

Chez les Rotifères, les enveloppes qui entourent les œufs immédiats et les œufs durables sont élaborées par les embryons eux-mêmes (de BEAUCHAMP, 1951, 1965). Il est intéressant de faire remarquer qu'il en est de même chez les Nématodes. Chez certains Ascaridés (*Parascaris equorum*, *Ascaris suum* et *A. lumbricoides*) toutefois, la strate la plus externe de la coque paraît bien provenir d'une sécrétion de la paroi utérine (MONNÉ et HÖNIG, 1954), mais elle se compose exclusivement de protéines tannées (MONNÉ, 1956). Chez ces espèces, comme chez les autres Nématodes, la chitine se localise dans la partie moyenne de la coque, élaborée indiscutablement par l'embryon (MONNÉ, 1961, 1963) (*).

3. — Le chitine est également présente dans la coque de l'œuf durable (fécondé) de *B. leydigii*. Chez cette espèce, l'enve-

(*) Soulignons que cet auteur a identifié la chitine par une série de réactions de coloration couplées avec des tests chimiques.

loppe externe, dont la surface est ridée et garnie d'expansions filamenteuses, est détruite par la soude à 100° C, et ne renferme donc pas de chitine. La membrane interne, mince et lisse, résiste au contraire à l'action de la soude mais est hydrolysée par les solutions de chitinases purifiées. Elle se comporte donc comme l'enveloppe unique de l'œuf immédiat.

Dans l'introduction de ce travail, nous avons fait allusion aux observations de de BEAUCHAMP (1951) sur l'œuf durable d'*Asplanchna girodi*. Nous les reprendrons ici car elles ne correspondent pas exactement à ce que nous avons vu chez le *Brachionus*. Chez cette *Asplanchna*, c'est la membrane externe, édiflée immédiatement après la fécondation, qui devient résistante aux alcalis et présente un aspect « chitinoïde ». Autrement dit, la membrane « chitinoïde » de l'œuf durable d'*Asplanchna girodi* correspondrait topographiquement à la membrane non chitineuse de l'œuf durable de *Brachionus leydigii*. de BEAUCHAMP ne donne aucune indication sur la composition chimique de la seconde membrane, sécrétée après la segmentation de l'œuf et qui, topographiquement, correspond à la membrane chitineuse identifiée sur l'œuf du *Brachionus*. Comme le terme « chitinoïde » appelle les plus grandes réserves, il convient de réserver notre opinion au sujet de la nature et de la signification des membranes embryonnaires d'*Asplanchna*.

4. — En ce qui concerne les deux sortes d'œufs de *Brachionus*, il nous paraît justifié de considérer la nature chimique des membranes comme un « caractère de composition », susceptible de permettre l'établissement d'homologies, selon le second critère proposé par REMANE (1956). C'est donc la membrane interne de l'œuf durable (fécondé) qui devrait être homologuée à l'enveloppe unique de l'œuf immédiat (parthénogénétique). Nous avons cru utile de soulever ce problème d'homologie pour mieux faire ressortir le profit que l'on peut parfois tirer de la nature chimique d'une structure anatomique pour résoudre de telles questions.

SUMMARY.

A specific micromethod for the detection of chitin, using purified chitinases, has been applied to the study of the chemical composition of cuticle, mastax and egg's envelopes of different Rotifers.

It is confirmed that the cuticle and the mastax of Rotifers do not

contain
teins.
amictic
tin rep
Brachi
mant e

BEAUC
tions
série
BEAUC
genr
BEAUC
fasc.
BIRD,
Asca
HYMA
JEUNI
de l
prin
597-
JEUNI
logie
JEUNI
tho
2267
MONN
and
(3);
MONN
and
MONN
p
MONN
of
REMA
glei
WATS
livi
WATS
gro
J. 1

contain chitin. These anatomical structures presumably consist of proteins. On the contrary, chitin has been identified in the shell of the amictic eggs of the species so far studied. In *Brachionus leydigii*, chitin represents 14,6 % of the egg's dry weight (shell and embryo). In this *Brachionus*, chitin is also present in the internal membrane of the dormant egg, while the external membrane is entirely devoid of chitin.

BIBLIOGRAPHIE.

- BEAUCHAMP, P. (de). (1909). — Recherches sur les Rotifères. Les formations tégumentaires et l'appareil digestif. *Arch. Zool. exp. et gén.*, (4e série), **10**, 1-410.
- BEAUCHAMP, P. (de). (1951). — Sur la variabilité spécifique dans le genre *Asplanchna* (Rotifères). *Bull. biol. France-Belgique*, **85** (2), 137-175.
- BEAUCHAMP, P. (de). (1965). — in GRASSE, P.P. *Traité de Zoologie*, t. IV, fasc. 3, Masson, Paris.
- BIRD, A.F. & DEUTSCH, K. (1957). — The structure of the cuticle of *Ascaris lumbricoides* var. *suis*. *Parasitol.*, **47**, 319-328.
- HYMAN, L. (1951). — *The Invertebrates*, t. III, Mc Graw-Hill, N.Y.
- JEUNIAUX, Ch. (1959). — Recherches sur les chitinases. II. Purification de la chitinase d'un streptomycète et séparation électrophorétique de principes chitino lytiques distincts. *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **67**, 597-617.
- JEUNIAUX, Ch. (1963). — Chitine et chitinolyse. Un chapitre de la biologie moléculaire. Masson, Paris.
- JEUNIAUX, Ch. (1965). — Chitine et phylogénie : application d'une méthode enzymatique de dosage de la chitine. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **47**, 2267-2278.
- MONNÉ, L. (1956). — On the histochemical properties of the egg envelopes and external cuticles of some parasitic nematodes. *Ark. f. Zool. N.S.*, **9**, (3); 93-113.
- MONNÉ, L. (1961). — On the physiological role of the polyphenols in cell and tissue envelopes. *Ark. f. Zool. N.S.*, **13** (12), 287-298.
- MONNÉ, L. (1963). — On the formation of the egg shells of the Ascaroides, particularly *Toxascaris leonina*. *Ark. f. Zool. N.S.*, **15** (15), 277-284.
- MONNÉ, L. & HÖNIG, G. (1954). — On the properties of the egg envelopes of various parasitic nematodes. *Ark. f. Zool.*, N.S., **7** (17), 261-272.
- REMANE, A. (1956). — *Die Grundlagen des natürlichen Systems, der Vergleichenden Anatomie und der Phylogenetik*. Geest & Portig, Leipzig.
- WATSON, B.D. (1965a). — The fine structure of the body-wall in a free-living nematode, *Euchromadora vulgaris*. *Quart. J. micr. Sc.*, **106** (1), 75-81.
- WATSON, B.D. (1965b). — The fine structure of the body-wall and the growth of the cuticle in the adult nematode *Ascaris lumbricoides*. *Quart. J. micr. Sc.*, **106** (1), 83-91.