

RECHERCHE DE LA CHITINE DANS LES PRODUCTIONS MÉTAPLASMATIQUES DE QUELQUES CILIÉS

J. C. BUSSERS et Ch. JEUNIAUX

Université de Liège - Institut de Zoologie
Laboratoire de Morphologie, Systématique et Ecologie Animales
22, Quai Van Beneden, 4000-Liège (Belgique)

RÉSUMÉ

La chitine a été recherchée dans les productions métaplasmatiques (kystes, fourreaux, loricas, coques) de 22 espèces de Ciliés en utilisant une micro-méthode spécifique basée sur l'emploi d'une chitinase microbienne concentrée et purifiée. Sur les 22 espèces étudiées, 14 élaborent des structures chitineuses. La biosynthèse de la chitine apparaît donc comme une propriété générale de la classe des Ciliés.

SUMMARY

The presence of Chitin has been searched in the metaplastic productions (cysts, loricas, shells) of 22 species of Ciliata, using a specific micromethod involving a powerful preparation of purified chitinase of microbial origin. Among these 22 species so far studied, 14 are able to produce chitinous structures. The biosynthesis of chitin thus appears as a general property of the Class Ciliata.

Les Protozoaires Ciliés élaborent divers types de productions métaplasmatiques, c'est-à-dire des membranes dures extracellulaires, parmi lesquelles on peut citer les diverses sortes de kystes (kystes de division, de digestion et de résistance), les fourreaux ou loricas des Vaginicolinae et Folliculinidae, les coques ou thèques des Tintinnides. La morphologie de toutes ces structures a été décrite, souvent avec beaucoup de précision. En revanche, leur nature chimique a été peu étudiée.

La composition chimique des kystes de digestion est inconnue. Au sujet des kystes de division, on sait seulement que ceux des Trichostomes *Colpoda cucullus* et *Bresslaia vorax* sont dépourvus de chitine (BUSSERS et JEUNIAUX, 1970).

Les kystes de résistance ont fait l'objet de quelques recherches histochimiques ou biochimiques, dont nous ne retiendrons ici que les plus récentes, basées sur des techniques suffisamment précises.

La présence de protéines de structure est signalée dans les kystes de diverses espèces : *Strombidium oculatum* (protéines non soufrées, FAURÉ-FRÉMIET, 1948), *Colpoda steini* (protéines riches en acide glutamique, TIBBS,

1966). L'association de protéines et de polysaccharides est décrite dans les kystes de *Euplotes musicola* (protéines soufrées : FAURÉ-FRÉMIET et coll., 1954), et de *Fabrea salina* (DEMAR-GERVAIS, 1971). Le kyste de *Blepharisma* sp. contient des hydrates de carbone (CHUNOSOFF et coll., 1964), ou un polysaccharide et des lipoprotéines (REPAK et PRISTER, 1967). Enfin, le kyste de *Didinium nasutum* a été analysé de manière plus approfondie : il est fait de 3 enveloppes concentriques, dont la plus externe contient des polysaccharides (RIEDER, 1973), ou des mucopolysaccharides acides (HOLT, 1972); l'enveloppe moyenne contient des polysaccharides, des lipides et des protéines (RIEDER, 1973) et l'enveloppe interne des mucopolysaccharides acides (HOLT, 1972).

Dans deux notes préliminaires (BUSSERS et JEUNIAUX, 1970; BUSSERS, 1971), nous avons montré la présence de chitine dans les membranes kystiques de 11 espèces de Ciliés; ces données sont reprises et discutées dans la présente publication.

Enfin, pour les autres types de membranes métaplasmatiques qui ne constituent pas des enveloppes kystiques, la littérature scientifique fournit peu d'informa-

* Manuscrit reçu le 8 novembre 1973.

tion. On sait seulement que plusieurs auteurs considèrent que le fourreau fabriqué par les Folliculinidés et par les Vaginicolidés est « chitineux » (sans preuves analytiques) ou « pseudo chitineux » (MAUPAS, 1883; FAURÉ-FRÉMIET, 1904; KAHL, 1935; DOGIEL, 1965). Le fourreau produit par certains *Stentor* serait gélatineux (KUDO, 1966). Quant à la thèque des Tintinnidés, elle est, de façon tout aussi peu précise, décrite comme possédant une matrice organique de nature kératineuse (BUSCH, 1926) ou « pseudo-chitineuse » (DOGIEL, 1965).

De ces données éparses, on peut tout au plus dégager la conclusion que les membranes métaplasmatiques des Ciliés sont faites le plus souvent de polysaccharides et de protéines, probablement associés.

On sait que les structures squelettiques d'origine ectodermique sont, chez les Acoelomates et les Invertébrés Protostomiens, très souvent constituées de chitine liée à des protéines fibreuses telles que la conchyoline et l'arthropodine. L'un de nous (JEUNIAUX, 1963, 1967) a émis l'hypothèse que la biosynthèse de la chitine serait une propriété fondamentale des ancêtres unicellulaires des Métazoaires. Dans le cadre de cette hypothèse, il était particulièrement intéressant de préciser si, au sein d'une Classe de Protozoaires, en l'occurrence celle des Ciliés, la chitine est un constituant chimique qui entre dans la composition de la plupart des formations métaplasmatiques.

Le présent travail constitue un premier inventaire de la distribution de la chitine chez les Ciliés, basé sur l'étude analytique des formations métaplasmatiques de 22 espèces au moyen d'une microméthode enzymatique hautement spécifique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les kystes ont été obtenus à partir de cultures de souches pures provenant de la Protistothèque du regretté Professeur FAURÉ-FRÉMIET, à Gif-sur-Yvette ou isolées par nous à partir de pièces d'eau de Belgique.

Les kystes de *Fabrea salina*, les fourreaux de *Cothurnia* sp. et de *Parafolliculina violacea*, les thèques de *Codonellopsis schabi* nous ont été aimablement fournis, respectivement par Madame DEMAR-GERVAIS, par Monsieur Gilbert DEROUX et par Mademoiselle PEUTO, à qui nous adressons nos plus vifs remerciements.

La chitine est mise en évidence par la micro-méthode de détection de la chitine (BUSSERS et JEUNIAUX, 1973) basée sur l'utilisation d'une chitinase d'origine microbienne purifiée et concentrée selon la méthode de JEUNIAUX (1958, 1959, 1965). La chitinase ainsi préparée est exempte de toute activité hydrolytique, à l'exception de son activité chitinolytique optimale à 37 °C et à pH 5.2. Toutefois, pour être rapidement hydrolysée par la chitinase, la chitine doit être « démasquée », c'est-à-dire que les incrusta minéraux et les protéines associées à la chitine doivent être préalablement détruits ou solubilisés. Dans ce but, les kystes et les autres structures étudiées sont préalablement traités par l'acide chlorhydrique normal, éventuellement par l'acide fluorhydrique à 15 % puis par l'hydroxyde de sodium normal à 100 °C pen-

dant 3 heures. Toutes les manipulations sont réalisées dans des salières ou en lames creuses, sous le contrôle du binoculaire; après chaque opération, les objets traités sont lavés dans l'eau distillée.

Le traitement par la soude caustique normale à 100 °C a pour effet de provoquer la décoloration des structures organiques non dégradées et de les rendre parfaitement transparentes. Celles-ci sont alors colorées par le Rouge Congo à 1 % afin de pouvoir les repérer et les transvaser dans un bain de lavage puis dans la solution tamponnée de chitinase, où l'on observe leur hydrolyse éventuelle pendant une incubation de 4 à 24 heures.

RÉSULTATS

Le tableau I présente de façon synoptique l'ensemble des observations réalisées pendant le traitement des kystes et autres membranes métaplasmatiques par les différents réactifs chimiques (HCl, HF, NaOH à diverses températures) et le résultat de l'action éventuelle de la chitinase dans le cas où les structures étudiées ont résisté aux précédents traitements.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

1. Sur les 22 espèces étudiées, 14 élaborent des membranes métaplasmatiques dont la composition chimique est, au moins partiellement, authentiquement chitineuse. Les seules exceptions sont un Holotriche Gymnostome, les Holotriches Trichostomes (3 espèces) et quelques Spirotriches. La propriété de synthétiser la chitine est donc largement répandue chez les Ciliés.

2. Les kystes de division et de résistance des 3 Trichostomes étudiés sont dépourvus de chitine, ce qui confirme les observations de TIBBS (1966) sur *Colpoda steini*.

3. La matrice organique des kystes de 3 espèces (Péritriche *Telotrochidium henneguyi*; Hétérotriches: *Blepharisma japonicum* et *Bursaria truncatella*) n'est hydrolysable par la chitinase qu'après désilicification par l'acide fluorhydrique. On peut donc conclure que, chez ces espèces, la matrice organique du kyste est protégée par des incrusta ou un « vernis » de Silice ou de silicate.

4. La capacité de biosynthèse de la chitine n'est pas répartie uniformément au sein de la Classe des Ciliés. Si l'on reporte nos résultats sur l'arbre phylétique proposé par CORLISS (1960), on s'aperçoit que, à une exception près (le gymnostome *Dileptus americanus*), toutes les espèces étudiées qui sécrètent de la chitine sont situées sur le tronc central: il s'agit de 4 Gymnostomes Cyrtophores (*Nassula picta*, *Nassula gracilis*, *Nassulopsis lagenula*, *Cyclogramma blochmanni*), un Hyménostome considéré comme primitif (*Pseudomicrothorax agilis*), 6 Hétérotriches (*Blepharisma japonicum*, *Fabrea salina*, *Parafolliculina violacea*, *Climacostomum virens*, *Bursaria truncatella*, *Phacodinium metschnikoffi*).

TABLEAU I
Recherche de la chitine dans les formations métaplasmatiques des Ciliés

Espèces étudiées	Prove- nance	Type de structure	Traitement par				
			HCl N°	HF 15 %	NaOH N 60°C	NaOH N 100°C	Chitinase
<i>Holotriches</i>							
<i>Dileptus americanus</i> Kahl	lg	kyste	—	—	dégradation	+	
<i>Nassula picta</i> Greff	g	kyste	—	—	—	+	lyse
<i>Nassula gracilis</i> Kahl	g	kyste	—	—	—	+	lyse
<i>Nassulopsis lagenula</i> F.F.	g	kyste	—	—	—	+	lyse
<i>Cyclogramma blochmanni</i> F.F.	g	kyste	—	—	—	+	lyse
<i>Colpoda cucullus</i> Müller	lg	k. division	—	—	dégradation		
" " "	lg	k. résistance	—	—	+	dégradation	
<i>Bresslaueria vorax</i> Kahl	lg	k. division	—	—	dégradation		
" " "	lg	k. résistance	—	—	—	dégradation	
<i>Woodruffia metabolica</i> J. & L.	g	k. division	—	—	dégradation		
" " "	g	kyste	—	—	—	dégradation	
<i>Pseudomicrothorax agilis</i> Merm.	g	kyste	—	—	—	+	lyse
<i>Telotrichidium henneguyi</i> F.F.	g	kyste	—	+	—	+	lyse
<i>Cothurnia</i> sp.	r	lorica	—	—	—	+	lyse
<i>Spirotriches</i>							
<i>Blepharisma japonicum</i>	g	kyste	—	+	—	+	lyse
<i>Fabrea salina</i> Henn.	g	kyste	—	—	—	+	lyse
<i>Climacostomum virens</i> Ehr.	g	kyste	—	—	—	+	lyse
<i>Bursaria truncatella</i> Müller	lg	kyste	—	+	—	+	lyse
<i>Parafolliculina violacea</i> Giard	r	fourreau	—	—	—	+	lyse
<i>Phacodinium metschnikoffi</i> Certes	lg	kyste	—	—	—	+	lyse
<i>Euplotes inkystans</i> Chatton	g	kyste	—	—	—	+	lyse
<i>Onychodromus grandis</i> Stein	g	kyste	—	—	—	dégradation	
<i>Oxytricha</i> sp.	g	kyste	—	—	—	dégradation	
<i>Urostyla trichogaster</i> Stokes	g	kyste	—	—	—	dégradation	
<i>Codonellopsis schabi</i> Bal	m	thèque	—	—	—	dégradation	

Le tableau expose les traitements préalables à la chitinolyse et leurs effets.

Le signe + indique que le traitement concerné est indispensable pour la réussite de la chitinolyse.

Le signe — indique que le traitement concerné n'a aucune influence sur les réactions ultérieures.

(1) lg = Liège — g = Gif-sur-Yvette — r = Roscoff.

Sur les branches latérales ou distales de cette représentation phylogénétique, la capacité de biosynthèse de la chitine a été conservée chez les Péritriches (*Cothurnia* sp., *Telotrichidium henneguyi*) et chez un Hypotriche (*Euplotes inkystans*); elle manque au contraire chez les Trichostomes (*Colpoda cucullus*, *Bresslaueria vorax*, *Woodruffia metabolica*), chez 3 Hypotriches (*Onychodromus grandis*, *Oxytricha* sp. et *Urostyla trichogaster*), et chez un Tintinnide (*Codonellopsis schabi*). L'absence de chitine au niveau des membranes métaplasmatiques de ces dernières espèces peut être interprétée comme la perte (ou le masquage) d'une propriété ancestrale largement répandue dans les groupes de Ciliés moins évolués.

Le cas des Gymnostomes Rhabdophores est moins clair; nous attendrons de connaître les caractères chimiques des kystes d'autres espèces avant de conclure.

5. Moyennant cette dernière réserve, et si l'on admet que la biosynthèse de la chitine est une acquisition ancestrale des organismes unicellulaires, on peut conclure

que la perte de la propriété de biosynthèse de la chitine par les espèces situées aux extrémités des branches constitue un nouvel exemple de manifestation d'une tendance évolutive qui s'exprime par la perte d'un système biosynthétique, tendance évolutive que l'on observe à divers niveaux dans la lignée des Métazoaires (JEUNIAUX, 1963, 1965, 1971).

6. A notre connaissance, aucune recherche de la chitine concernant un aussi large éventail d'espèces diverses appartenant à la même classe n'a été effectuée. Les résultats de cette recherche systématique montrent clairement que la biosynthèse de la chitine n'est pas une propriété d'une ou de quelques rares espèces mais une propriété générale de la Classe des Ciliés, perdue par des espèces appartenant à des groupes évolués, situés sur des branches latérales de l'arbre phylétique de cette Classe.

Enfin, ces observations illustrent bien le danger qui consiste à vouloir conclure à la présence ou à l'absence d'une substance sur la base des résultats de l'étude d'une

seule espèce choisie au hasard, attitude qui a conduit certains auteurs à nier la présence de chitine dans les structures métaplasmatiques de la Classe des Ciliés.

BIBLIOGRAPHIE

- BUSCH W. (1926). — Beitrag zur Kenntnis der Gehäusebildung bei den Tintinnidae und zur Kenntnis mariner Ciliaten. *Arch. f. Prot.*, **53**, p. 183-190.
- BUSSERS J. Cl. ET JEUNIAUX Ch. (1970). — Recherches préliminaires sur la présence de chitine dans les kystes de quelques Ciliés. *J. Protozool.*, **17**, suppl. n° 119, p. 32.
- BUSSERS J. Cl. ET JEUNIAUX Ch. (1973). — Chitinous cuticle and systematic position of Tardigrada. *Biochemical Systematics*, **1**, p. 77.
- CHUNOSOFF C. AND HIRSHFIELD H.I. (1964). — A cytochemical investigation of the cysts of a species of *Blepharisma*. *J. Protozool.*, **11**, suppl. 90, p. 29.
- CORLISS J. (1960). — Comments on the systematics and phylogeny of the Protozoa. *Syst. Zool.*, **8**, 169-190.
- DEMAR-GERVAIS C. (1971). — Recherches sur le cycle biologique de *Fabrea salina* Henn. Thèse Doct. État Fac. Sc. Paris.
- DOGIEL V.A., POLJANSKY J.I. ET CHEJSIN E.M. (1965). — General Protozoology. Oxford, Clarendon Press.
- FAURÉ-FRÉMIET E. (1904). — Sur la formation de la coque et sa structure chez les Vaginicolinae. *C.R. Soc. Biol.*, 57-551.
- FAURÉ-FRÉMIET E. (1948). — Le rythme de marée du *Strombidium oculatum* Gruber. *Bull. Biol.*, **82**, 1-20.
- FAURÉ-FRÉMIET E., GAUCHERY M. et TUFFRAU M. (1954). — Les processus d'enkystement chez *Euplotes muscicola* Kahl. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **88**, 154-167.
- HOLT P.A. (1972). — An electron microscope study of the rhabdophorine ciliate *Didinium nasutum* during excystment. *Trans. Amer. Micr. Soc.*, **91** (2), 144-168.
- JEUNIAUX Ch. (1958). — Recherches sur les chitinases. I. Dosage néphélométrique et production de chitinase par des Streptomycètes. *Arch. Intern. Phys. et 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. Intern. Physiol. et Bioch.*, **67**, 597-617.
- JEUNIAUX Ch. (1963). — Chitine et Chitinolyse. Paris, Masson.
- JEUNIAUX Ch. (1965). — Chitine et Phylogénie; application d'une méthode enzymatique de dosage de la chitine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **47**, 2267-2278.
- JEUNIAUX Ch. (1971). — Chitinous structures. In : *Comprehensive Biochemistry*, ed. by Florkin & Stotz, vol. 26, part. C : Extracellular and supporting structures). Amsterdam, Elsevier, 1971, 595-632.
- JEUNIAUX Ch. (1971). — On some biochemical aspects of regressive evolution in animals. *Biochem. Evol. and the Origin of Life*, ed. by Schoffeniels, North-Holland, 304-313.
- KAHL A. (1935). — Wimpertiere oder Ciliata. in Die Tierwelt Deutschlands, Dahl, Springer Verlag, Berlin.
- KUDO R.R. (1926). — Protozoology. C. Thomas publ. Illinois, U.S.A.
- MAUPAS E. (1883). — Contribution à l'étude morphologique et anatomique des Infusoires Ciliés. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, 2^e série, **I**, 427-664.
- REPAK A.J. ET PFISTER R.M. (1967). — Electron microscopical observations on the extracellular structures of the resting cysts of *Blepharisma stoltei*. *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, **86** (4), 417-421.
- RIEDER N. (1973). — Elektronenoptische und histochemische Untersuchungen an der Cystenülle von *Didinium nasutum* O.F. Müller (Ciliata, Holotricha). *Arch. Protistenk.*, **115**, 125-131.
- TIBBS J. (1966). — The cyst wall of *Colpoda steinii*. A substance rich in glutamic acid residues. *Biochem. J.*, **98**, 3, 645-651.