

(Communication reçue le 5 avril 1973.)

STRUCTURE ET COMPOSITION DE LA CUTICULE DE *MACROBIOTUS* Sp. ET DE *MILNESIUM TARDIGRADUM*

(Tardigrades)

par J. C. BUSSERS et Ch. JEUNIAUX

Université de Liège, Institut Éd. Van Beneden,

Laboratoires de Morphologie, Systématique et

Écologie animales, quai Van Beneden 22, B-4000 Liège

RÉSUMÉ

La structure et la composition de la cuticule des Tardigrades *Macrobiotus* sp. et *Milnesium tardigradum* sont examinées. La cuticule est toujours constituée de deux couches distinctes ; elle se prolonge dans le stomodeum.

Dans les deux espèces, la cuticule contient, outre la chitine, des mucopolysaccharides acides et des protéines. Ces constatations plaident en faveur d'un rapprochement des Tardigrades avec les Arthropodes.

INTRODUCTION

Peu d'auteurs se sont intéressés à la structure et à la nature chimique de la cuticule des Tardigrades. Les renseignements fournis par la littérature ancienne sont vagues et contradictoires. Pour Marcus (1927, 1928, 1929), la cuticule n'est pas chitineuse ; par contre Cuénot la considère comme chitineuse (1932) ou comme « chitinoïde » (1949).

Des informations plus précises sur la composition de la cuticule des Tardigrades pourraient cependant constituer de nouveaux arguments d'ordre morphologique ou biochimique pour revoir les relations phylétiques de ce petit groupe zoologique « incertae sedis ».

Quelques travaux récents ont apporté des informations intéressantes à ce point de vue. La cuticule d'*Echiniscus viridis*, examinée en microscopie électronique par Crowe et coll. (1970)

est constituée d'un nombre de strates variable selon les endroits ; d'après les auteurs cités, cette organisation rappelle celle de certains Nématodes et est considérée comme un argument en faveur d'un rapprochement entre les deux classes.

La cuticule de *Macrobiotus areolatus* étudiée par Crowe et coll. (1971) est faite de deux couches complètes distinctes, riches en mucopolysaccharides acides, en protéines liées à des phospholipides et à des polysaccharides mais dépourvues de chitine, ce qui amène les auteurs à maintenir leur hypothèse de l'origine des Tardigrades à partir des Aschelminthes.

Bacetti et Rosati (1971), décrivant avec grande précision l'ultrastructure du tégument de *Macrobiotus hufelandi*, distinguent d'une part une épicuticule, une intracuticule et une couche cireuse dépourvues de chitine, et d'autre part une procuticule chitineuse ; ils divisent l'épicuticule et l'intracuticule en de nombreuses couches de composition différente. La présence de chitine est démontrée au niveau de certaines couches cuticulaires par la comparaison en microscopie électronique de coupes ultramines préalablement traitées ou non par une chitinase bactérienne Sigma. Les arguments chimiques et ultrastructuraux de cette remarquable étude permettent aux auteurs de ranger les Tardigrades à côté des Onychophores, et de les rapprocher des Arthropodes.

Nos observations (Bussers et Jeuniaux, 1973) confirment les vues de Bacetti et Rosati (1971), et sont opposées aux conclusions de Crowe et coll. (1971) en ce qui concerne l'absence de chitine. Nous avons en effet démontré la présence incontestable de chitine dans la cuticule de trois espèces de Tardigrades (*Milnesium tardigradum*, *Macrobiotus* sp. et *Echiniscus merokensis*). Nos conclusions sont basées sur l'hydrolyse rapide et complète de la cuticule, préalablement traitée par de la soude normale à 100° C., sous l'action hautement spécifique d'une solution concentrée de chitinase d'origine bactérienne purifiée selon la méthode de Jeuniaux (1958, 1959, 1965).

Le présent travail, qui a été entrepris à un moment où nous n'avions pas connaissance de la publication de Bacetti et Rosati (1971), porte sur l'étude morphologique et topochimique de la cuticule de deux espèces d'Eutardigrades.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les Tardigrades étudiés sont *Milnesium tardigradum* Doyère et *Macrobiotus* sp. Ils ont été extraits en grand nombre d'une mousse en provenance de Houffalize (province belge du Luxembourg).

Les mousses sont plongées pendant 2 à 4 heures dans l'eau de source (« Spa Reine »). Les mousses sont compressées ensuite de manière à recueillir l'eau d'imbibition, où les Tardigrades sont récoltés au moyen de micropipettes.

Les individus sont fixés au Zenker, longuement lavés. On les inclut par la méthode de la double inclusion en gélose-paraffine (méthode de Chatton) qui permet une orientation et des manipulations aisées. Outre la coloration topographique à l'Azan de Heidenhain, les réactions histochimiques suivantes ont été appliquées.

La mise en évidence des radicaux carbonyles primaires est effectuée par traitement par le réactif de Schiff, accompagné du contrôle par blocage des radicaux par le bisulfite de sodium (Gabe, 1968).

La recherche des glucides a été effectuée à l'aide de la réaction du P.A.S. (Mac Manus, 1946) contrôlée par acétylation réversible et action de l'eau et de l'amylase à 37° C., selon Gabe et Martoja (1956).

Les mucopolysaccharides acides sont mis en évidence par la coloration de Mowry (1963) au Bleu Alcian en milieu acide, avec contrôle par méthylation réversible (Fisher et Lillie, 1954). La réaction métachromatique au Bleu de toluidine est observée d'abord dans le tampon Walpole à pH 4.2. et ensuite après passage dans l'alcool éthylique de façon à distinguer les métachromasies β et γ .

La mise en évidence des protéines est obtenue par les méthodes de Sols (1947) et à la Chloramine T- Schiff (Chou, 1953). La méthode de Sols est une adaptation à l'histochimie de la réaction du biuret ; elle est très spécifique mais très peu sensible.

La méthode de Chou est basée sur une désamination oxydative ; elle est contrôlée par les tests de désamination par l'acide nitreux et d'acétylation (Lillie, 1964).

Les radicaux soufrés -SH et -S-S- ont été recherchés selon la méthode de Chèvremont et Frédéric (1943).

La réaction de Millon, adaptée par Baker (1956) décèle le radical tyrosine, tandis que la réaction argentaffine situe certains polyphénols.

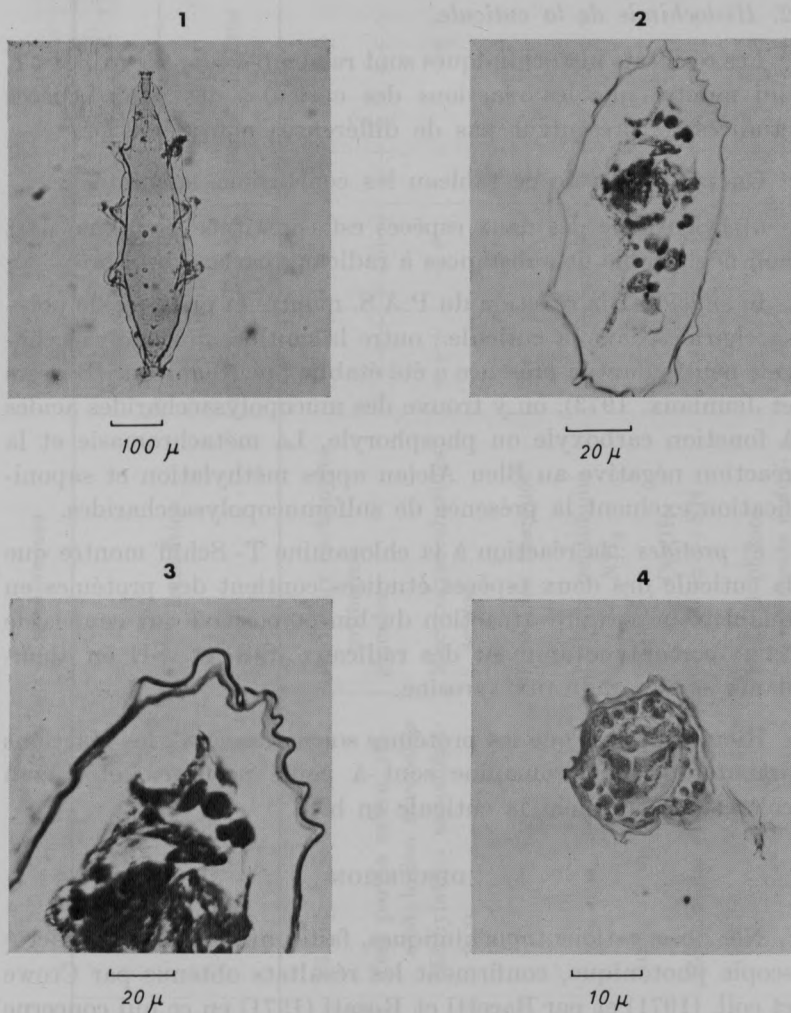
RÉSULTATS

1. *Structure de la cuticule.*

Macrobiotus sp. possède une cuticule formée de deux couches intimement accolées (fig. 4), qu'on distingue aisément par la différence de coloration par l'Azan ; la couche externe apparaît comme un liseré plus coloré, épais de $0.5\ \mu$ environ ; la couche interne, moins colorée, a une épaisseur approximative de $2\ \mu$; cette épaisseur peut diminuer de moitié sous les nombreux plis cuticulaires visibles. La couche interne n'est pas homogène mais présente un aspect feuilleté irrégulier.

Chez *Milnesium tardigradum*, les deux couches cuticulaires sont plus distinctes (fig. 1, 2 et 3) parce qu'elles sont nettement séparées surtout au niveau des flancs de l'animal. Les cuticules externe et interne mesurent respectivement 1.5 et $2.5\ \mu$. La strate externe se colore moins fort (à l'Azan) que l'interne, qui montre une structure en feuillet.

Chez les deux espèces, les deux couches cuticulaires sont colorées en bleu par l'Azan ; la partie antérieure du tube digestif est également recouverte d'une cuticule stomodéale d'une seule couche, colorée en bleu par l'Azan, alors que les griffes et la zone articulaire où elles sont insérées sont colorées en rouge, ce qui indique une différence de composition ; il pourrait s'agir de protéines tannées. Rappelons que, sans être une méthode histo-chimique rigoureuse, la coloration rouge donnée par l'Azan à des structures anhistes et chitino-protéiques coïncide avec un tannage des protéines constitutives ainsi que l'ont démontré Richards (1951) sur la cuticule des insectes, Wilmotte (1967) sur le péricarpe des Hydrozoaires et Bay (1969) sur la cuticule du pédoncule des Endoproctes.



La cuticule des Tardigrades est constituée de deux strates bien distinctes.

Fig. 1. — *Milnesium tardigradum* in toto après élimination des protéines ; coloration au Rouge Congo.

Fig. 2 et 3. — Coupe transversale de *Milnesium tardigradum* ; coloration à l'Azan.

Fig. 4. — Coupe transversale de *Macrobiotus* sp. au niveau du pharynx et d'une patte ; coloration à l'Azan.

2. *Histochimie de la cuticule.*

Les résultats histochimiques sont rassemblés dans le tableau I, qui montre que les réactions des cuticules des deux espèces étudiées ne présentent pas de différences marquées.

On peut tirer de ce tableau les conclusions suivantes :

a) la cuticule des deux espèces est constituée pour une part non négligeable de substances à radicaux carbonyles libres.

b) *glucides* : la réaction du P.A.S. montre la présence de polysaccharides dans la cuticule ; outre la chitine, mucopolysaccharide neutre dont la présence a été établie précédemment (Bussers et Jeuniaux, 1973), on y trouve des mucopolysaccharides acides à fonction carboxyle ou phosphoryle. La métachromasie et la réaction négative au Bleu Alcian après méthylation et saponification excluent la présence de sulfomucopolysaccharides.

c) *protides* : la réaction à la chloramine T- Schiff montre que la cuticule des deux espèces étudiées contient des protéines en quantité importante (réaction du biuret positive sur coupes de 12 μ) portant notamment des radicaux -S-S- et -SH en abondance et des radicaux tyrosine.

Rien n'indique que les protéines soient tannées : les réactions argentaffine et chromaffine sont à peine positives, et l'Azan colore uniformément la cuticule en bleu.

DISCUSSION

Nos observations topochimiques, faites uniquement en microscopie photonique, confirment les résultats obtenus par Crowe et coll. (1971) et par Bacetti et Rosati (1971) en ce qui concerne la présence de mucopolysaccharides acides et de protéines, que nous ne pouvons évidemment situer avec autant de précision que Bacetti et Rosati.

Nos résultats apportent quelques précisions supplémentaires à savoir : la présence de substances à radicaux carbonyles libres dans les deux couches cuticulaires observées par nous, l'absence de sulfomucopolysaccharides, la présence de protéines riches en radicaux tyrosine, -SH et -S-S- et la possibilité d'un tannage

TABLEAU 1
Résultats histochimiques

Traitement	Contrôle	Indication	Macrobiotus		Milnesium	
			Cuticules externe	interne	Cuticules externe	interne
Liqueur de Schiff	Blocage par NaHSO ₃	Radicaux carbonyles primaires glucides	+	(1)	+	+
R. du P.A.S. (Mac Manus)	Test par la salive, et acétylation réversible		++++	++++	+++	+++
R. au Bleu Alcian	Méthylation saponifica- tion	Mucopolysaccharides acides	+++	++	+	+++
Métachromasie		»	β	β	β	β
Acidophilie		Protéines basiques	—	—	—	—
(Jaune Naphtol)						
R. du biuret (Sols)		Liaison peptidique	++	++	+++	+++
R. à la chloramine	Acétylation	— CH $\begin{matrix} \nearrow \text{NH}_2 \\ \searrow \text{COOH} \end{matrix}$	+++	+++	+++	+++
T-Schiff (Chou)						
R. de Chèvremont et Frédéric	Réductions et blocages	— S-S- et — SH	+++	+++	+++	+++
R. de Millon (Baker)		Radical phénol	±	±	+	+
R. Argentaffine		Groupelements réduc- teurs	++	—	+++	±

important des protéines au niveau des griffes. En ce qui concerne les relations phylétiques des Tardigrades, le présence de chitine, que nous avons établie avec certitude chez 3 espèces de Tardigrades (Bussers et Jeuniaux, 1973), confirment et élargissent les résultats obtenus par Bacetti et Rosati (1971) sur une seule espèce. La nature typiquement chitineuse de la cuticule écarte la possibilité d'un rapprochement entre Tardigrades et Nématodes proposé par Crowe et coll. (1971). Par contre l'existence d'une cuticule chitineuse, la présence de griffes chitineuses durcies probablement par des protéines tannées et la présence d'un stomodeum également de nature chitineuse sont des arguments en faveur d'un rapprochement phylétique des Tardigrades et des Arthropodes.

SUMMARY

The structure and the composition of the cuticle of the Tardigrada *Macrobiotus* sp. and *Milnesium tardigradum* are studied. The cuticle is always made of two distinct layers extending to the stomodeum.

By the two species, the cuticle contents, besides chitin, acid mucopolysaccharides and protids. These facts are arguments to bring nearer Tardigrades and Arthropods.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement Mademoiselle Nicole DECLoux dont la précieuse collaboration a permis de réaliser les coupes et d'appliquer les réactions topochimiques signalées dans ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- BACETTI, B. et ROSATI, F. (1971). — Electron microscopy on Tardigrada : III. The integument., *J. Ultrastr. Res.*, **34**, 214.
- BAY, D. (1969). — Morphologie et constitution chimique des structures cuticulaires de quelques endoproctes. Mémoire de Licence en Zoologie. Université de Liège.
- BUSSERS, J. C. et JEUNIAUX, Ch. (1973). — Chitinous cuticle and Systematic position of Tardigrada. *Biochem. System.*, **1**, 77.

- CROWE, J. H., NEWELL, I. M. et THOMSON, W. W. (1970). — *Echiniscus viridis* (Tardigrada) : Fine structure of the Cuticule, *Trans. Amer. Micr. Soc.*, **89**, 316.
- CROWE, J. H., NEWELL, I. M. et THOMSON, W. W. (1971). — Fine structure and chemical composition of the cuticle of the Tardigrade *Macrobiotus areolatus* Murray, *J. Microscopie*, **11**, 107.
- CUENOT, L. (1932). — Tardigrades, Faune de France, n° 24, Lechevalier, Paris.
- CUENOT, L. (1949). — Les Tardigrades, in *Traité de Zoologie* de Grassé, Masson, Paris.
- GABE, M. (1968). — Techniques histologiques, Masson, Paris.
- JEUNIAUX, Ch. (1958). — Recherche sur les chitinases. I. Dosage néphélométrique et production de chitinase par des Streptomycètes, *Archives Inter. Physiol. Bioch.*, **66**, 408-427.
- JEUNIAUX, Ch. (1959). — Recherche sur les chitinases. II. Purification de la chitinase d'un Streptomycète et séparation électrophorétique de principes chitinolytiques distincts, *Arch. Inter. Physiol. Bioch.*, **67**, 597.
- JEUNIAUX, Ch. (1965). — Chitine et phylogénie : application d'une méthode enzymatique de dosage de la chitine, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **47**, 2267.
- MARCUS, E. (1927). — Zur Okologie und Physiologie der Tardigraden, *Zool. Jahrb. Allg. Zool.*, **44**, 323.
- MARCUS, E. (1928). — Zur vergleichenden Anatomie und Histologie der Tardigraden, *Zool. Jahrb. Allg. Zool.*, **45**, 99.
- MARCUS, E. (1929). — Tardigrada, Bronns Kl. u. Ord. d. Tierreichs, 5.
- WILMOTTE, C. (1967). — Étude de quelques structures chitineuses chez les Cnidaire, Mémoire de Licence, Université de Liège.