

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE LA
CALCIFICATION TÉGUMENTAIRE CHEZ UN INFUSOIRE CILIÉ
COLEPS HIRTUS

par

EMMANUEL FAURÉ-FREMIET, JOSEPH STOLKOWSKI
ET JEANNINE DUCORNET

Laboratoire d'Embryogénie comparée, Collège de France, Paris (France)

BENESCH et ses collaborateurs^{1, 2} ont montré que chez les Vertébrés, la calcification osseuse est inhibée par certains composés sulfamidés agissant soit sur l'anhydrase-carbonique, soit sur une phosphatase, soit sur ces deux ferments à la fois. Chez les Invertébrés, STOLKOWSKI³ a pu de même retarder sous l'effet du benzène-sulfamide la régénération de la coquille chez l'escargot; or, la présence d'une phosphatase alcaline dans le manteau de ce gastéropode a été constatée par MANIGAULT⁴, et celle de l'anhydrase-carbonique par MAETZ⁵.

Nous avons étendu ces recherches au cas d'un Protozoaire, l'infusoire cilié *Coleps hirtus* (NITZSCH) dont le tégument est calcifié:

On sait que, chez les différentes espèces du genre *Coleps* le tégument, souvent décrit sous le nom de cuirasse, comporte une série de lamelles rigides et ornementées, disposées parallèlement les unes aux autres en cinq séries annulaires ou verticilles (Fig. 1). La forte minéralisation de ces lamelles est montrée par leur persistance après incinération⁶ (Fig. 2). FAURÉ-FREMIET ET HAMARD⁷ ont examiné leur composition chimique chez *C. hirtus*. Ces auteurs ont montré qu'il existait en abondance du carbonate de chaux dans le tégument calcifié de ce *Coleps*. Les cendres constituent environ 32% du poids sec de l'infusoire, soit 12 à 14% de son poids humide. Elles donnent avec la liqueur nitromolybdique un léger précipité de phosphomolybdate. Cependant la présence de phosphore n'a pu être démontrée au niveau des lamelles par une réaction histochimique, tandis que la présence du calcium est nettement accusée par la réaction de VON KOSA⁸ au nitrate d'argent (Fig. 1), et mieux encore par celle de STOELZNER⁹ à l'acétate de cobalt, qui l'une et l'autre dessinent en noir intense tous les détails de la cuirasse.

L'accroissement protoplasmique d'un *Coleps*, entre deux divisions, se traduit seulement par l'écartement des plaques sur chaque verticille; au moment de la bipartition, les deux verticilles médians se séparent, découvrant à l'équateur une masse protoplasmique nue qui s'allonge avant de subir une constriction équatoriale. Sitôt après la bipartition, chaque individu fils montre une moitié de son corps cuirassé (la moitié antérieure pour le proter et la postérieure pour l'opisthe) et l'autre nue; très rapidement le dessin de la demi-cuirasse à reconstituer est tracé par une série régulière d'épaississements superficiels; ceux-ci sont probablement formés par une matrice organique, et peut-être glycoprotéique⁷ qui se calcifie en peu de temps. La réfringence des pièces

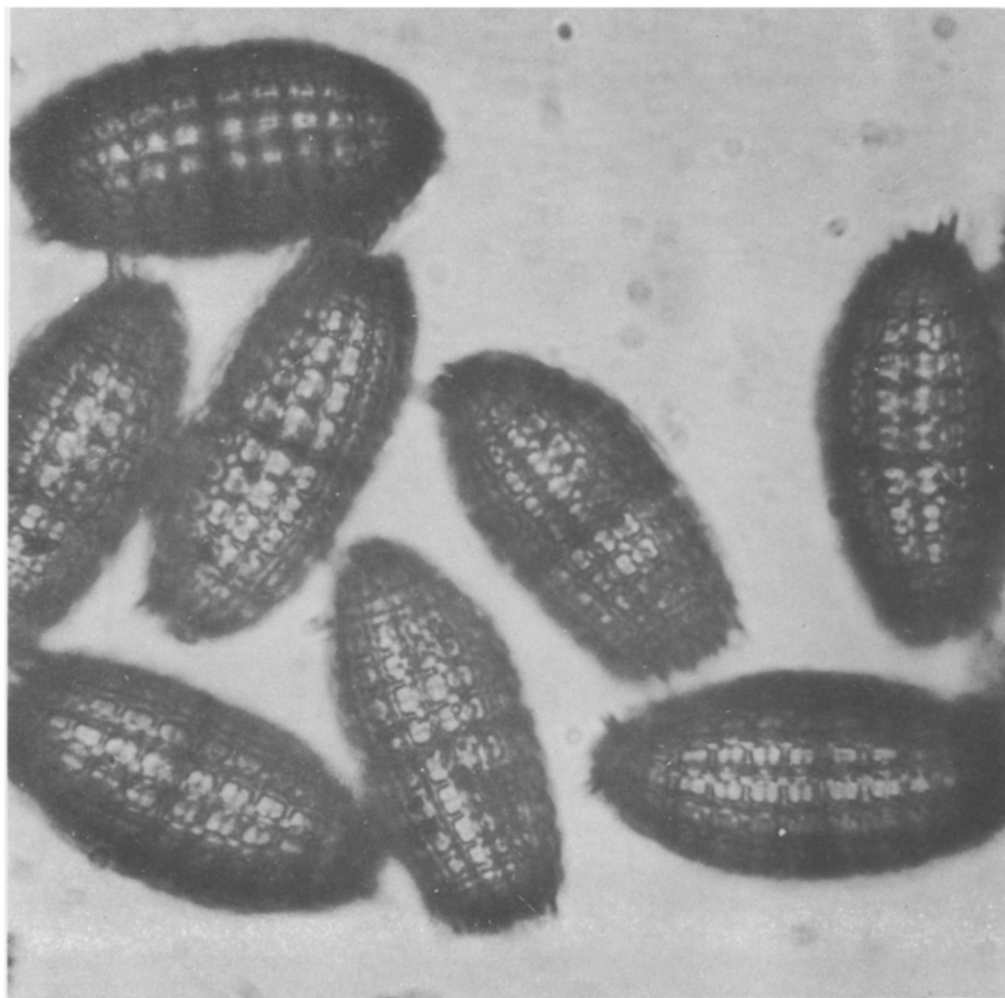


Fig. 1. *Coleps hirtus*. Imprégnation argentique de la cuirasse calcifiée.

calcifiées de la cuirasse se traduit par un aspect sombre très caractéristique même sous un faible grossissement; dans une population de *Coleps* cultivée *in vitro*, les individus qui viennent de se diviser sont aisément reconnaissables; leur proportion est faible et apparemment constante.

EFFETS DE DEUX SULFAMIDES SUR *COLEPS HIRTUS* ET MISE EN ÉVIDENCE D'UN MÉCANISME ENZYMATIQUE

Nous avons utilisé des cultures de *C. hirtus* entretenues dans des lames creuses et des godets de Syracuse, et nourries avec de petits fragments d'intestin larvaire de *Chironomus*. Ces infusoires supportent sans aucun dommage la présence, dans leur milieu, de benzène-sulfamide N/200; dès les premiers essais, nous avons constaté que la propor-

Bibliographie p. 673.

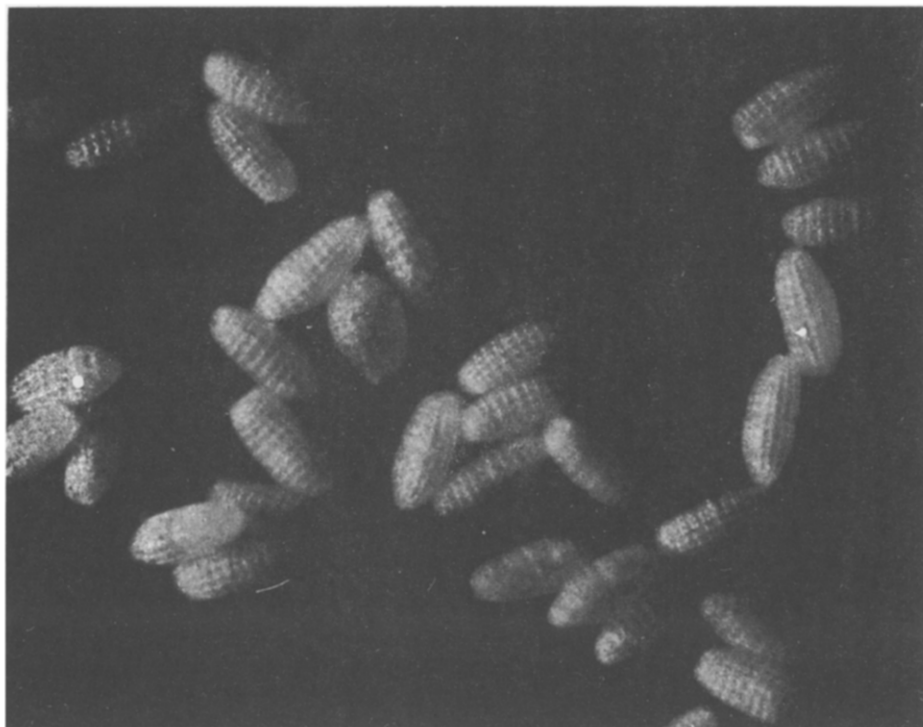


Fig. 2. Groupe de *Coleps* après incinération

tion des individus portant une demi-cuirasse augmentait très notablement en présence de ce corps, ce qui indiquait une inhibition de la calcification.

De nombreux essais nous ont toujours donné le même résultat, tout en nous montrant, d'autre part, que celui-ci n'est pas durable. Notons, d'ailleurs, que le milieu renferme des bactéries qui continuent de se développer en présence du sulfamide. Nous avons alors modifié la technique de culture en renouvelant fréquemment le milieu liquide, et en accroissant progressivement pendant 8 à 10 jours, de N/200 à N/110 la concentration du benzène sulfamide utilisé. Dans ces conditions la presque totalité des individus apparaît bientôt comme à demi ou complètement décalcifiée. C'est alors qu'une complication d'ordre éthologique intervient: les *Coleps* décalcifiés se dévorent les uns les autres et ce cannibalisme limite dangereusement le développement des cultures.

Les préparations au cobalt (Fig. 3) vérifient le résultat de l'observation des populations vivantes, et apportent quelques détails complémentaires; un certain nombre d'individus n'ont plus de cuirasse; beaucoup portent une demi-cuirasse, antérieure ou postérieure; quelques uns possèdent seulement un verticille de plaques; dans presque tous les cas, la partie nue du corps montre cependant un dessin grisâtre, comme si la calcification était très fortement ralentie, plutôt que totalement supprimée; enfin on observe souvent, dans le cytoplasme, quelques gros granules noirs, de nature apparemment calcaire (Fig. 4).

Si l'on utilise non plus le benzène sulfamide mais le Dagenan 673 M.B. ou paraminophénylsulfapyridine aux concentrations correspondantes, on n'obtient plus aucun

résultat, et la proportion des individus en voie de recalcification reste constamment aussi faible que dans les cultures normales.

Ces résultats sont étroitement comparables à ceux déjà cités concernant les Vertébrés et l'escargot; comme eux, ils permettent de penser que le benzène sulfamide agit sur un mécanisme enzymatique qui intervient dans la calcification de la cuirasse. De fait nous avons pu déceler la présence d'une phosphatase alcaline chez *Coleps hirtus*; à cet effet, plus de 300 individus préalablement lavés pour éliminer le plus grand nombre des Bactéries, ont été broyés et autolysés à 37° en présence de toluène; après 36 heures d'incubation, nous avons pu révéler l'activité phosphatasique



Fig. 3. *Coleps* ayant subi l'action du benzènesulfamide et montrant une calcification incomplète (préparation à l'acétate de cobalt, puis H_2S).

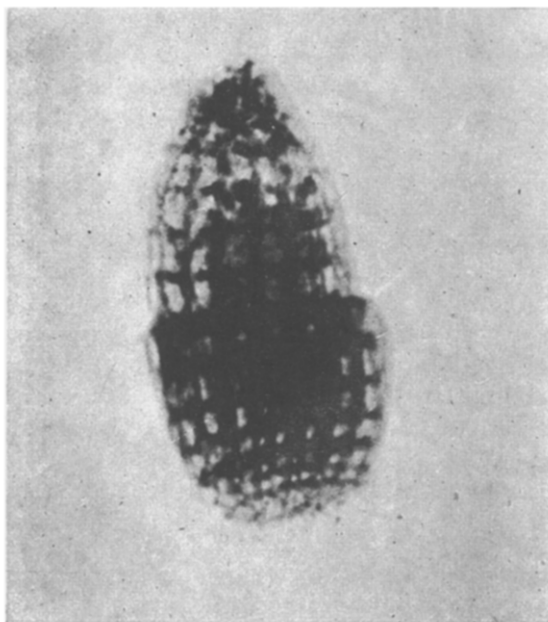


Fig. 4. *Coleps* traité et préparé comme ceux de la Fig. 3 montrant le détail de la calcification incomplète.

par la méthode de BERENBLUM ET CHAIN¹⁰; le résultat est très nettement positif.

Nous avons également essayé de déceler l'anhydrase carbonique, sans obtenir cette fois de résultat positif; on ne saurait cependant conclure de cet insuccès à l'absence du ferment, car la dilacération d'un nombre suffisant de *Coleps* représente une sérieuse difficulté technique.

LES CONSTITUANTS MINÉRAUX DE LA CUIRASSE DU *COLEPS*

Les faits que nous venons d'exposer ont conduit l'un de nous à reprendre l'étude des constituants minéraux de la cuirasse chez *Coleps hirtus*. G. CHAMPETIER (cf.⁷), utilisant une poudre fine formée de *Coleps* fixés à l'alcool, puis desséchés, avait

obtenu, par la méthode DEBYE-SCHERRER, un diagramme de rayons X dépourvu de toute

interférence d'origine cristalline: il en avait été conclu que le calcaire présent dans le tégument de *Coleps hirtus* était amorphe, ce qui s'accordait avec l'absence de toute trace d'anisotropie optique.

Nous avons effectué de nouveaux examens avec une chambre à focalisation associée au monochromateur (STOLKOWSKI¹¹); après 48 heures de pose, les diagrammes de diffraction obtenus ont montré l'existence de quelques raies faibles, correspondant aux intervalles des plans réticulaires dont les valeurs sont:

$$\left. \begin{array}{l} d = 7.49 \\ 4.22 \\ 3.40 \\ 3.04 \\ 2.97 \end{array} \right\} \text{Angströms}$$

Or, les intervalles caractéristiques du phosphate dicalcique bihydraté et du phosphate dicalcique anhydre sont les suivants, par ordre d'intensité décroissante:

d	intensité
3.35	1.00
2.95	0.75

pour le phosphate dicalcique anhydre; et pour le phosphate dicalcique bihydraté:

d	intensité
4.24	1.00
7.60	0.67
3.04	0.67

ce qui nous permet d'affirmer que nous nous trouvons en présence d'un mélange des deux corps: les raies dont les valeurs mesurées sont 7.49, 4.22 et 3.04 Å correspondant au phosphate dicalcique bihydraté et les raies $d = 3.40$ et 2.97 au phosphate dicalcique anhydre.

Il est curieux que le calcaire n'apparaisse pas; soulignons toutefois que ce calcaire, s'il existait sous forme de calcite, et en faible quantité, ne pourrait se distinguer. En effet, la raie sensible de la calcite correspond à un intervalle de 3.04 Å et se confond par conséquent avec la raie du phosphate dicalcique hydraté. Mais nous avons vu que le calcaire existe en grande quantité. Peut-on conclure à l'existence d'un calcaire amorphe? Faute d'une démonstration positive nous remarquons que le cas du *Coleps hirtus* pose un problème identique à celui que l'on rencontre dans l'étude de la structure de l'os; rappelons alors l'explication proposée par PRENANT¹², à savoir que l'étude du tégument des Crustacés et l'expérimentation *in vitro* ont prouvé que le phosphate de calcium stabilise le calcaire sous sa forme "amorphe".

Cette interprétation s'applique vraisemblablement au tégument calcifié du *Coleps hirtus*, à moins d'admettre que le carbonate de calcium ne soit dissimulé dans un complexe organique.

RÉSUMÉ

1. Le benzène sulfamide inhibe la calcification du tégument chez *Coleps hirtus*. Les animaux supportent parfaitement le sulfamide aux concentrations où nous l'avons employé. Le Dagenan 673 M.B. est sans action. Ceci prouve, par analogie avec les travaux de BENESCH^{1, 2}, que l'incrustation minérale du tégument chez *C. hirtus* dépend d'un mécanisme enzymatique.

Bibliographie p. 673.

2. De fait, nous avons pu déceler la présence d'une phosphatase alcaline. Nous n'avons pu prouver, par contre, l'existence de l'anhydrase carbonique.

3. Nous avons repris l'étude aux rayons X du tégument calcifié et nous y avons détecté un mélange de phosphates dicalciques, bihydraté et anhydre. Le calcaire n'apparaît pas sur les diagrammes. Il serait peut-être stabilisé sous la forme "amorphe" par le phosphate de calcium.

SUMMARY

1. Benzene sulphamide inhibits the calcification of the integument in *Coleps hirtus*. The animals stand perfectly the sulphamide at concentrations used by us. Dagenan 673 M.B. is without action. This proves, by analogy with the investigations of BENESCH¹,², that the mineral incrustation of the integument in *C. hirtus* depends on an enzymic mechanism.

2. Actually we have been able to detect the presence of an alkaline phosphatase. On the other hand, we have been unable to demonstrate the existence of carbonic anhydrase.

3. We have re-studied the calcified integument by X-rays, and we have detected a mixture of di-calcium phosphates, di-hydrated and anhydrous. No lime appears in the diagrams. It is possibly stabilised in the "amorphous" form by calcium phosphate.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Benzensulfamid hemmt die Kalzifizierung der Verschalung bei *Coleps hirtus*. Die Tiere vertragen das Sulfamid in den von uns angewandten Konzentrationen gut. Dagenan 673 M.B. hat keine Wirkung. Dies beweist, analog den Arbeiten von BENESCH¹,², dass die mineralische Verkrustung der Schale bei *C. hirtus* von einem enzymatischen Mechanismus abhängt.

2. Tatsächlich konnten wir die Anwesenheit einer alkalischen Phosphatase nachweisen. Dagegen konnten wir das Vorhandensein von Kohlensäureanhydrase nicht beweisen.

3. Wir wiederholten mit Röntgenstrahlen die Untersuchung der verkalkten Schale und entdeckten darin ein Gemisch von Dikalziumphosphaten, und zwar des Dihydrats und Anhydrids. Kalk erscheint nicht auf den Diagrammen. Er wird vielleicht in "amorpher" Form durch das Kalziumphosphat stabilisiert.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ R. BENESCH, N. S. BARRON ET C. A. MAWSON, *Nature*, 153 (1944) 138.
- ² R. BENESCH, M. R. A. CHANGE ET L. E. GLYM, *Nature*, 155 (1945) 203.
- ³ J. STOLKOWSKI, non publié.
- ⁴ P. MANIGAULT, *Ann. inst. océanog. Paris*, 18 (1939) 331.
- ⁵ J. MAETZ, *Bull. inst. océanog. Monaco*, 43 (1946) no. 899.
- ⁶ E. CLAPARÈDE ET J. LACHMANN, *Mém. inst. nat. Genevois*, 5 (1858) 256.
- ⁷ E. FAURÉ-FREMIET ET M. HAMARD, *Bull. biol. France Belg.*, 77 (1944) 136.
- ⁸ VON KOSSA, In LISCN, *Histochemie animale*, Paris 1936, p. 79.
- ⁹ STOELZNER, *Idem*, p. 82.
- ¹⁰ J. BERENBLUM ET E. CHAIN, *Biochem. J.*, 32 (1938) 295.
- ¹¹ J. STOLKOWSKI, *Compt. rend.*, 226 (1948) 933.
- ¹² M. PRENANT, *Ann. physiol. physicochim. biol.*, 5 (1927) 818.

Reçu le 29 juillet 1948