

ESSAIS DE CULTURE DES *ECCRINA FLEXILIS*

LÉGER ET DUBOSCQ

TRICHOMYCÈTES ENDOCOMMENSAUX

DES *GLOMERIS MARGINATA* VILLERS

Par Jehanne-Françoise MANIER

Depuis 1849, date à laquelle Leidy identifiait scientifiquement le premier représentant des Trichomycètes, de nombreux auteurs ont contribué à faire connaître ce groupe, soit par des notes monographiques (1), soit par des Mémoires plus encyclopédiques présentant l'ensemble de nos connaissances sur ces organismes (Duboscq, Léger et Tuzet, 1948 ; Manier, 1950, 1954).

A l'exception des Amœbidiacées ectocommensaux, considérés comme des Protrichomycètes, tous les autres Trichomycètes sont endocommensaux d'Arthropodes et vivent fixés et appliqués à la cuticule chitineuse de l'intestin postérieur de leur hôte. Jusqu'à maintenant, les Trichomycètes ont été étudiés au point de vue morphologique, cytologique, physiologique, évolutif et écologique, mais personne n'a tenté de les cultiver, de les faire vivre en dehors de leur hôte.

La culture d'un organisme parasite présente un intérêt en elle-même ; en outre, dans le cas présent, une culture florissante pourrait éclairer le problème encore litigieux des véritables affinités des Trichomycètes et de leur classification dans l'ensemble du monde vivant. Cette question nous ayant, à plusieurs reprises, préoccupée, nous avons entrepris une série d'essais pour tenter de cultiver les Trichomycètes (2).

Ces premières expériences ont été faites uniquement au moyen de

(1) Pour les références bibliographiques concernant les Trichomycètes, se reporter aux travaux de DUBOSCQ, LÉGER et TUZET (1948), MANIER (1950-1954).

(2) Je remercie bien vivement M. le Professeur BESSIÈRE, qui m'a largement ouvert les portes de son laboratoire pour ce travail. Ses conseils pour toutes les techniques bactériologiques employées et ceux de son Assistante, Mme RICHE, m'ont été particulièrement utiles.

filaments d'*Ecocrina flexilis* Léger et Duboscq vivant dans l'intestin postérieur des *Glomeris marginata* Villers.

Le choix de ce matériel relève uniquement d'une question d'ordre pratique ; les *Glomeris marginata* sont très nombreux dans les gariques des environs de Montpellier ; ils se conservent longtemps en laboratoire et hébergent d'une façon à peu près constante des *Ecocrina*.

Pour ces essais, nous avons emprunté à la bactériologie le principe de cultures dans une verrerie stérile, sur milieux préalablement stérilisés, et nous avons observé les précautions habituelles d'asepsie. Mais il est impossible de pratiquer les cultures de Trichomycètes dans des tubes, dans des boîtes de Piétri ou même sur des lames gélosées placées dans des récipients stérilisés, car il faut pouvoir suivre au microscope la très lente évolution des Trichomycètes. La seule méthode applicable ici est celle des cultures cellulaires ou en goutte pendante. On utilise pour cela des *cuves de Ranvier* faites au moyen d'anneaux de verre fixés sur des lames avec de la lanoline stérilisée. On place, au-dessous du centre d'une lamelle, une goutte du milieu de culture dans laquelle on dépose les *Ecocrina* à cultiver. Cette lamelle sert ensuite à fermer la cellule de Ranvier dont le bord libre de l'anneau a été, lui aussi, préalablement enduit de lanoline. Pour maintenir l'humidité et éviter le plus longtemps possible l'évaporation de la goutte pendante, on place au fond de la cellule quelques gouttes d'eau stérile ; il faut aussi vérifier que l'adhérence de l'anneau à la lame et à la lamelle est parfaite. Ces cultures ont été faites au cours du dernier trimestre de l'année 1953 et en janvier 1954 ; elles ont été placées dans un placard, à l'abri de la lumière et laissées à la température du laboratoire, c'est-à-dire généralement à une température de 17 à 19° sauf durant les jours de congé pendant lesquels, le chauffage ne marchant pas, la température peut baisser jusqu'à 2 ou 3°.

Dans cette première série d'essais, nous avonsensemencé des filaments végétatifs et des filaments à arthrocytes. Les spores durables des Trichomycètes se formant seulement durant une très courte période, au moment de la mue de leur hôte, il est très difficile de se procurer des spores durables pour de nombreux ensemencements dans des milieux variés. Pour ne pas blesser les filaments d'*Ecocrina*, qui, à la moindre rupture de leur membrane d'enveloppe, se vident plus ou moins complètement et ne tardent pas à mourir, les Trichomycètes ont été prélevés et repiqués dans le milieu de culture avec une petite portion de la cuticule chitineuse intestinale à laquelle ils sont fixés par leur pavillon.

Les milieux employés sont des milieux pauvres et naturels :

1) Pour essayer de replacer les parasites dans un milieu aussi voisin que possible de leur milieu naturel, nous avons fait macérer, pendant une heure, 2 grammes de déjections de *Glomeris* dans 100 cc. d'eau de source et nous avons seulement filtré sur bougie. Le filtrat obtenu est gélosé à 2/1.000, au moyen d'une solution de gélose stérile.

2) Milieu au crottin de cheval ; ce milieu a été fait comme le précédent, mais en remplaçant les déjections de *Glomeris* par du crottin de cheval.

3) Milieu à l'eau de carotte : on fait macérer 2 grammes de pulpe dans 100 cc. d'eau de source pendant une heure ; on fait bouillir pendant cinq minutes ; on filtre sur coton hydrophile ; on stérilise enfin pendant 20 minutes à 120°.

4) Milieux aux grains de céréales. Nous avons mis 10 grains d'orge au fond d'un tube, avons jeté 15 cc. d'eau de source et avons stérilisé ce milieu en le portant pendant vingt minutes à 120°, à deux reprises, à un jour d'intervalle. Nous avons laissé reposer le milieu et avons prélevé dans un nouveau tube stérile la zone supérieure limpide, qui a été gélosée à 2/1.000. Nous avons fait deux autres milieux de culture en remplaçant les 10 grains d'orge par 10 grains de blé ou un grain de maïs.

La première constatation que l'on peut faire est la remarquable résistance des *Eccrina* quand on les place dans un milieu de culture. Pratiquement dans tous les milieux mentionnés ci-dessus, on peut conserver pendant plusieurs jours des *Eccrina*, sans que ceux-ci manifestent le moindre symptôme de dégénérescence (la dégénérescence des Trichomycètes se signale d'abord par la localisation du cytoplasme en plages séparées les unes des autres par de grands espaces vides, ensuite leurs tubes se froissent, décrivent des lignes brisées). C'est avec les milieux faits avec des déjections de *Glomeris* et ceux aux grains de céréales que nous avons obtenu les meilleurs résultats. Ainsi, pendant 2 mois et demi, nous avons conservé en parfait état des *Eccrina*, dans un milieu fait avec des déjections de *Glomeris* et renouvelé trois fois. C'était malheureusement nos premiers essais, nous les avons faits sur lame creuse, dans des boîtes de Pétri et il a été impossible de suivre avec précision les progrès possibles de la culture.

Pour éviter cet inconvénient, nous avons repris nos expériences dans des cuves de Ranvier. C'est le milieu aux grains d'orge qui, pour le moment, semble fournir les meilleurs résultats. Si on place dans une goutte de ce milieu un fragment de cuticule intestinale de *Glomeris* à laquelle sont fixés quelques filaments végétatifs et quelques filaments à arthrocytes, presque immédiatement, on peut constater

l'émission des arthrocystes les plus distaux. Cette libération d'arthrocystes se poursuit plusieurs jours, tandis que de nouvelles cloisons apparaissent dans les filaments et que de nouveaux arthrocystes se différencient. Les arthrocystes sont le plus souvent quadri-nucléés, mais ils peuvent être aussi de longues portions syncytiales et représenter une mue partielle de l'*Ecclinide*. Cette reproduction schizogonique est active dans les cultures et les arthrocystes libérés s'allongent d'une façon très sensible (ils peuvent doubler de longueur en 2 ou 3 jours) ; des vacuoles apparaissent dans leur protoplasme.

Dans la plupart de nos cultures, au bout d'une quinzaine de jours, nous avons constaté, dans les arthrocystes ainsi libérés, l'apparition, à un pôle, d'une fissuration qui grandit et finit par diviser longitudinalement tout l'arthrocyste. Celui-ci présente alors deux plages cytoplasmiques latérales qui se contractent légèrement. Au bout d'un mois, les cultures contiennent de nombreuses spores durables biloculaires, montrant chacune deux germes allongés quadri-nucléés, tout à fait conformes à celles que Duboscq, Léger et Tuzet (1948) ont vu se former à la fin de la vie végétative de l'*Ecclina*, au moment de la mue du *Glomeris*. Dans notre culture, la longueur des spores est liée à celle de l'arthrocyste qui leur a donné naissance ; nous en avons mesuré ayant 80  $\mu$ , 60  $\mu$ , 50  $\mu$ , 45  $\mu$  de long sur 10 à 11  $\mu$  de large (la longueur des spores d'*Ecclina flexilis* donnée par Duboscq, Léger et Tuzet est de 60 à 65  $\mu$  de long, 11 à 12  $\mu$  d'épaisseur). Quelquefois on voit un germe quadri-nucléé s'enkyster isolément. Pour le moment, nous n'avons jamais vu, dans nos cultures, se former les spores durables à l'intérieur des filaments ; il semble qu'il y ait d'abord émission d'arthrocystes, puis, secondairement, formation de spores durables.

Dans ces essais préliminaires, surtout préoccupée de conserver et, si possible, de favoriser le développement des *Ecclina*, nous n'avons fait ni les fixations, ni les colorations qui auraient permis une étude cytologique. Cependant, les noyaux étant parfaitement visibles, nous avons pu constater qu'au moment de la formation des spores, les noyaux s'unissent 2 à 2 pour donner de grosses masses nucléaires ; mais il nous a été impossible de suivre les phénomènes sexuels assez complexes décrits par Duboscq, Léger et Tuzet.

Nous avons obtenu ces résultats à la fois en utilisant le milieu aux grains d'orge précédemment signalé, et dans ce même milieu aux grains d'orge dans lequel nous avons ajouté soit 0 gr. 05 de vitamine B12, soit 0 gr. 1 d'autolysat de levure par litre de milieu.

Comme il est très difficile de ne pas introduire de bactéries dans

les cultures, les bactéries étant fréquemment fixées sur l'*Ecchrina* elle-même, nous avons tenté d'arrêter leur développement en ajoutant de l'auréomycine aux milieux de culture. Au préalable, nous avons fait prendre de l'auréomycine à des *Glomeris* en mêlant cet antibiotique à des crottes de lapins dont les *Glomeris* sont très friands. Les *Glomeris*, qui étaient sous-alimentés, avaient mangé totalement cette nourriture ; en les sacrifiant de 2 à 8 jours après le traitement, nous avons constaté qu'ils étaient toujours infestés par de nombreux *Ecchrina*. Nous en avons conclu que ces organismes résistaient bien à l'auréomycine. Or, l'introduction d'auréomycine dans nos milieux n'a pas eu de résultats heureux et paraît beaucoup plus néfaste aux Trichomycètes que la présence, même massive, de bactéries. Les Ecchrinides ont plus ou moins rapidement dégénéré sans émettre d'arthrocystes, ni sporuler.

Les faibles résultats obtenus par cette première série de cultures sont loin de pouvoir jeter un jour nouveau sur le problème de la position systématique des Ecchrinides.

Les milieux fournis jusqu'à maintenant aux *Ecchrina* du *Glomeris* leur permettent seulement de végéter pendant plusieurs semaines ; mais nous n'avons jamais vu se développer des filaments mycéliens comme cela a été fréquemment le cas, dans les mêmes cultures, pour certains champignons habitant l'intestin du *Glomeris*. En quelques heures, on peut voir, en effet, le thalle de champignons authentiques proliférer au point d'envahir toute la goutte pendante. C'est bien loin d'être le cas des Trichomycètes.

Dans un milieu aux grains d'orge, la reproduction schizogonique par arthrocystes est activement déclenchée, mais, au bout d'un certain temps, les arthrocystes finissent par sporuler. Or, chez les Trichomycètes, la sporulation marque le terme de la vie végétative ; elle se produit seulement dans de mauvaises conditions, quand les Trichomycètes vont être expulsés avec la mue rectale.

Nous avons donc, à peu près uniquement assisté à une réaction de défense de l'*Ecchrina* qui ne se trouvait pas dans les conditions favorables à son parfait développement, ou au plus, à un cycle très raccourci dans lequel la multiplication endogène des filaments est supprimée.

Nous poursuivons actuellement ces tentatives de cultures avec les mêmes méthodes et comptons en pratiquer d'autres avec des milieux différents, un autre matériel et à d'autres époques de l'année. Il est à peu près certain que l'état du Trichomycète, au moment de son ensemencement, a une répercussion sur le développement ultérieur de la culture ; pour le moment, seuls, les arthrocystes, éléments

jeunes ou plus exactement, portions rajeunies par une sorte de mue, se sont développés dans nos cultures. Dans les essais à venir et dans la mesure du possible, il sera avantageux de partir de la spore durable ; de sa germination sortirait un élément jeune peut-être plus capable d'adaptation au milieu de culture.

#### BIBLIOGRAPHIE

- DUBOSCQ (O.), LÉGER (L.) et TUZET (O.). — Contribution à la connaissance des Ecclinides. Les Trichomycètes. *Arch. Zool. Exp.*, t. 86, 1948 (fasc. 2).
- MANIER (J.-F.). — Recherches sur les Trichomycètes. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 1950, 11<sup>e</sup> série.
- Trichomycètes. *Traité de Zoologie*, P.-P. GRASSÉ, Masson édit., 1954 (*sous presse*).
-