

RESISTANCE DE LA CHITINE DE LA NACRE DU
NAUTILE (MOLLUSQUE CEPHALOPODE) A L'ACTION
DE CERTAINS FACTEURS INTERVENANT AU COURS
DE LA FOSSILISATION

M. F. VOSS-FOUCART, CH. JEUNIAUX et CH. GREGOIRE

Université de Liège, Institut Ed. Van Beneden, Laboratoires de Morphologie, Systématique et Ecologie animales, quai Van Beneden, 22, B-4000 Liège et Institut L. Frédéricq, Laboratoire de Biochimie Générale et Comparée, 17, Place Delcour, B-4000 Liège, Belgique

(Received 2 August 1973)

Résumé—1. Des fragments de nacre de la paroi de la coque vivante du *Nautilus pompilius* L. ont été exposés à l'action de facteurs physiques jouant un rôle important dans la diagénèse telle que l'élévation de température et de pression.

2. La chitine, un composant des matrices du nacre, subsiste dans des fragments chauffés sous pression à 160°C pendant 53 jours alors qu'il est généralement absent des Nautiloïdes fossilisés contenant toujours des résidus protidiques.

Abstract—1. Fragments of nacre of the wall of the living chamber of *Nautilus pompilius* L. have been exposed to physical factors playing an important part in diagenesis such as elevation of temperature and pressure.

2. Chitin, a component of the matrices of nacre, subsists in fragments heated under pressure at 160°C for 53 days while it is generally missing in fossil Nautiloids still containing protidic residues.

INTRODUCTION

LES TERMES de "chitine", "chitineux" ou "chitinoïde" ont été et sont encore fréquemment utilisés pour décrire nombre de structures squelettiques d'invertébrés sans que la chitine ait été décelée à l'aide d'une méthode spécifique. C'est spécialement le cas des fossiles, pour lesquels il y a très peu d'analyses valables en ce qui concerne la chitine. Abderhalden & Heyns (1933) ont mis en évidence de la chitine dans des restes d'ailes de Coléoptères particulièrement bien conservés dans de l'ambre éocène. Carlisle (1964) a signalé avoir découvert de la chitine dans un fossile cambrien, *Hyolithellus micans* (Billings). Ces résultats suggéraient que la chitine était capable de résister aux conditions de la fossilisation.

Nous avons eu l'occasion de rechercher, à l'aide de la méthode enzymatique spécifique de Jeuniaux (1963, 1965), la présence de chitine dans trois types de fossiles considérés classiquement comme chitineux: des Graptolithes siluriens et ordoviciens (Foucart *et al.*, 1965), des Chitinozoaires ordoviciens (Voss-Foucart & Jeuniaux, 1972) ainsi que des restes cuticulaires d'Euryptérides siluriens (Foucart, 1964). Dans aucun des trois cas, nous n'avons décelé l'existence de chitine

Nous avons également étudié les restes des matrices coquillières d'un grand nombre de Nautiloïdes fossiles (Grégoire & Voss-Foucart, 1970; Voss-Foucart & Grégoire, 1971, 1972). On sait que la conchioline de nacre du nautilé actuel contient de la chitine (Goffinet & Jeuniaux, 1969) et que la chitine est réputée pour sa grande résistance à la dégradation par les agents chimiques usuels. Cependant, dans les restes de Nautiloïdes fossiles décalcifiés et hydrolysés, nous n'avons généralement pas pu mettre en évidence de glucosamine, alors que nous avons décelé des quantités appréciables d'acides aminés d'origine protéique.

L'ensemble de ces observations nous a conduit à poser la question de savoir si la chitine pouvait effectivement résister aux conditions de la fossilisation. Dans une série d'expériences préliminaires, nous avons recherché si la chitine de la nacre du nautilé était capable de supporter les effets d'une élévation de température et de pression pendant des durées d'exposition relativement longues.

MATERIELS ET METHODES

Des fragments de nacre murale de la chambre d'habitation de *Nautilus pompilius* L. ont été soumis à une température de 160°C pendant 53 jours, sous une pression de 442 atmosphères, en présence d'eau distillée. Cette méthode, consistant à faire agir la chaleur et la pression, a été utilisée par Grégoire (1964, 1966) pour simuler sur la coquille des Nautilés actuels, les modifications diagénétiques de la nacre observées au microscope électronique chez les céphalopodes fossiles.

Après ce traitement, une partie des fragments coquilliers a été utilisée pour mettre en évidence la présence éventuelle de chitine à l'aide d'une méthode enzymatique spécifique (Jeuniaux, 1963, 1965). Les fragments ont été lavés à l'eau distillée avant d'être décalcifiés par une solution d'acide chlorhydrique 0,5 N. Les résidus de décalcification ont été centrifugés et lavés, puis traités par une solution de NaOH 0,5 N pendant 6 h à 100°C afin d'isoler la chitine éventuellement présente de ses complexes glycoprotéiques (Jeuniaux, 1965). Après lavage et centrifugation le matériel insoluble dans la soude a été soumis à l'action d'une solution de chitinases purifiées (lot "SA I 55 IV" contenant 708 unités néphélométriques par ml, Jeuniaux, 1958) pendant 8 h à 37°C. Après incubation, le matériel résiduel a été éliminé par centrifugation tandis que le surnageant était traité par de la chitobiase (sérum de homard dilué dix fois) pour hydrolyser le chitobiose et le chitotriose éventuellement présents. L'acétylglucosamine a été ensuite dosée par la méthode de Reissig *et al.* (1955).

Une autre partie des fragments coquilliers a été utilisée pour séparer et analyser par chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions, les acides aminés d'origine protéique encore présents dans la nacre chauffée.

Les fragments coquilliers ont été décalcifiés par une solution d'acide chlorhydrique 0,5 N. Le résidu insoluble et l'acide ayant servi à la décalcification ont été dialysés contre de l'eau distillée, évaporés, et soumis à une hydrolyse acide par HCl 6 N en tube scellé (110°C pendant 24 h). Les acides aminés présents dans l'hydrolysate ont été caractérisés et dosés à l'aide d'un analyseur Beckman Spinco (modèle 120) équipé de façon à réaliser la séparation de l'ensemble des acides aminés à l'aide d'une colonne unique.

RESULTATS

Les résultats du dosage des acides aminés d'origine protéique présents dans la nacre chauffée sont consignés dans le Tableau 1.

On peut constater que les restes protéiques qui subsistent dans la nacre chauffée sont caractérisés par une teneur élevée en glycine (27,6 moles pour cent moles d'acides aminés), les autres acides aminés quantitativement importants étant la sérine (13,4), l'acide glutamique (11,6), l'alanine (10,7) et l'acide aspartique (9,1). Une telle composition est incontestablement voisine de celle des protéines subsistant dans la nacre des Nautiloïdes fossiles (Voss-Foucart & Grégoire, 1971). Le chromatogramme révèle aussi la présence d'un pic élué immédiatement après

TABLEAU 1—ACIDES AMINÉS D'ORIGINE PROTÉIQUE PRÉSENTS DANS LA NACRE D'UN NAUTILÉ ACTUEL, NACRE INTACTE ET NACRE CHAUFFÉE PENDANT 53 JOURS A 160°C SOUS UNE PRESSION DE 442 ATMOSPHÈRES ET DANS LA NACRE D'UN NAUTILÉ JURASSIQUE*

	Nacre intacte <i>Nautilus pompilius</i> actuel	Nacre chauffée <i>Nautilus pompilius</i> actuel	Nacre fossile Nautiloïde jurassique†
Asp	7,1	9,1	9,6
Thr	1,2	+	4,9
Ser	9,6	13,4	15,7
Glu	4,4	11,6	13,7
Pro	0,7	+	2,7
Gly	31,6	27,6	20,7
Ala	26,6	10,7	7,8
Cys	tr	tr	—
Val	1,5	3,4	4,3
Met	0,5	tr	tr
Ile	1,4	2,3	2,2
Leu	2,1	4,6	4,6
Glucosamine	(+)	(+ +)	(-) tr ?
Tyr	1,8	2,6	1,9
Phe	5,1	7,1	2,6
Lys	0,6	7,1	6,3
His	0,5	+	2,9
Arg	5,3	tr	tr

* Résultats exprimés sous la forme de "pourcentages molaires" (n de moles de chaque acide aminé pour 100 moles).

† D'après Voss-Foucart & Grégoire (1971).

le pic de leucine, nous avons pu l'identifier comme étant de la glucosamine. Ce pic n'apparaît pas dans les échantillons de nacres chauffées qui ont été soumis préalablement à l'action des chitinases purifiées. Il est donc bien dû à la présence de chitine. A partir de l'évaluation de la surface du pic et en tenant compte des pertes enregistrées lors de l'hydrolyse acide, nous avons pu calculer que la quantité de glucosamine présente dans la nacre chauffée correspond approximativement à une quantité de chitine égale à 16 $\mu\text{g/g}$ de nacre chauffée non décalcifiée.

Les résultats du dosage de l'acétylglucosamine libérée par l'action successive de chitinases et de chitobiase, sur les résidus de nacre chauffée, décalcifiée et

traitée par NaOH, permettent de calculer une teneur en chitine égale à 13,3 $\mu\text{g/g}$ de nacre chauffée non décalcifiée, ce qui est en bon accord avec les valeurs calculées d'après la quantité de glucosamine libérée par l'hydrolyse acide.

CONCLUSION

Le dosage de la glucosamine libérée par hydrolyse acide et le dosage de l'acétylglucosamine libérée par hydrolyse enzymatique montrent que la chitine présente dans la nacre murale de la chambre d'habitation des *N. pompilius* actuels est capable de résister à l'action de certains facteurs intervenant au cours de la fossilisation, notamment une élévation de température et de pression. Le manque ou en tout cas les teneurs extrêmement basses de glucosamine dans les nacres des Nautiloïdes jurassiques suggère que les conditions expérimentales employées ne reproduisent pas totalement les effets des conditions qu'ils ont réellement supportées malgré la remarquable similitude entre les composantes amino acides protéiques des coquilles "chauffées" et des coquilles fossiles. Des expériences complémentaires sont cependant nécessaires pour déterminer si la chitine résiste effectivement au cours de la fossilisation. Elle font l'objet de nos recherches actuelles.

Remerciements—Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur P. Bartholome du Service de Géologie générale et appliquée (Faculté des Sciences appliquées) qui a bien voulu soumettre nos échantillons aux conditions expérimentales mentionnées, ainsi que Mme S. Bricteux-Grégoire, qui a aimablement mis à notre disposition l'analyseur Beckman Spinco.

REFERENCES

- ABDERHALDEN E. & HEYNS K. (1933) Nachweis vom Chitin in Flüggoresten von Coleopteren des oberen Mitteleocän. *Biochem. Z.* **259**, 320.
- CARLISLE D. B. (1964) Chitin in a Cambrian fossil, *Hyolithellus*. *Biochem. J.* **90**, 1C and 2C.
- FOUCART M. F. (1964) Paleobiochimie et position systématique des Graptolithes. *Mém. dactylographié* 120p.
- FOUCART M. F., BRICTEUX-GRÉGOIRE S., JEUNIAUX CH. & FLORKIN, M. (1965) Fossil proteins of Graptolites. *Life Sci.* **4**, 467-471.
- FOUCART M. F. & JEUNIAUX CH. (1965) Paleobiochimie et position systématique des Graptolithes. *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.* **95**, 39-45.
- GOFFINET G. & JEUNIAUX CH. (1969) Composition chimique de la fraction "nacroïne" de la conchioline de nacre de *Nautilus pompilius* Lamarck. *Comp. Biochem. Physiol.* **29**, 277-282.
- GRÉGOIRE CH. (1964) Thermal changes in the *Nautilus* shell. *Nature, Lond.* **203**, 868-869.
- GRÉGOIRE CH. (1966) Experimental diagenesis of the *Nautilus* shell. Int. Series of Monographs in Earth Sciences. *Advances in Organic Geochemistry*, (Edited by HOBSON J. D. & SPEERS G. C.), Vol. 32, pp. 429-442. Pergamon Press, Oxford.
- GRÉGOIRE CH. & VOSS-FOUCART M. F. (1970) Proteins in shells of fossil Cephalopods (Nautiloids and Ammonoids) and experimental simulation of their alterations. *Arch. int. Physiol. Biochem.* **78**, 191-203.
- JEUNIAUX CH. (1958) Recherches sur les chitinases—I. Dosage néphéométrique et production de chitinase par des Streptomycètes. *Arch. int. Physiol. Biochem.* **66**, 408-427.

- JEUNIAUX CH. (1963) *Chitine et chitinolyse, un chapitre de la biologie moléculaire*. Masson et Cie, Paris.
- JEUNIAUX CH. (1965) Chitine et phylogénie: application d'une méthode enzymatique de dosage de la chitine. *Soc. Chim. Biol. Bull.* **47**, 959-966.
- REISSIG J. L., STROMINGER J. L. & LELOIR L. F. (1965) A modified colorimetric method for the estimation of N-acétylamino sugars. *J. biol. Chem.* **217**, 959-966.
- VOSS-FOUCART M. F. & JEUNIAUX CH. (1972) Lack of chitin in a sample of Ordovician Chitinozoa. *J. Paleont.* **46**, 769-770.
- VOSS-FOUCART M. F. & GRÉGOIRE CH. (1971) Biochemical composition and submicroscopic structures of matrices of nacreous conchiolin in fossil cephalopods (Nautiloids and Ammonoids). *Bull. Inst. Roy. Sci. Nat. Belg.* **47**, 1-42.
- VOSS-FOUCART M. F. & GRÉGOIRE CH. (1972) On biochemical and structural alterations in fossil and in pyrolysed modern mother-of-pearl. *Biomérialisation Forsch.* **6**, 134-140.

Key Word Index—Cephalopod; chitin; diagenesis; fossilization; nacre; paleobiochemistry.