

(Communication présentée le 13 mars 1965.)

### PALÉOBIOCHIMIE ET POSITION SYSTÉMATIQUE DES GRAPTOLITHES

par M. F. FOUCART et Ch. JEUNIAUX.

Institut L. Fredericq, Biochimie, Université de Liège.

*Résumé.* — L'analyse de l'exosquelette de trois échantillons de Graptolithes a permis de mettre en évidence la persistance, dans ces fossiles, de scléroprotéines typiques, dont la composition en acides aminés a pu être identifiée. Ces analyses ont révélé l'absence de chitine dans les fossiles étudiés.

La composition chimique des formations squelettiques des Graptolithes a été comparée à celle d'organismes actuels et utilisée comme argument dans une discussion des affinités systématiques des Graptolithes.

#### I. — INTRODUCTION.

La Paléobiochimie, née avec la découverte de substances organiques dans des roches sédimentaires et des fossiles, plus spécialement avec la mise en évidence et l'analyse de structures protéiques dans des nacres fossiles de Mollusques (FLORKIN *et al.*, 1961), ouvre des perspectives nouvelles. On peut notamment espérer tirer argument de l'analyse des restes organiques fossiles appartenant à des groupes éteints pour confirmer ou corriger les hypothèses formulées au sujet de leur position systématique.

S'il est un groupe dont la parenté zoologique a été discutée, c'est bien celui des Graptolithes. Animaux coloniaux marins, les Graptolithes ont vécu depuis le Cambrien moyen jusqu'au Carbonifère. Leur intérêt stratigraphique est grand. Parmi les Graptolithes, ceux qui appartiennent à l'ordre des *Graptoloidea* sont les fossiles guides de l'Ordovicien et du Silurien.

Les recherches qui ont été entreprises jusqu'à présent pour éclaircir le problème de leurs affinités systématiques ont porté presque exclusivement sur l'examen de leurs caractères morphologiques. Elles ont conduit KOZŁOWSKI (1948) au terme d'une étude approfondie à considérer les Graptolithes comme appa-

rentés aux Ptérobanches. La plupart des zoologistes se sont ralliés aux vues de KOZLOWSKI. Toutefois, cette opinion n'est pas unanimement admise. Certains auteurs proposent au contraire, de considérer les Graptolithes comme des parents proches de certains Cnidaires coloniaux ou des Bryozoaires.

La Paléobiologie peut-elle apporter un argument dans ce débat ? On le croit d'autant plus volontiers que KOZLOWSKI lui-même a cherché à étayer ses arguments morphologiques et ontogéniques en considérant la similitude de composition de l'exosquelette dans les deux groupes. Pour lui comme pour beaucoup d'auteurs, Graptolithes et Ptérobanches sécrètent des tubes chitineux. Cependant, la nature chimique exacte des tubes de Ptérobanches n'était pas connue et, d'autre part, les analyses qui ont été réalisées sur les Graptolithes sont loin d'être convaincantes. Il était donc important d'effectuer l'analyse des tubes de Ptérobanches et de reprendre celle des restes fossiles de Graptolithes.

## 2. — MATÉRIEL.

L'entreprise était hasardeuse, car il n'était pas certain a priori que les fossiles de Graptolithes contenaient encore des substances organiques intactes.

Les difficultés de manipulation furent nombreuses, résultant entre autres de la petite taille des organismes, de la difficulté de les isoler en nombre suffisant, dans un état de propreté satisfaisant, et, de plus, en évitant les risques de contamination. Nous avons pu finalement disposer de trois échantillons de Graptolithes soigneusement isolés et nettoyés, et de deux échantillons de Ptérobanches d'espèces différentes.

Le premier échantillon de Graptolithes était composé de *Pristiograptus goilandicus* et *Pristiograptus dubius* extraits d'une concrétion calcaire de Bardo (Silurien). Le deuxième était constitué de Monograptidae (*gn. sp.*) et de Rétiolitidés extraits d'un galet erratique de calcaire marneux (Silurien) (1). Le troisième consistait en fragments de *Climacograptus typicalis* isolés d'un calcaire provenant de l'Ohio (Ordovicien).

En ce qui concerne les Ptérobanches, nos analyses ont porté essentiellement sur *Cephalodiscus inaequatus* et *Rhabdopleura sp.*

(1) C'est au Professeur Kozlowski (Varsovie) que nous devons ces échantillons; qu'il trouve ici l'expression de nos vifs remerciements.

## 3. — RECHERCHE DE

### a) Chitine.

Partant des affirmations des zoologistes, il ne semblait que les Graptolithes fût chitineux, la présence de chitine à la fois dans celui des Ptérobanches et dans celui des Graptolithes. La méthode enzymatique de la chitine mise au point par JEUNIAUX (1) et appliquée sur colonne ne révèle pas les hydrolysats acides. Il ne contiennent pas de chitine, nous pouvons affirmer que les fossiles que nous avons analysés contiennent plus.

### b) Cellulose.

Nous avons recherché la présence de cellulose par la méthode de FLORKIN (1959) et par dosage de la cellulase (NIXON, 1957) après hydrolyse. Tous les résultats ont été négatifs.

L'exosquelette des Ptérobanches que nous avons analysés ne contenait pas de cellulose.

### c) Protéines.

Nous avons ensuite recherché la présence de substances protéiques.

Dans le cas des Ptérobanches, nous avons recherché les aminés protéiques du coque par hydrolyse acide à partir de laquelle on élimine les acides aminés. Etant donné que 19 % du poids sec. Etant donné que la réaction du biuret est négative, nous pouvons conclure que les fossiles que nous avons analysés ne contiennent pas de protéines.

En ce qui concerne les

es zoologistes se sont ral-  
s, cette opinion n'est pas  
proposent au contraire,  
des parents proches de  
zozoaires.

r un argument dans ce  
tiers que KOZLOWSKI lui-  
morphologiques et onto-  
de composition de l'exo-  
lui comme pour beau-  
obranches sécrètent des  
chimique exacte des tubes  
et, d'autre part, les ana-  
ptolithes sont loin d'être  
d'effectuer l'analyse des  
e celle des restes fossiles

'était pas certain à priori  
aient encore des substan-

nt nombreuses, résultant  
rganismes, de la difficulté  
un état de propreté satis-  
sques de contamination.  
de trois échantillons de  
ttoyés, et de deux échan-  
érentes.

es était composé de *Pris-*  
*us dubius* extraits d'une  
Le deuxième était con-  
Rétiolitidés extraits d'un  
ilurien) (1). Le troisième  
*ptus typicalis* isolés d'un  
).

s, nos analyses ont porté  
*quatus* et *Rhabdopleura*

que nous devons ces échan-  
remerciements.

### 3. — RECHERCHE DE SUBSTANCES ORGANIQUES FOSSILES.

#### a) Chitine.

Partant des affirmations classiques, puisque pour la plupart des zoologistes, il ne semblait pas douteux que le test des Graptolithes fût chitineux, nous avons recherché tout d'abord la présence de chitine à la fois dans le test des Graptolithes et dans celui des Ptérobranches. Nous n'en avons pas décelé par la méthode enzymatique de recherche et de dosage de la chitine mise au point par JEUNIAUX (1963). De plus, la chromatographie sur colonne ne révèle pas la présence de glucosamine dans les hydrolysats acides. Il est donc certain que les Ptérobranches ne contiennent pas de chitine, et, pour ce qui est des Graptolithes, nous pouvons affirmer que les échantillons de Graptolithes fossiles que nous avons étudiés n'en contiennent pas ou n'en contiennent plus.

#### b) Cellulose.

Nous avons recherché la présence d'autres glucides et notamment de cellulose par la méthode à l'antrone (DUCHATEAU et FLORKIN, 1959) et par dosage du glucose par la notatine (HUGGET et NIXON, 1957) après hydrolyse enzymatique au moyen de cellulases. Tous les résultats ont été négatifs.

L'exosquelette des Ptérobranches et celui des Graptolithes que nous avons analysés ne contiennent donc pas de cellulose et ne renferment que de très petites quantités d'autres glucides.

#### c) Protéines.

Nous avons ensuite envisagé l'éventualité de l'existence de substances protéiques.

Dans le cas des Ptérobranches, nous avons analysé les acides aminés protéiques du coenecium de *Cephalodiscus*, libérés par hydrolyse acide à partir de fragments préalablement lavés pour en éliminer les acides aminés libres. Leur total s'élève à environ 19 % du poids sec. Etant donné que les fragments révélaient une réaction du biuret légèrement positive, il semble que nous pouvons conclure que le coenecium de *Cephalodiscus* est constitué pour une part importante de protéines. Ces protéines se caractérisent par un pourcentage extrêmement élevé de glyco-colle : la teneur de cet acide aminé atteint 35 mûles pour 100 mûles.

En ce qui concerne les Graptolithes, remarquons tout d'abord

que les trois échantillons étudiés ont été décalcifiés et lavés à plusieurs reprises, de sorte que toutes les substances solubles parmi lesquelles les acides aminés libres ont dû être éliminés. C'est donc un matériel insoluble soigneusement lavé que nous avons soumis à l'hydrolyse acide. Ensuite les acides aminés ont été dosés quantitativement et caractérisés par chromatographie sur colonne selon la méthode de MOORE et STEIN (1958). Les résultats de ces analyses ont fait l'objet d'une publication détaillée (FOUCART *et al.*, 1965). Tous les échantillons de Graptolithes que nous avons étudiés libèrent dans ces conditions de petites quantités d'acides aminés. Les pourcentages molaires des différents acides aminés libérés par trois échantillons d'origine différente et d'étage stratigraphique différent sont très voisins, ainsi que le montre le tableau I.

TABLEAU I. — Comparaison des teneurs en acides aminés de trois échantillons de Graptolithes (\*) (FOUCART *et al.*, 1965).

	1 <i>Pristiograptus</i> (Silurien)		2 <i>Monograptides</i> (Silurien)		3 <i>Climacograpt.</i> (Ordovicien)	
	µg/ g	fr.mol.	µg/ g	fr.mol.	µg/ g	fr.mol.
Acide aspartique	218	9	560	8.6	68	10
Thréonine	108	4.9	290	4.9	26	4.3
Sérine	214	11	550	10.6	122	22.8
Acide glutamique	380	13.9	1100	15.3	96	12.8
Proline	(83)	(3.9)	(340)	(6)	Tr.	
Glycocolle	280	20.1	760	20.8	89	23.4
Alanine	103	6.3	410	9.5	40	8.9
Valine	116	5.3	(240)	(4.1)	Tr.	
Isoleucine	97	4	230	3.6	(15)	(2.3)
Leucine	190	7.8	390	6.1	(13)	(2)
Tyrosine	(42)	(1.2)	(90)	(1.1)	—	
Phénylalanine	(87)	(2.9)	(110)	(1.3)	—	
Lysine	96	3.5	(310)	(4.4)	70	9.4
Histidine	60	2.2	(84)	(1.1)	29	3.7
Arginine	128	4	(140)	(2.2)	Tr.	

(\*) Les teneurs indiquées entre parenthèses n'ont pu être calculées qu'approximativement étant donné leur faible importance.

#### 4. — DISCUSSION.

a) Etant donné les divers traitements que nous avons appliqués au Graptolithes, décalcification et lavages répétés, on peut

certainement considérer que les substances libérées sont d'origine protéique.

b) Le problème qui se pose est de savoir si ces protéines sont d'origine organique. On pourrait envisager que ces protéines sont au niveau des fossiles rhyolites et de la matrice protéique du sédiment. Mais l'analyse des acides aminés libérés des fossiles de Graptolithes nous extrayons les résultats suivants :

1) certains acides aminés libérés par les Graptolithes ne se retrouvent pas dans la matrice au niveau du sédiment.

2) d'autre part, les acides aminés libérés au niveau du sédiment sont les mêmes que ceux libérés par les Graptolithes eux-mêmes.

c) Si les protéines libérées par les Graptolithes sont encore certains qu'elles sont d'origine organique, il pourrait en effet être envisagé que les Graptolithes eux-mêmes libèrent ces acides aminés. Remarquons que nous avons pu tester l'hypothèse d'une origine organique.

D'autre part, l'analyse chimique ne révèle pas de contaminants tels que les sels minéraux, etc.

Enfin et surtout, l'analyse chimique des trois échantillons d'origine différente ne révèle pas l'éventualité d'une origine organique.

d) Quelle est la nature des acides aminés libérés par les Graptolithes ?

Il doit s'agir de substances organiques. Il doit s'agir de substances organiques, les Graptolithes fossiles, les protéines libérées par leur haute résistance à l'hydrolyse acide, les trois acides aminés libérés par les Graptolithes sont caractéristiques essentiellement de l'origine organique.

Le test de trois échantillons d'origine différente a permis de mettre en évidence que les acides aminés libérés par les Graptolithes fossiles, les protéines libérées par leur haute résistance à l'hydrolyse acide, les trois acides aminés libérés par les Graptolithes sont caractéristiques essentiellement de l'origine organique.

ont été décalcifiés et lavés à l'eau distillée. Les substances solubles ont dû être éliminées. Le matériel a été soigneusement lavé que nous avons obtenu. Les acides aminés ont été analysés par chromatographie sur couche mince (FOUCART et STEIN (1958)). Les résultats sont publiés dans une publication détaillée sur les Graptolithes que nous avons publiés dans des conditions de petites quantités molaires des différents échantillons d'origine différente et très voisins, ainsi que

sur les acides aminés (FOUCART et al., 1965).

2 Graptolites (Jurien)		3 Climacograpt. (Ordovicien)	
g	fr.mol.	µg/ g	fr.mol.
8.6		68	10
4.9		26	4.3
10.6		122	22.8
15.3		96	12.8
(6)		Tr.	
20.8		89	23.4
9.5		40	8.9
(4.1)		Tr.	
3.6		(15)	(2.3)
6.1		(13)	(2)
(1.1)		—	
(1.3)		—	
(4.4)		70	9.4
(1.1)		29	3.7
(2.2)		Tr.	

ont pu être calculées qu'après lavage.

que nous avons appliqués, on peut

certainement considérer que les acides aminés mis en évidence sont d'origine protéique.

b) Le problème que l'on peut soulever immédiatement est de savoir si ces protéines proviennent des Graptolithes eux-mêmes. On pourrait envisager que les protéines mises en évidence au niveau des fossiles ne sont que partie intégrante du continuum protéique du sédiment, car, on le sait, les roches contiennent des acides aminés libres et aussi des protéines.

Mais l'analyse des résidus de décalcification de la roche dont nous extrayions les Graptolithes a montré (FOUCART et al., 1965) que :

1) certains acides aminés existant dans les fragments de Graptolithes ne se retrouvent pas dans la roche.

2) d'autre part, les concentrations sont beaucoup plus faibles au niveau du sédiment qu'au niveau des fossiles.

c) Si les protéines ne proviennent pas de la roche, il n'est pas encore certain qu'elles tirent leur origine des Graptolithes. On pourrait en effet émettre l'hypothèse d'une contamination des Graptolithes eux-mêmes, soit en cours d'expérience, soit antérieurement. Remarquons cependant que les conditions dans lesquelles nous avons réalisé l'extraction nous permettent de rejeter l'hypothèse d'une contamination en cours d'expérience.

D'autre part, l'observation des fragments au microscope électronique ne révèle pas de proportion sensible d'éventuels contaminants tels que bactéries, débris de coquilles ou d'algues, etc.

Enfin et surtout, le parallélisme des résultats obtenus pour trois échantillons d'origine et d'étage différents permet d'écartier l'éventualité d'une contamination par une protéine exogène.

d) Quelle est la nature des protéines décelées dans les fragments de Graptolithes ?

Il doit s'agir de scléroprotéines. Comme les scléroprotéines de nacres fossiles, les protéines des Graptolithes sont caractérisées par leur haute résistance et surtout par la proportion élevée des trois acides aminés, glyco-colle, sérine, alanine, ce qui est la caractéristique essentielle des scléroprotéines.

Le test de trois échantillons différents de Graptolithes a donc permis de mettre en évidence la présence de scléroprotéines typiques, mais n'a pas révélé la présence de chitine, ni de glucosamine. Cette absence de chitine dans les fossiles de Graptolithes peut-elle être considérée comme significative de l'absence de chitine dans l'organisme vivant ?

On connaît des exemples de conservation de la chitine au cours de la fossilisation. CARLISLE (1964) en a découvert dans un fossile datant du Cambrien, donc plus ancien encore que ceux que nous avons étudiés. D'autre part, nous avons décelé d'autres substances organiques dans les restes fossiles de Graptolithes. Or on admet généralement que parmi les substances organiques, la chitine est l'une des plus résistantes. Il nous paraît donc justifié de considérer que l'absence de chitine dans les fossiles témoigne du fait que la thèque des Graptolithes n'était pas une formation de nature chitineuse, contrairement à l'opinion généralement admise.

#### 5. — CONCLUSIONS.

L'absence de chitine dans les fossiles de Graptolithes au niveau desquels on peut mettre en évidence la persistance de scléroprotéines, constitue un argument biochimique qui s'oppose à un rapprochement des Graptolithes avec les Bryozoaires ou avec les Hydrozoaires et d'autres Cnidaires à test chitineux.

Par contre, les caractères biochimiques du test des Graptolithes ne s'opposent pas à un rapprochement avec les Ptérobranches, rapprochement qu'avait proposé KOZLOWSKI, en se basant sur des arguments morphologiques.

#### SUMMARY

*The analysis of three samples of Graptolithes extracted from calcareous stones from Silurian and Ordovician sediments shows the persistence of scleroproteins. The amino acids composition of these fossil proteins has been identified: the three samples so far studied exhibited a very similar amino acid pattern. Other analyses indicate the absence of chitin in the samples studied.*

*The chemical composition of Graptolite skeletal formations was compared with that of recent organisms and used as an argument in a discussion of the systematic affinities of Graptolithes.*

#### BIBLIOGRAPHIE.

- CARLISLE, D. B. (1964). — Chitin in a Cambrian Fossil *Hyolithellus*. *Biochem. J.*, **90**, 1c.
- DUCHATEAU, G. et FLORKIN, M. (1959). — Sur la tréhalosémie des Insectes et sa signification. *Arch. Intern. Physiol. Bioch.*, **67**, 306-314.

- FLORKIN, M., GREGG  
NIELS, E. (1961). —  
440-442.
- FOUCART, M. F., BR  
KIN, M. (1965). — F
- JEUNIAUX, Ch. (1963)  
*moléculaire*. Masson.
- KOZLOWSKI, R. (1948)  
d'animaux du Trem
- SPACKMAN, D. H., S  
recording apparatus  
*lytical Chemistry*, **30**
- NIXON, D. A. and HU  
blood glucose. *Bioch*

on de la chitine au  
a découvert dans un  
ien encore que ceux  
avons décelé d'autres  
iles de Graptolithes.  
abstances organiques,  
ous paraît donc jus-  
ne dans les fossiles  
ithes n'était pas une  
ent à l'opinion géné-

raptolithes au niveau  
sistance de scléropro-  
e qui s'oppose à un  
Bryozoaires ou avec  
st chitineux.

du test des Grapto-  
ment avec les Ptéro-  
é KOZŁOWSKI, en se

tes extracted from cal-  
diments shows the per-  
position of these fossil  
so far studied exhibited  
ses indicate the absence

al formations was com-  
s an argument in a dis-

Fossil *Hyolithellus*. Bio-

tréhalosémie des Insectes  
67, 306-314.

- FLORKIN, M., GREGOIRE, Ch., BRICTEUX-GREGOIRE, S. et SCHOFFE-  
NIELS, E. (1961). — Conchiolines de Nacres fossiles. *C. R. Acad. Sc.*, **252**,  
440-442.
- FOUCART, M. F., BRICTEUX-GREGOIRE, S., JEUNIAUX, Ch. and FLOR-  
KIN, M. (1965). — Fossil proteins of Graptolites. *Life Sciences*, **4**, 467-471.
- JEUNIAUX, Ch. (1963). — *Chitine et Chitinolyse, un chapitre de la biologie  
moléculaire*. Masson, Paris.
- KOZŁOWSKI, R. (1948). — Les Graptolithes et quelques nouveaux groupes  
d'animaux du Tremadoc de la Polone. *Palaeontologia Polonica*, **3**, 1-235.
- SPACKMAN, D. H., STEIN, W. H. and MOORE, S. (1958). — Automatic  
recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Ana-  
lytical Chemistry*, **30**, 1190-1206.
- NIXON, D. A. and HUGGET, A.St.G. (1957). — Enzymic determination of  
blood glucose. *Biochem. J.*, **66**, 12.