

COMPOSITION CHIMIQUE DE LA FRACTION "NACROÏNE" DE LA CONCHIOLINE DE NACRE DE *NAUTILUS POMPILIUS* LAMARCK

G. GOFFINET et Ch. JEUNIAUX

Institut L. Fredericq, Biochimie, Université de Liège, Belgium

(Received 5 August 1968)

Abstract—1. The study of the chemical composition of the conchiolin of mother-of-pearl of *Nautilus pompilius* Lamarck revealed that the insoluble residue in hot alkali, the nacroïn, is a mucoprotein (or glycoprotein).

2. The polysaccharidic fraction composing the prosthetic group of this mucoprotein is made, at least partially, of chitin. Chitin has been identified by means of purified chitinases.

3. In addition to this polyacetylglucosaminic fraction, an important amount of glucosamine has been identified in the nacroïn residue.

4. Prolonged treatment of the nacroïn in hot alkali leads to the progressive destruction of the peptidic chains, while the aminosaccharidic fraction remains unaltered.

5. It thus appears that chitin is the most stable component of the nacroïn, and consequently of the conchiolin of *Nautilus* mother-of-pearl.

INTRODUCTION

EN 1955, Grégoire *et al.* montraient pour la première fois la nature hétérogène de la substance organique (conchioline) de la nacre des coquilles de mollusques. Ces auteurs distinguaient trois constituants fondamentaux dans la conchioline de nacre: (1) la nacrine, fraction protéique soluble dans l'eau ou le tampon borate de Trim (1941); (2) la nacroscélérotine, fraction non soluble dans les solvants de la nacrine, mais détruite par la soude 0,5 N à chaud (5 h à 57°C puis à 100°C); (3) la nacroïne, matière résiduelle fibreuse résistant à l'action successive des tampons et de la soude: la nacroïne.

Plus récemment, Florkin (1966) modifiait cette terminologie en proposant d'abandonner le terme de nacroscélérotine: en effet ces protéines ne semblent pas liées par des ponts quinoniques. Les termes de "nacrine soluble" et de "nacrine insoluble" sont proposés pour désigner respectivement la nacrine et la nacroscélérotine.

L'analyse de la composition chimique en acides aminés de ces trois fractions effectuée par voie microbiologique par Grégoire *et al.* (1955), permit de mettre en évidence, dans la nacrine soluble et insoluble, la présence de quinze acides aminés naturels et l'absence de tyrosine. Par contre, dans la nacroïne, l'azote de l'alanine et du glycocolle constituait la plus grande partie de l'azote des acides aminés, ce qui permit à ces auteurs de postuler que la nacroïne était de nature peptidique et essentiellement constituée d'alanine et de glycocolle.

Toutefois, dans ce même travail, Grégoire *et al.* (1955) établissaient que, dans le cas de *Nautilus*, l'N des acides aminés représente environ 70 pour cent de l'N total de la nacroïne. Il existait par conséquent au niveau de la nacroïne une fraction azotée non identifiée. Or, l'un de nous (Jeuniaux, 1963) a mis en évidence la présence de chitine dans la coquille des nautilus.

Le présent travail confirme que la chitine est bien un constituant de la nacroïne de nacre des nautilus, et apporte quelques précisions au sujet de la composition chimique de la nacroïne.

MATERIEL ET METHODES

Les nacles étudiées proviennent des parois de la chambre d'habitation d'un mollusque céphalopode: *Nautilus pompilius* Lamarck. La nacre est soigneusement isolée de la couche de porcelaine par meulage et nettoyée de manière à enlever toute trace de la faune épibionte.

(a) Isolement de la nacroïne

Les fragments de nacre sont décalcifiés par HCl 0,5 N à température ordinaire. Le matériel décalcifié est abondamment lavé à l'eau bidistillée et traité par les solutions alcalines (NaOH 0,5 N) à 100°C pendant 10-13 h. Le matériel résiduel (la nacroïne), bien lavé, est ensuite traité par des solutions de chitinases purifiées en vue du dosage de la chitine ou est soumis à l'hydrolyse acide en vue du dosage des acides aminés et de la glucosamine, par chromatographie sur colonne.

(b) Caractérisation et dosage des acides aminés et de la glucosamine

Le dosage et la caractérisation des acides aminés et de la glucosamine ont été effectués suivant la méthode de Moore & Stein, à l'aide d'un appareil automatique de chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions. L'appareil est du type Beckman/Spinco Modell 120. La méthode ne permet pas le dosage de l'hydroxylysine et de l'hydroxyproline, ni du tryptophane qui est détruit au cours de l'hydrolyse acide. Les résultats obtenus pour la glucosamine ont été corrigés en tenant compte des pertes observées au cours de l'hydrolyse acide d'une quantité connue de chitine, d'acétylglucosamine et de glucosamine. Pour une hydrolyse par HCl 6 N à 110°C et à reflux pendant 24 h, la récupération est de 39 pour cent pour la chitine, de 43 pour cent pour l'acétylglucosamine libre et de 44 pour cent pour la glucosamine libre. En se basant sur ces valeurs, la quantité réelle de glucosamine a été calculée en multipliant les valeurs obtenues par 2,56.

(c) Dosage quantitatif et spécifique de la chitine par la méthode enzymatique

Le principe de la méthode enzymatique consiste à traiter l'échantillon par des solutions de chitinases purifiées (Jeuniaux, 1963, 1965) jusqu'à hydrolyse complète de la chitine. Les chitinases ont été isolées et purifiées selon la méthode de Jeuniaux (1957, 1959) à partir de cultures de *Streptomyces antibioticus* (Jeuniaux, 1958). La chitine est hydrolysée principalement en chitobiose ainsi que, dans une faible mesure, en chitotriose et en acétylglucosamine. Chitotriose et chitobiose sont ensuite, au cours d'une seconde étape, hydrolysés en acétylglucosamine au moyen d'une solution de chitobiasés (sérum de homard dilué dix fois). L'acétylglucosamine libérée est dosée par la méthode colorimétrique de Reissig *et al.* (1955).

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Mise en évidence de la chitine dans la nacroïne de nacre de *Nautilus pompilius* (méthode enzymatique)

Après extractions successives de la nacrine soluble par le tampon de Trim (1941) et de la nacrine insoluble par NaOH 0,5 N à 100°C pendant 13 h, le résidu

obtenu (la nacroïne) a été soigneusement analysé (Tableau 1) montrent que la composition de la nacroïne de nacre mu... la conception suivant laquelle... formée principalement d'alanine... être modifiée. La nacroïne... où la chitine constitue au m...

TABEAU 1—DOSAGE DE LA CHITINE

Poids	Poids
Poids	Poids
Résidu	Résidu
a	a
1	1
Ch	Ch
Ch	Ch

* Poids calculé à partir d'analyses chimiques.

2. Analyse d'un hydrolysât de chitine par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions

Un résidu de nacroïne... à chaud et à reflux, a été analysé...

(a) Le Tableau 2 montre la composition chimiques fondamentales: protéique.

La composition en acides aminés (1955) avaient identifiée chitine. L'alanine et le glycolle composés aminés dosés (en fraction m...)

(b) La présence de glucosamine en place importante occupée par la méthode enzymatique (Tableau 1). la terminologie adoptée par...

(c) Si l'on corrige les valeurs de la perte au cours de l'hydrolyse que la glucosamine mesurée... valeur qui représente 54,86%... dépasse sensiblement celle de la méthode enzymatique.

obtenu (la nacroïne) a été soumis à l'action des chitinases purifiées. Les résultats (Tableau 1) montrent que la chitine constitue 35 pour cent environ du poids sec de la nacroïne de nacre murale chez *Nautilus pompilius*. Dans cet ordre d'idée, la conception suivant laquelle la nacroïne est de nature exclusivement peptidique, formée principalement d'alanine et de glycofolle (Grégoire *et al.*, 1955), doit être modifiée. La nacroïne apparaît comme étant un complexe glycoprotéique où la chitine constitue au moins un tiers du poids de la nacroïne.

TABLEAU 1—DOSAGE DE LA CHITINE DANS LA NACROÏNE DE NACRE MURALE DE *Nautilus pompilius* PAR LA MÉTHODE ENZYMATIQUE

Poids sec de substance organique (mg)*	160,04
Résidu de nacroïne* après NaOH 0,5 N, 13 h à 10°C (mg)	15,46
Chitine (µg)	5427,3
Chitine (% de la nacroïne)	35,1

* Poids calculé à partir d'un échantillon identique ayant subi les mêmes traitements chimiques.

2. Analyse d'un hydrolysate de nacroïne de nacre de *Nautilus pompilius* par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions

Un résidu de nacroïne préalablement séché, pesé et hydrolysé par HCl 6 N à chaud et à reflux, a été analysé par chromatographie sur colonne (Tableau 2).

(a) Le Tableau 2 montre l'existence, au sein de la nacroïne, de deux fractions chimiques fondamentales: une fraction polyaminosaccharidique et une fraction protéique.

La composition en acides aminés est très voisine de celle que Grégoire *et al.* (1955) avaient identifiée chez *Nautilus macromphalus* par voie microbiologique. L'alanine et le glycofolle constituent une part importante de la somme des acides aminés dosés (en fraction molaire: 67,7 pour cent de la fraction aminée).

(b) La présence de glucosamine dans l'hydrolysate de nacroïne confirme la place importante occupée par la chitine, déterminée spécifiquement par la méthode enzymatique (Tableau 1). La nacroïne est donc bien une mucoprotéine, suivant la terminologie adoptée par Young (1963) dans sa classification des protéines.

(c) Si l'on corrige les valeurs obtenues pour la glucosamine en tenant compte de la perte au cours de l'hydrolyse (cf. Matériel et Méthodes) et en admettant que la glucosamine mesurée provient de l'acétylglucosamine, on obtient une valeur qui représente 54,86 pour cent du poids total de la nacroïne. Cette valeur dépasse sensiblement celle de la chitine seule (35,1 pour cent) mesurée par la méthode enzymatique.

TABLEAU 2—CARACTÉRISATION ET DOSAGE DES ACIDES AMINÉS ET DE LA GLUCOSAMINE LIBÉRÉS PAR L'HYDROLYSE ACIDE (HCl 6 N PENDANT 24 h à 110°C) DE LA NACROÏNE DE NACRE DE *Nautilus pompilius* LAMARCK

Acides aminés	Poids (résidus de glucosamine et d'acides aminés) (µg)	Fraction molaire	Azote (µg)	Azote (% de l'azote total)
Lysine	526,05	5,49	115,07	7,02
Histidine	—	—	—	—
Arginine	—	—	—	—
Acide aspartique	173,04	2,01	21,07	1,28
Thréonine	100,55	1,33	13,94	0,85
Sérine	411,44	6,32	66,21	4,04
Acide glutamique	647,05	6,70	70,22	4,28
Proline	+	+	+	+
Glycocolle	838,90	19,66	206,05	12,57
Alanine	2553,50	48,04	503,51	30,71
Valine	170,47	2,30	24,11	1,47
Méthionine	66,69	0,68	7,13	0,43
Isoleucine	115,89	1,37	14,36	0,88
Leucine	250,40	2,96	31,02	1,89
Tyrosine	—	—	—	—
Phénylalanine	343,37	3,12	32,70	1,99
Total de la fraction peptidique (fraction I)	6197,35 soit 40,51% du poids de la nacroïne	99,88	1105,39	67,41
Glucosamine	2396,54			
Glucosamine, valeur corrigée	6144,73		534,32	32,59
Acétylglucosamine calculée d'après la valeur corrigée de glucosamine (fraction II)	8393,70 soit 54,86% du poids de la nacroïne		534,32	32,59
Total (fractions I + II)	14.591,05		1639,71	100

Poids sac de nacroïne initial: 15,290 mg.

Nous avons vérifié que l'hydrolyse enzymatique de la chitine de la conchioline par les chitinases purifiées est complète, au cours de la méthode enzymatique. Nous constatons d'autre part que la somme de la fraction peptidique et de l'acétylglucosamine, calculée d'après les valeurs de la glucosamine, correspond approximativement (Tableau 2) au poids initial de nacroïne soumise à l'hydrolyse acide.

Par conséquent, nous sommes amenés à postuler que, en plus d'une fraction

"chitine" rigoureusement identifiée à 35 pour cent du poids, la fraction restante dont la nature exacte reste à déterminer du poids total de la nacroïne.

(d) En tenant compte de la fraction azotée des acides aminés libérés, ce qui correspond à la composition chez *Nautilus macromphala*, la chitine et des autres aminés, on trouve 32,59 pour cent de l'azote total.

Enfin, l'azote du glycoaminé total, la fraction peptidique essentiellement formée d'alanine (L. et al. (1955)).

3. Stabilité de la nacroïne

De manière à vérifier la nature polysaccharidique de la nacroïne, la conchioline de nacre de *Nautilus pompilius* a été traitée par NaOH de plus en plus prolongé.

TABLEAU 3—ÉTUDE DE LA STABILITÉ DE LA NACROÏNE À L'ÉGARD DU TRAITEMENT DE LA CONCHIOLINE

Traitement par NaOH à 100°C	de s'organiser
0,5 N; 6 h	
0,5 N; 13 h	
1 N; 60 h	

Les résultats (Tableau 3) montrent que la fraction peptidique obtenue diminue, par rapport à la durée du traitement par NaOH, la seule fraction peptidique, reste constante. On peut donc conclure que l'armature fondamentale de la nacroïne est constituée de chitine.

L'existence de chitine dans la nacroïne est confirmée. Cette substance

MINÉS ET DE LA GLUCOSAMINE
(10°C) DE LA NACROÏNE DE NACRE

Azote (μg)	Azote (% de l'azote total)
115,07	7,02
—	—
—	—
21,07	1,28
13,94	0,85
66,21	4,04
70,22	4,28
+	+
206,05	12,57
503,51	30,71
24,11	1,47
7,13	0,43
14,36	0,88
31,02	1,89
—	—
32,70	1,99
1105,39	67,41
534,32	32,59
534,32	32,59
1639,71	100

la chitine de la conchioline
de la méthode enzymatique.
on peptidique et de l'acétyl-
ine, correspond approxima-
mise à l'hydrolyse acide.
que, en plus d'une fraction

"chitine" rigoureusement identifiée par la méthode enzymatique, et qui représente 35 pour cent du poids, la nacroïne comprend une fraction aminosaccharidique dont la nature exacte reste à déterminer, et qui représente environ 25 pour cent du poids total de la nacroïne.

(d) En tenant compte de l'azote de chaque acide aminé et de la glucosamine, la fraction azotée des acides aminés représente 67,41 pour cent de la quantité d'azote total, ce qui correspond à la valeur (69 pour cent) établie par Grégoire *et al.* (1955) chez *Nautilus macromphalus*. L'azote de l'acétylglucosamine provenant de la chitine et des autres aminosaccharides non identifiés, représente donc à lui seul 32,59 pour cent de l'azote total.

Enfin, l'azote du glyco-colle et de l'alanine constituant 64,19 pour cent de l'N aminé total, la fraction protéique peut être considérée comme un polypeptide essentiellement formé d'alanine et de glyco-colle, comme l'avaient suggéré Grégoire *et al.* (1955).

3. Stabilité de la nacroïne

De manière à vérifier dans quelle mesure la fraction protéique et la fraction polysaccharidique de la nacroïne résistent à l'action des solutions alcalines à chaud, la conchioline de nacre de *Nautilus pompilius* a été soumise à des traitements par NaOH de plus en plus prolongés (6,13 et 60 h).

TABLEAU 3—ÉTUDE DE LA STABILITÉ DE LA NACROÏNE EN FONCTION DE LA DURÉE DU TRAITEMENT DE LA CONCHIOLINE DE NACRE DE *Nautilus pompilius*, PAR NaOH à 100°C

Traitement par NaOH à 100°C	Nacroïne		
	g/100g de substance organique totale	Fraction chitine (en % de sub- stance organique totale) (méthode enzymatique)	Fraction amino- acide (en % de substance organique totale) (chromatographie)
0,5 N; 6 h	17,84	3,35	± 9,68
0,5 N; 13 h	9,66	3,39	4,78
1 N; 60 h	3,71	3,71	Traces non dosables

Les résultats (Tableau 3) montrent que le pourcentage du poids de nacroïne obtenu diminue, par rapport au poids initial de conchioline, en fonction de la durée du traitement par NaOH. Cette diminution s'effectue aux dépens de la seule fraction peptidique, tandis que la fraction chitine demeure pratiquement constante. On peut donc considérer que la fraction aminosaccharidique représente l'armature fondamentale de la nacroïne de nacre.

RESUME ET CONCLUSIONS

L'existence de chitine dans la nacroïne de nacre de *Nautilus pompilius* Lamarck est confirmée. Cette substance constitue environ 35 pour cent du poids de nacroïne

obtenu en traitant de la conchioline par NaOH 0,5 à 100°C pendant 13 h.

En plus de la fraction acétylglucosaminique constituant la chitine, l'analyse d'un hydrolysate de nacroïne par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions a révélé l'existence d'une quantité importante de glucosamine qui ne provient pas de l'hydrolyse de la chitine.

Partant de ces résultats et de l'étude de la résistance offerte par la nacroïne aux traitements de plus en plus prolongés par la soude à chaud, on peut définir la conchioline de nacre en la considérant comme étant formée d'une matrice aminopolysaccharidique fondamentale, principalement de nature chitineuse, stable et résistante au traitement même prolongé par la soude à chaud et sur laquelle sont fixées des chaînes polypeptidiques. La nacroïne doit donc être considérée comme une mucoprotéine.

BIBLIOGRAPHIE

- FLORKIN M. (1966) *A Molecular Approach to Phylogeny*. Elsevier, Amsterdam.
- GRÉGOIRE CH., DUCHÂTEAU GH. & FLORKIN M. (1955) La trame protidique des nacres et des perles. *Ann. Inst. Océanogr.* **31**, 1-36.
- JEUNIAUX CH. (1957) Purification of a *Streptomyces* chitinase. *Biochem. J.* **66**, 29P.
- JEUNIAUX CH. (1958) Recherches sur les chitinases—I. Dosage néphélométrique et production de chitinase par des Streptomycètes. *Archs int. Physiol. Biochim.* **66**, 408-427.
- JEUNIAUX CH. (1959) Recherches sur les chitinases—II. Purification de la chitinase d'un Streptomycète, et séparation électrophorétique de principes chitinolytiques distincts. *Archs int. Physiol. Biochim.* **67**, 597-617.
- JEUNIAUX CH. (1963) *Chitine et Chitinolyse*. Masson, Paris.
- JEUNIAUX CH. (1965) Chitine et phylogénie: application d'une méthode enzymatique de dosage et de la chitine. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **47**, 2267-2278.
- REISSIG J. L., STROMINGER J. L. & LELOIR L. F. (1955) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylaminosugars. *J. biol. Chem.* **217**, 959-966.
- TRIM A. R. (1941) Studies on the chemistry of the insect cuticle—I. Some general Arthropod cuticles with special reference to the characterization of the proteins. *Biochem. J.* **35**, 1088-1098.
- YOUNG G. (1963) Occurrence, classification, preparation and analysis of proteins. In *Comprehensive Biochemistry* (Edited by FLORKIN M. & STOTZ E. H.), Vol. 7, pp. 1-55. Elsevier, Amsterdam.

Key Word Index—Cephalopoda; chitin; conchiolin; glycoprotein; mother-of-pearl; mollusc; mucoprotein; nacre; nacroïn; *Nautilus*; shell.