

QUELQUES DONNEES SUR LA COMPOSITION DU SIPHON DE *NAUTILUS POMPILIUS* L.

Marie-Françoise Voss-Foucart et Charles Grégoire

*Laboratoires de Morphologie, Systématique et Ecologie animales (Prof. Ch. Jeuniaux),
Université de Liège, 22, Quai Van Beneden, B-4020 Liège (Belgium)*

RESUME

Dans la coquille de *Nautilus*, le canal siphonal est constitué de deux tubes emboîtés, un tube externe, poreux, calcaire, composé de spicules aragonitiques et un tube interne, organique, formé de feuillets concentriques. On a admis la nature chitineuse de ces feuillets, toutefois sans contrôle biochimique.

Le microscope électronique a montré récemment que ces feuillets étaient constitués de feutrages fibrillaires denses, associés à une substance nodulaire ou amorphe. L'hydroxyde de soude N à 100°C détruit cette substance, sans altérer les fibrilles. Ces résultats suggéraient que les fibrilles étaient constituées en majeure partie de chitine.

A l'aide d'une méthode enzymatique spécifique, nous avons démontré de façon certaine la participation de la chitine à la constitution des deux tubes constituant le canal siphonal. Par chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions, nous avons déterminé la composition des protéines associées à la chitine au niveau de ces deux structures.

ABSTRACT

In the *Nautilus* shell the connecting rings of the siphonal tube are composed of two layers: an outer, porous, chalky tube, with aragonitic spicules and an inner horny tube, consisting of numerous concentric sheaths of organic matter.

TEM studies have demonstrated that these sheaths are composed of feltings of unorientated, powerful fibres embedded in an amorphous or nodular substance. Normal sodium hydroxide at 100°C destroys this latter substance but leaves apparently unaltered fibrils, which suggests a chitinous nature for these fibrils.

Specific enzymatic tests demonstrate that chitin is a constituent of the two layers composing the connecting ring.

Chromatographic analysis after acidic hydrolysis indicates that proteins are major components of these layers and provides their aminoacid composition.

Le siphon de la coquille du Nautilé est constitué de segments tubulaires (tubes siphonaux, "connecting rings"), qui s'étendent de l'apex à la chambre d'habitation et traversent les septa, où ils forment les goulots septaux ("septal funnels").

Les tubes siphonaux sont formés de deux couches, tubes emboîtés, décrits par de nombreux auteurs depuis Owen (1832):

—une couche externe calcaire poreuse ("chalky tube": Denton & Gilpin-Brown, 1966), composée de spicules aragonitiques, parallèles ou divergents, assemblés en faisceaux non orientés. La cohésion de ces structures est assurée par une substance organique. Les résidus de décalcification des tubes calcaires sont constitués de feutrages microfibrillaires (Grégoire, 1973). Dans la région interne de ces tubes calcaires les structures minérales sont traversées par des membranes organiques (Mutvei, 1972).

—une couche interne ("horny tube"), comprenant un grand nombre de feuillets organiques concentriques. Ces feuillets sont constitués d'entrelacs ou feutrages microfibrillaires denses (Grégoire, 1967, 1972, 1973; Mutvei, 1972) enrobés dans un matériel organique nodulaire ou amorphe. La soude à chaud fait disparaître ce dernier matériel et laisse subsister les fibrilles (Grégoire, 1973).

METHODES

Dans le présent travail, nous avons abordé l'étude chimique des tubes siphonaux à deux points de vue:

- Recherche de la présence de chitine au niveau des deux couches à l'aide d'une méthode enzymatique spécifique (Jeuniaux, 1963, 1965).
- Dosage et caractérisation des acides aminés d'origine protéique participant à la constitution de ces couches par chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions à l'aide d'un analyseur Beckman Spinco équipé d'une colonne unique, selon la méthode de Devenyi (1968).

Le dosage de la chitine dans la couche interne ("horny tube") a été réalisé après lavage à l'eau distillée et traitement rapide par une solution d'HCl ½ N afin d'éliminer les spicules aragonitiques de la couche externe qui auraient pu adhérer aux lamelles concentriques internes.

La décalcification des spicules de la couche externe ("chalky tube") a été réalisée également à l'aide d'une solution d'HCl ½ N. Le pourcentage de matériel organique de cette couche est de 3.58%.

Après décalcification, les deux couches ont été traitées par une solution de NaOH ½ N à 100° pendant 6 heures, afin de démasquer la chitine de ses complexes glycoprotéiques. Le materiel résiduel a été lavé à l'eau distillée puis incubé en présence de chitinase purifiée (Koch Light) à pH 5.2 (tampon acide citrique 0.1 M, Na₂HPO₄ 0.2 M) et à 37°, jusqu'à hydrolyse complète de la chitine. L'acétylglucosamine libérée après une nouvelle incubation en présence de chitobiase a été dosée par la méthode colorimétrique de Reissig, Strominger et Leloir (1955).

Les dosages de protéines ont été réalisés après hydrolyse acide de 24 heures à 110° par HCl 6 N, en tube scellé sous vide, sur le matériel préalablement décalcifié.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats des analyses des constituants protéiques et du dosage de la chitine dans les deux couches du tube siphonal sont consignés dans le Tableau 1.

TABEAU 1. Caractérisation et dosage des protéines et de la chitine dans le tube calcaire externe ("chalky tube") et dans la couche organique interne ("horny tube") du siphon de *Nautilus pompilius* L.

	Nacre résidus AA/100 résidus	Tube organique interne résidus AA/100 résidus	µg/g	Tube calcaire externe résidus AA/100 résidus	µg/g mat. décalcifié
1. Caractérisation et dosage des acides aminés protéiques					
Asp	7.8	10.30	34.59	14.86	46.31
Thr	1.4	4.91	14.91	5.87	16.07
Ser	9.5	9.60	24.79	9.13	21.53
Glu	4.5	11.81	45.24	13.16	45.98
Pro	0.7	10.61	30.58	6.86	18.04
Gly	32.0	12.57	21.27	10.78	16.65
Ala	24.7	7.68	16.21	7.31	14.07
Cys	tr	tr	tr	tr	tr
Val	1.5	5.13	15.09	5.37	14.41
Met	0.3	1.05	4.11	1.20	4.29
Ile	1.6	2.80	9.42	3.23	9.92
Leu	2.4	5.54	18.61	5.91	18.10
Tyr	1.3	2.59	12.57	2.58	11.41
Phé	6.1	4.78	20.86	3.71	14.79
Lys	0.3	2.31	8.80	3.29	11.41
His	0.4	1.48	6.06	1.27	4.72
Arg	4.7	6.86	31.80	5.41	22.87
	99.2	99.91	314.91	99.94	290.57
2. Chitine			212.27		57.51

Les structures minérales et organiques composant le goulot septal continuent celles qui forment les septa. Mais, comme l'a montré Mutvei (1972), au microscope à balayage (SEM), les structures septales subissent au niveau du goulot des modifications considérables. Ainsi, les éléments organiques de la couche interne du siphon ("horny tube") qu'il dénomme "couche interne de conchyoline" proviennent de la conchyoline de la partie adapicale de la nacre septale. Le microscope électronique par transmission (TEM, Grégoire, 1973) permet de voir la transformation graduelle des travées des membranes de conchyoline de nacre interlamellaire en fibrilles caractéristiques du tube interne du siphon ("horny tube").

Nos analyses montrent des différences de composition chimique entre conchyoline de nacre et matériel fibrillaire du "horny tube." Si l'on retrouve dans ce dernier les deux types de substances qui constituent la nacre septale, à savoir chitine et protéines (Jeuniaux, 1963; Goffinet, 1965), la chitine représente 21.22% du poids de la matière organique du "horny tube" alors qu'elle constitue 6% du poids de la conchyoline de la nacre septale (Jeuniaux, 1963). La teneur en protéine de la couche interne du tube siphonal (31.5% du poids de matière organique) est par contre beaucoup moins élevée que celle mise en évidence par Goffinet (1965) dans la conchyoline de la nacre septale. D'autre part, la composition en acides aminés des protéines associées à la chitine dans la couche interne du tube siphonal diffère de celle des protéines de la couche de nacre.

La confrontation entre les données chimiques et celles de la microscopie électronique, celles établies par le TEM essentiellement, plaide en faveur de l'hypothèse selon laquelle la conchyoline de nacre serait constituée d'un matériel glycoprotéique fibrillaire, formant des entrelacs non orientés, parfois des faisceaux, ou encore des arrangements plus ou moins parallèles, auquel seraient adjoints différents types de protéines qui confèreraient à l'ensemble sa structure en dentelles (Grégoire, Duchâteau et Florkin, 1955, Grégoire, 1967, 1972). Toutefois, ce modèle d'architecture n'a pu être ni confirmé ni infirmé à l'examen de coupes ultrafines (Goffinet, Grégoire et Voss-FoucART, 1977). Dans le matériel organique formant la couche interne du tube siphonal ("horny tube") les protéines formant avec la chitine le matériel fibrillaire enchevêtré seraient caractérisées par la présence de cinq acides aminés en proportions relativement équivalentes: l'acide aspartique, la sérine, l'acide glutamique, la proline et la glycine (de l'ordre de 10% du nombre de résidus d'acides aminés) et non par la prépondérance absolue de l'un ou l'autre acide aminé.

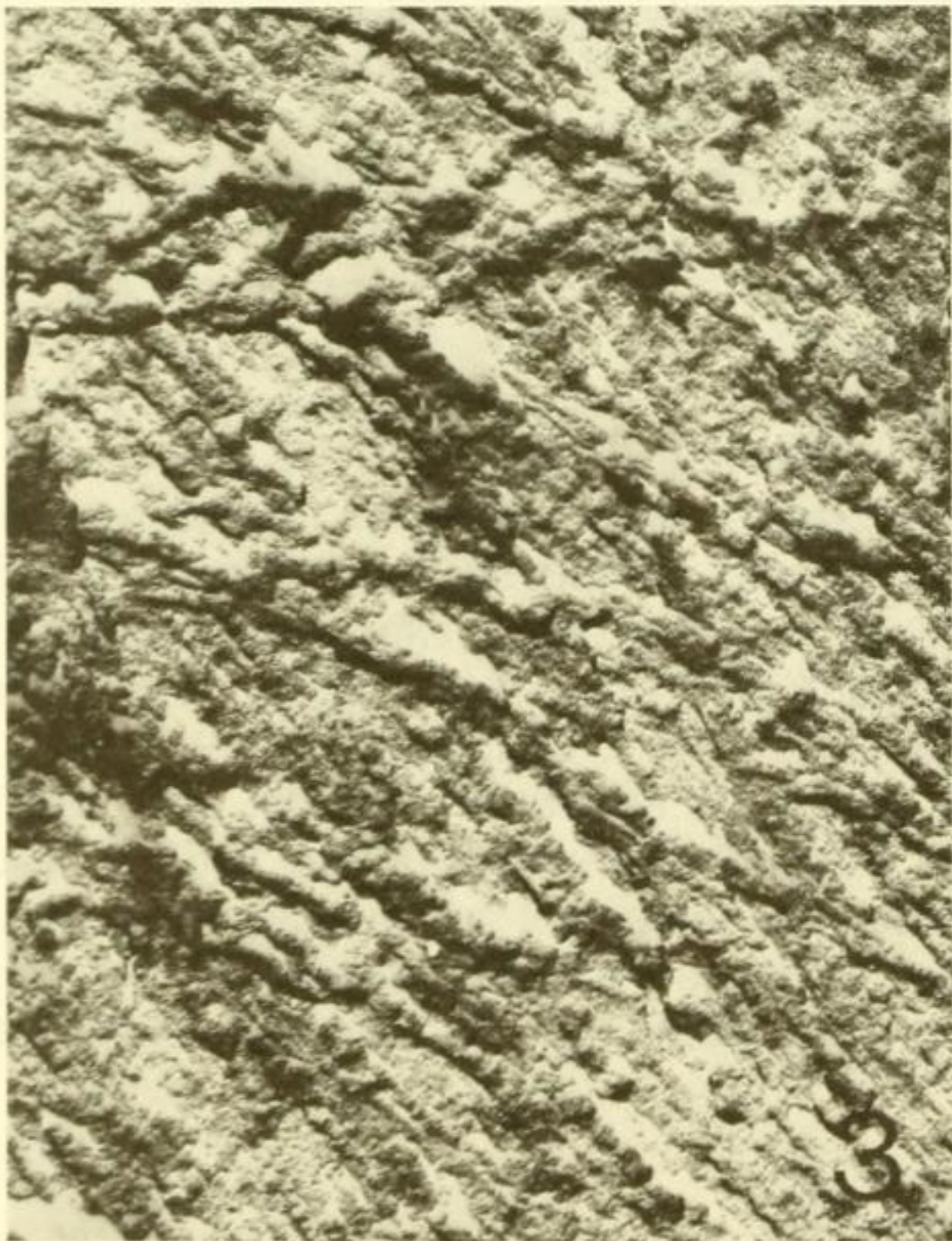
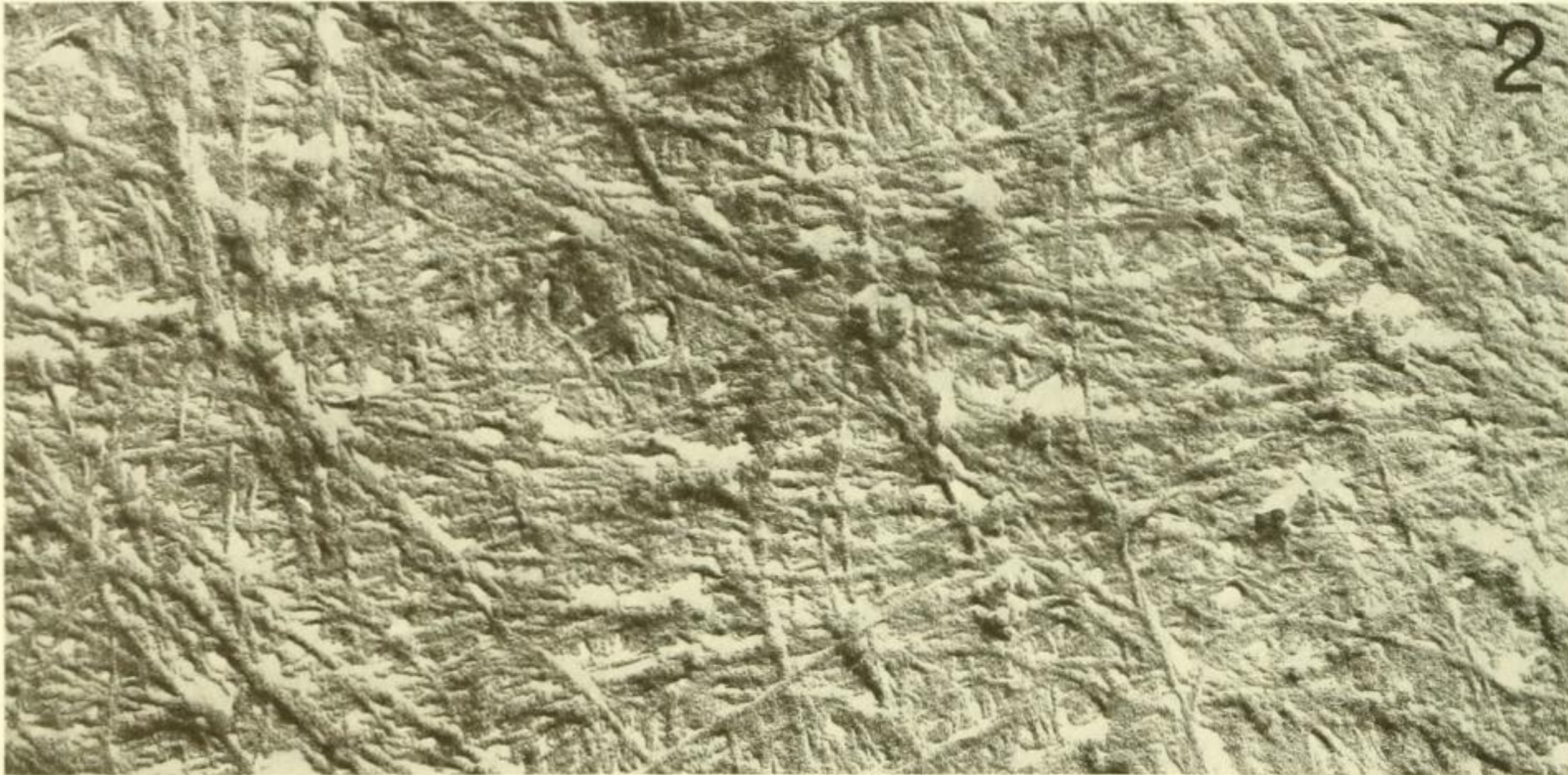
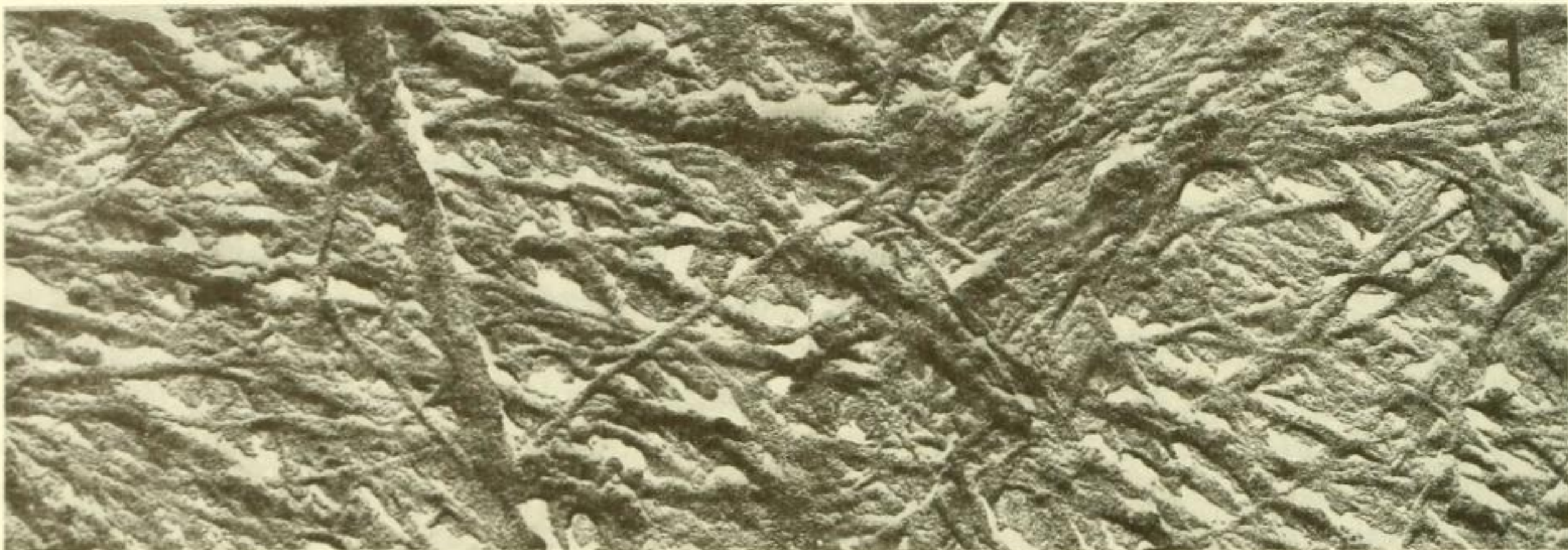
Il n'existe pas d'étude chimique des minces couches septales externes, d'ailleurs discontinues, qui permette d'établir une comparaison avec les constituants de la couche spiculaire ("chalky tube") qui en dériverait, d'après Mutvei (1972). Dans cette couche spiculaire, nous retrouvons les deux types de substances décelées au niveau de la couche interne, à savoir la chitine et les protéines. Le pourcentage de chitine (qu'il soit déterminé par méthode enzymatique ou par dosage de la glucosamine après hydrolyse acide) est cependant relativement bas (5,75% de la matière organique). Les protéines sont en concentration relativement voisine de celle de la couche interne (29,05% de la matière organique) mais présentent une composition légèrement différente, notamment par leur teneur plus élevée en acides aminés acides.

Comme nous l'avons déjà signalé, d'après Mutvei (1972, SEM), la partie interne de la couche spiculaire est traversée par des membranes de conchyoline. Les données du TEM (Grégoire, 1973 et Fig. 1, 2, 3, 4) indiquent que les voiles organiques auxquels sont amarrés les faisceaux spiculaires sont composés de fibrilles et de matériel nodulaire d'aspect semblable ou identique à celui de la substance organique de la couche interne non calcifiée. Cette ressemblance ou identité d'ultra-structure entre les composants organiques des "chalky" et "horny" tubes, paraît à première vue incompatible avec les données chimiques obtenues sur le même matériel.

On peut rappeler cependant que les analyses chimiques requièrent l'emploi de quantités de matériel beaucoup plus importantes que les études au microscope électronique (TEM). De ce fait, des substances de nature protéique ou non identifiée, éventuellement susceptibles de jouer un rôle dans la formation des spicules, et différentes des feutrages fibrillaires et du matériel nodulaire décelés au TEM, pourraient être absentes dans les échantillons du tube externe, prélevés pour la microscopie électronique.

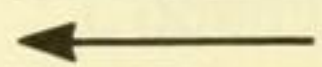
REMERCIEMENTS

Nous exprimons nos vifs remerciements au Prof. W. Bruce Saunders, aux Drs. P. Rancurel et Y. Magnier, qui nous ont fait don de matériel récemment capturé.



RÉFÉRENCES CITÉES

- DENTON, E. J. & GILPIN-BROWN, J. B., 1966, On the buoyancy of the Pearly Nautilus. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 46: 723–759.
- DEVENYI, T., 1968, Single Procedure for the Automatic Analysis of Amino Acids. *Acta Biochimica et Biophysica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 3: 429–432.
- GOFFINET, G., 1965, Conchioline, Nacroïne et Chitine dans la coquille des Mollusques. Thèse Univ. Liège, Belgique.
- GOFFINET, G., GREGOIRE, Ch. & VOSS-FOUCART, M. F., 1977, On ultrastructure of the trabeculae in the interlamellar membranes of nacre conchiolin of the Nautilus shells. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 85: 849–863.
- GREGOIRE, Ch., 1967, Sur la structure des matrices organiques des coquilles de Mollusques. *Biological Review*, 42: 653–688.
- GREGOIRE, Ch., 1972, Structure of Molluscan Shells. In *Chemical Zoology* (FLORKIN, M. & SCHEER, B. T. eds.), 7: 45–102. Academic Press, New York.
- GREGOIRE, Ch., 1973, On the submicroscopic structure of the organic components of the siphon in the Nautilus shell. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 81, 2: 299–316.
- GREGOIRE, Ch., DUCHATEAU, G. & FLORKIN, M., 1955, La trame protidique des nacres et des perles. *Annales de l'Institut Océanographique, Monaco*, 31: 1–36.
- JEUNIAUX, Ch., 1963, Chitine et chitinolyse. Un chapitre de la biologie moléculaire. Paris, Masson et Cie, éd., 181 pp.
- JEUNIAUX, Ch., 1965, Chitine et Phylogénie: application d'une méthode enzymatique de dosage de la chitine. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, 47: 2267–2278.
- MUTVEI, H., 1972, Ultrastructural studies on Cephalopod Shells. Part I: The Septa and Siphonal Tube in Nautilus. *Bulletin of the Geological Institution of the University of Uppsala, N.S.*, 3, 8: 237–261.
- OWEN, R., 1832, Memoir on the Pearly Nautilus, London.
- REISSIG, J. L., STROMINGER, J. L. & LELOIR, L. F., 1955, A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino-sugars. *Journal of Biological Chemistry*, 217: 959–966.
- VOSS-FOUCART, M. F., 1970, Constituants organiques de la coquille des Céphalopodes et Phénomènes de Paléisation. Thèse Université de Liège, Belgique.



FIGS. 1 & 2. *Nautilus pompilius* Linne (Immature) (1230–4). Tube siphonal (segment intracaméral: connecting ring). Couche calcaire externe spiculaire (chalky tube), déalcifiée (EDTA). Résidus organiques dissociés par les ultrasons. Feutrages de fibres et de fibrilles et substance organique nodulaire. La dissociation des fibres en fibrilles est plus importante dans la Fig. 2. x48.000. Ombrage au platine.

FIGS. 3 & 4. *Nautilus macromphalus* Sowerby (adulte) (1224–6). Tube siphonal (segment intracaméral: connecting ring). Couche brune organique, interne (horny tube), traitée par les ultrasons. Feutrages de fibres et de fibrilles associées à une substance nodulaire. x48.000. Ombrage au platine.