

PRINCIPES DE SYSTÉMATIQUE BIOCHIMIQUE ET APPLICATION A QUELQUES PROBLÈMES PARTICULIERS CONCERNANT LES ASCHELMINTHES, LES POLYCHÈTES ET LES TARDIGRADES.

par

Charles Jeuniaux

Université de Liège, Institut Ed. Van Beneden, Laboratoire de Morphologie, Systématique et Ecologie animales.

Résumé

Nous avons défini les conditions requises pour que les caractères de la composition chimique puissent être utilisés comme caractères systématiques à implication phylogénétique.

En ce qui concerne les animaux de la méiofaune, la biochimie peut contribuer à résoudre les problèmes posés par la systématique des groupes auxquels ils appartiennent, souvent encore considérés comme des « incertae sedis ». Mais la taille réduite de ces organismes et leur récolte difficile en grande quantité proscrit l'application de la plupart des méthodes classiques d'analyse chimique. La mission des biochimistes intéressés par la systématique est donc de rechercher des micro-méthodes hautement spécifiques, susceptibles d'être appliquées à des quantités minimales de matériel et capables de révéler l'existence de composés chimiques biosynthétisés par des sémantides suffisamment bien définies pour permettre la discussion de leurs propriétés d'homologie. Un exemple est donné dans le cas de la chitine et des transférases qui en contrôlent la synthèse.

En dernière analyse, c'est cependant au niveau des protéines que l'on peut espérer trouver les meilleurs critères d'homologie et les meilleurs indices de parenté phylétique. Faute de pouvoir isoler et purifier les protéines des animaux de la méiofaune et d'en établir la séquence aminoacide, pour les raisons techniques évoquées plus haut, le systématicien biochimiste peut tirer des informations précieuses des patrons de composition globale en acides aminés de la fraction protéique de certaines structures bien individualisées ou de l'étude immunoélectrophorétique des protéines solubles.

En tout état de cause, cependant, il faut se garder de substituer une chimiotaxonomie exclusive à la systématique classique. Les arguments nouveaux tirés de l'analyse chimique doivent être considérés en même temps et au même titre que les autres caractères tirés de la morphologie ou de l'embryologie.

Introduction

Les progrès de la Biochimie comparée et de la Biologie moléculaire ouvrent des perspectives nouvelles en Zoologie systématique et phylogénétique, en mettant à notre disposition un nombre considérable de caractères taxonomiques nouveaux.

L'intérêt de ces caractères biochimiques en systématique varie considérablement d'un groupe zoologique à l'autre. Dans le cas des Vertébrés supérieurs ou des Insectes, par exemple, ces caractères permettent le plus

souvent de confirmer les coupes taxonomiques et les relations phylétiques proposées par les morphologistes. Mais, lorsqu'il s'agit de groupes moins bien connus, d'approche difficile en raison de leur petite taille, dont l'embryologie est imparfaitement comprise ou dont les structures morphologiques sont d'interprétation difficile, la Biochimie systématique peut contribuer à résoudre des problèmes jusqu'ici insolubles. C'est le cas de la plupart des groupes zoologiques auxquels appartiennent les animaux de la méiofaune.

L'usage des caractères de la composition chimique en systématique nécessite toutefois une prudence et une circonspection particulières. Comme l'a souligné Throckmorton (1968), il faut bien faire la différence entre la Biochimie comparée d'une part, y compris ses implications physiologiques et écophysiologiques et, d'autre part, la Biochimie taxonomique qui ne peut être établie que sur la base d'entités moléculaires réellement comparables, c'est-à-dire homologues. Au stade actuel, on peut déjà définir un certain nombre de critères permettant de choisir, parmi l'éventail des données que fournit l'analyse chimique des organismes, celles qui peuvent se prêter à la discussion de parents phylétiques. Nous nous proposons, après avoir défini ces principaux critères, de donner quelques exemples de l'application de certains caractères biochimiques à la discussion de la position systématique de quelques groupes de la méiofaune.

Propriétés et choix des caractères biochimiques systématiques

Les caractères taxonomiques, quelle que soit leur nature, sont, du point de vue biologique, le résultat de l'action d'un ou plusieurs gènes, c'est-à-dire d'acides désoxyribonucléiques. Ceux-ci exercent leur action par l'intermédiaire d'acides ribonucléiques spécifiques, lesquels président à l'édition de protéines spécifiques, notamment des enzymes. Un caractère biochimique peut être une molécule organique résultant de l'activité d'un seul gène ou une molécule organique résultant de l'activité d'une séquence d'enzymes distincts, donc de l'activité de plusieurs gènes.

L'inventaire et l'analyse des caractères taxonomiques, aussi bien de nature biochimique que morphologique ou éthologique, pourraient donc idéalement porter directement au niveau des gènes, c'est-à-dire au niveau des séquences de bases au sein de chaque DNA responsable d'un caractère. Toutefois, nous verrons plus loin que cette approche, sans être utopique, est actuellement peu réalisable. L'analyse des caractères biochimiques porte donc essentiellement, jusqu'ici, sur les résultats de l'activité des gènes.

Parmi ces substances, nous pouvons distinguer, avec Zuckerkandl et Pauling (1962), les *molécules sémantiques* (ou sémantides), qui sont des protéines ou des peptides directement contrôlées par un DNA spécifique, et les *molécules épisémantiques* (ou épisémantides), synthétisées par un ou plusieurs enzymes, c'est-à-dire par une ou plusieurs molécules sémantiques.

Afin d'éviter d'accorder une valeur taxonomique à des caractères convergents, il importe de ne comparer que des objets homologues. Comme en morphologie comparée, le concept d'homologie est purement génétique. Deux molécules sont donc homologues lorsque leur synthèse est contrôlée par des gènes homologues. Le critère de l'homologie en Biochimie comparée est le degré *d'isologie*, c'est-à-dire le degré d'identité de composition chimique (Florkin, 1962, 1966) mais ce critère ne peut être appliqué qu'aux molécules sémantiques dont

la séquence des acides aminés correspond fidèlement à celle des bases au sein du DNA spécifique correspondant.

On écartera donc, en tant que caractères biochimiques à implication taxonomique ou phylogénétique, les petites molécules organiques dont la synthèse peut résulter de la mise en jeu de systèmes enzymatiques anaboliques ou cataboliques fondamentalement différents. C'est le cas, par exemple, de l'urée dont la présence chez un organisme peut provenir du cycle de l'ornithine ou, au contraire, de la purinolyse.

Il convient également d'écarter toute considération basée sur l'observation de fonctions similaires car on sait que deux molécules non isologues, donc non homologues, peuvent présenter le même type d'activité enzymatique. Ces molécules seront considérées comme *analogues*.

En ce qui concerne les molécules sémantiques, l'homologie repose donc sur l'isologie, ce qui suppose la détermination de la séquence des acides aminés au sein de la molécule protéique. Par extension, on admet que des épisémantides sont homologues lorsqu'elles sont isologues et qu'elles sont biosynthétisées par des enzymes homologues.

Envisageons à présent les possibilités d'application pratique de ces considérations théoriques à des problèmes de systématique phylogénétique concernant des organismes dont la petite taille et la rareté relative sont des handicaps sérieux à l'analyse chimique par les méthodes classiques.

Analyse directe du génome

Il n'est pas possible d'isoler les gènes de même nature de deux espèces différentes et d'en comparer la séquence des bases. Mais on dispose depuis peu d'une méthode permettant de déterminer la proportion de gènes similaires entre deux espèces (McCarthy et Bolton, 1963).

Le DNA, support biochimique de l'hérédité, est une double chaîne hélicoïdale, capable de se décomposer en deux demi-chaînes, chacune pouvant reconstituer une chaîne entière. Ces deux demi-chaînes peuvent également se rapprocher pour reformer la chaîne initiale. Une seule demi-chaîne peut également reformer la chaîne initiale à partir de fragments de l'autre demi-chaîne ou de fragments d'une demi-chaîne différente, à condition que celle-ci soit complémentaire de la première. Dans ce dernier cas, les DNA dont proviennent ces deux demi-chaînes sont évidemment homologues.

On peut donc, théoriquement, accoupler des demi-chaînes de DNA provenant d'espèces différentes, dans la mesure où ces espèces possèdent des gènes homologues. On dispose donc d'un moyen permettant de déterminer expérimentalement la proportion de gènes homologues entre deux espèces. En pratique, on incube des fragments de DNA total radioactif d'une espèce avec des demi-chaînes de DNA non radioactif d'une autre espèce. Après élution, on mesure la radioacti-

vité fixée au DNA « froid » et la radioactivité non fixée ce qui, moyennant un étalonnage préalable, donne une estimation de la proportion de fragments de DNA homologues.

Malheureusement, cette méthode ne permet pas de comparer des gènes mais des fragments de DNA qui peuvent correspondre à des gènes et, plus souvent, à des fragments de gènes. Elle permet donc, au mieux, d'estimer le pourcentage de séquences polynucléotidiques isologues dans les génomes de deux espèces différentes. L'application de cette méthode à des problèmes pratiques de taxinomie zoologique n'a, jusqu'ici, donné de résultats qu'avec des espèces très voisines (exemple : détermination des relations phylétiques par hybridation des DNA de trois espèces du genre *Simulium* Teshima, 1972). Elle est, de plus, impossible à appliquer à des espèces de petite taille et d'élevage difficile.

Les protéines comme caractères biochimiques systématiques

En tant que sémantides, les protéines et les peptides constituent les meilleurs caractères biochimiques susceptibles d'être utilisés en systématique synthétique et en phylogénie. Depuis quelques années, on dispose de méthodes rigoureuses pour l'isolement, à l'état pur, des peptides et des protéines et pour la détermination des séquences d'acides aminés, à condition de disposer de quantités suffisamment élevées de matériel biologique et à condition que les substances étudiées puissent être mises en solution.

La littérature scientifique récente est de plus en plus riche en données précises sur les séquences comparées de protides ou de protéines appartenant à diverses espèces animales d'une même classe ou d'un même phylum. On peut ainsi reconnaître que certaines portions de la chaîne d'acides aminés sont permanentes à travers la série zoologique étudiée tandis que d'autres portions sont l'objet de modifications plus ou moins importantes (remplacement d'un acide aminé par un autre, par exemple). L'importance relative de ces modifications est un bon indice de la parenté relative des espèces étudiées, ce qui permet d'établir des classifications phylogéniques souvent en très bon accord avec celles établies par les systématiciens classiques. Parmi les exemples dont on dispose, citons les caractères biochimiques suivants : la structure des hormones neurohypophysaires (ocytocine, vasopressine, vasotocine) chez les Vertébrés (Acher, 1971) ; la structure des fibrinopeptides des Mammifères (Blombäck, 1971) et celle des peptides inhibiteurs de la trypsine au niveau du trypsinogène, chez les Mammifères artiodactyles (Bricteux-Grégoire, Schyns et Florkin, 1971).

Lorsqu'il s'agit de protéines insolubles ou lorsque le matériel biologique disponible n'est pas suffisamment abondant, ce qui risque d'être longtemps le cas pour les animaux de la méiofaune, des informations intéressantes peuvent être tirées de la composition globale en acides aminés, à condition de s'adresser à des structures morphologiques bien définies et susceptibles d'être parfaitement isolées. L'analyse globale des acides aminés d'un hydrolysat par chromatogra-

phie sur colonne échangeuse d'ions nécessite relativement peu de matériel.

Pour comparer des structures morphologiques homologues, la composition globale en acides aminés protéiques de ces structures constitue un élément quantitatif qui permet de mieux mesurer l'ampleur des différences relatives entre les groupes concernés. Nous donnons un exemple de l'application de cette méthode à propos des mâchoires des Annélides Polychètes.

Les protéines des liquides internes (sang, hémolymphé, liquide coelomique) offrent évidemment le même intérêt. L'usage de méthodes sérologiques permet d'obtenir des résultats quantitatifs bien plus rapides que les méthodes précitées. En effet, la réaction antigène-anticorps dépend de la structure tertiaire des protéines qui est elle-même directement tributaire de la structure primaire et est hautement spécifique. Boyden (1943) a été un des premiers à utiliser cette méthode à des fins taxonomiques. Cependant, l'immuno-chimie a montré que le nombre de protéines différentes d'un sérum est souvent élevé, qu'un antigène donné peut conduire à la production d'anticorps variés, que chaque protéine antigénique peut présenter des variations importantes de concentration entre espèces proches et au sein d'une même espèce (Boyden, 1966). L'aspect quantitatif de la sérologie comparée, appliquée à des mélanges de protéines (sérum complet), risque donc d'être fallacieux.

Une méthode récente combine les avantages de la méthode de séparation et d'isolement des « espèces protéiques » par électrophorèse et ceux de la sérologie : c'est la méthode immuno-électrophorétique. Cette méthode est d'un usage de plus en plus fréquent. Remarquons toutefois que ce type de caractère biochimique doit être manipulé, comme les caractères morphologiques, en tenant compte des possibilités de variations intraspécifiques. Citons par exemple les particularités du sang des Insectes et des Crustacés adultes qui peut contenir, à l'époque de la reproduction, des quantités considérables d'une protéine spécifique au sexe femelle, impliquée dans la vitello-génèse (pour revue, voir Jeuniaux, 1971).

Les molécules épisémantiques en tant que caractères biochimiques systématiques

Les molécules organiques dont la synthèse est assurée par des enzymes homologues ou par une même séquence d'enzymes homologues, peuvent également être utilisées comme caractères biochimiques taxonomiques.

C'est le cas des acides biliaires, tous dérivés du noyau stérane et synthétisés par une même séquence d'enzymes (apparemment homologues) qui conduit de l'acétate à l'acéto-acétate, puis à un composé en C₃, polymérisé ensuite en squalène. Ce dernier enzyme, qui transforme le squalène en acide biliaire, est plus spécifique et catalyse la formation d'acides biliaires de types particuliers suivant les groupes zoologiques considérés. Grâce aux travaux d'Haslewood (1971), on peut presque caractériser chaque classe de Vertébrés par

un type de composition de la bile en acides biliaires et certaines familles, par une variété particulière d'acide biliaire.

C'est le cas également des macromolécules polysaccharidiques dont la synthèse dépend d'une seule sémantide, une transférase (ou synthétase) spécifique. Considérons plus particulièrement le cas de la chitine dont nous ferons un large usage ci-dessous pour discuter la position phylétique de quelques classes d'Aschelminthes et des Tardigrades.

La chitine est un polysaccharide (ou, plus exactement, une homoglycane) dont la composition semble à peu près constante, tant dans le règne animal que chez les Champignons. En dépit des variantes cristallographiques α , β ou γ , découvertes et brillamment interprétées par Rudall (1963), différentes chitines étudiées jusqu'ici sont de longues chaînes linéaires d'unités de N-acétyl-D-glucosamine liées par des ponts p-(1-4) glycosidiques, un résidu sur 6 ou 7 pouvant être remplacé par un résidu de glucosamine (Giles *et al.*, 1958 ; Rudall, 1963). Les chitines de différentes sources sont hydrolysées en chitobiose et en chitotriose par les mêmes préparations de chitinases purifiées. On voit donc qu'il s'agit bien de substances isologues. Il a été clairement démontré, par ailleurs, que le mécanisme de la biosynthèse de la chitine est identique dans tous les cas étudiés jusqu'ici (Champignons, Insectes, Crustacés). Ce mécanisme implique le transfert d'unités de N-acétyl-D-glucosamine à partir de l'uridine-diphosphate-N-acétylglucosamine (UDPAG) sur l'extrémité d'une chaîne de chitodextrine. Cette réaction est catalysée par un enzyme, la chitine-UDP acétylglucosaminyl-transférase (Glaser et Brown, 1957; Jaworski *et al.*, 1963 ; Carey, 1965). Bien que cet enzyme n'ait pas été purifié et que sa séquence amino-acide n'ait pas été établie, les propriétés, la spécificité et la cinétique des chitine-UDP acétylglucosaminyltransférases étudiées jusqu'ici sont très voisines, ce qui permet de considérer, à titre d'hypothèse de travail la plus plausible, que ces transférases spécifiques de la synthèse de la chitine sont des sémantides homologues. Dans ce cas, la présence d'une structure de nature authentiquement chitineuse chez une espèce donnée prend la signification d'un caractère biochimique systématique, dans la mesure où la démonstration non équivoque de la présence de ce polysaccharide révèle l'existence du gène de la chitine-N-acétylglucosaminyltransférase.

Du point de vue technique, les méthodes histologiques pour la mise en évidence non équivoque de la chitine sont trop peu spécifiques ou trop peu sensibles pour être appliquées avec sécurité à des organismes de petite taille. Une méthode enzymatique adéquate a été mise au point (Jeuniaux, 1963, 1965), qui utilise les propriétés hautement spécifiques de préparations de chitinases purifiées d'origine microbienne (Jeuniaux, 1958, 1959). Après décalcification éventuelle et « démasquage » de la chitine des complexes chitino-protéiques par la soude 0.5 N à chaud, la chitine de la structure étudiée est hydrolysée par une solution de chitinases concentrées et purifiées ; sa mise en évidence repose sur l'observation de la lyse de la structure et sur le dosage des produits d'hydrolyse libérés. Cette méthode a permis de découvrir la nature chitineuse de structures anhistes appartenant à des organismes de très petite taille, notamment les kystes de plusieurs espèces de Protozoaires Ciliés (Bussers et Jeuniaux, 1970, 1974).

Les composants inorganiques en tant que caractères systématiques

Considérons enfin l'intérêt relatif de la composition inorganique de certaines structures ou de certains liquides internes. Il s'agit, dans ce cas, d'ions inorganiques absorbés à partir du milieu extérieur (milieu ambiant ou nourriture), notamment grâce à des mécanismes enzymatiques de transport spécifiques qui sont mis en place au niveau de certaines structures squelettiques ou dont la concentration au niveau du milieu intérieur est régularisée par des processus d'homéostasie, impliquant à la fois le contrôle de leur absorption et celui de leur excrétion.

Bien que les mécanismes enzymatiques assurant ces régulations soient souvent encore mal élucidés, la comparaison des compositions inorganiques au niveau de courts rameaux de l'arbre phylétique peut fournir de bons caractères chimiques taxonomiques.

On connaît la détermination des grandes classes de Spongiaires sur la base de la nature siliceuse ou calcaire des spicules et l'opposition entre Chilopodes et Diplopodes au point de vue de la présence ou de l'absence de sels calcaires dans la cuticule. On verra, ci-dessous, l'usage de ce caractère pour confirmer le fossé séparant deux groupes de familles de Polychètes.

La composition cationique de l'hémolymphe des Insectes a permis de mettre en évidence de nouveaux caractères taxonomiques, valables au moins au niveau de courts rameaux de la phylogénie (Jeuniaux, 1971). Mais la composition très uniforme des liquides internes des invertébrés aquatiques, autres que les Insectes, ne se prête pas à la mise en évidence de caractères taxonomiques.

Usage des caractères biochimiques dans la discussion de parentés phylétiques

C'est à Florkin (1966) que revient le mérite d'avoir insisté pour que la Biochimie comparée tente de reconstituer l'évolution des molécules et des systèmes biosynthétiques sur la base des données de la phylogénie animale, plutôt que le contraire, faisant ainsi le procès d'une chimiotaxonomie abusive.

On admettra cependant volontiers que, si la morphologie des espèces est, comme leur composition chimique, le résultat de l'activité de leurs gènes, deux structures morphologiques homologues doivent posséder, en principe, des compositions chimiques voisines, au moins dans un court segment de l'arbre phylétique. Les exemples sont légion, notamment en ce qui concerne la trame organique des structures squelettiques et cuticulaires.

Mais on remarquera que l'inverse de cette proposition n'est pas correct : deux structures ayant la même composition chimique ne sont pas forcément homologues et les espèces qui les possèdent ne sont pas forcément voisines. On connaît, en effet, de nombreux cas de radiation morphologique d'un même système biochimique à travers la série animale.

L'usage le moins contestable des caractères biochimiques en systématique me paraît donc pouvoir être défini de la manière suivante : la non-identité de composition chimique de deux structures morphologiques appartenant à deux espèces différentes indique l'absence d'homologie entre ces structures ou l'absence de parenté phylétique entre ces espèces.

Le cas du phylum des Aschelminthes va nous permettre de donner un exemple de l'usage de certains caractères de la composition chimique des cuticules pour confirmer ou infirmer certains rapprochements phylétiques au sein de ce phylum.

Composition chimique **des** cuticules
et **des** enveloppes embryonnaires **des** Rotifères, Gastrotriches,
Nématodes et Échinodères

On sait que ces quatre classes ont été réunies, notamment par Hyman (1951) dans le phylum des Aschelminthes, notamment sur la base de la nature pseudocœlomique de la cavité générale du corps, la tendance à la constance cellulaire et la présence fréquente de tubes adhésifs. Par contre, de profondes différences d'organisation, au niveau des néphridies et du système nerveux en particulier, laissent planer de sérieux doutes sur l'homogénéité d'un tel phylum.

Les données d'ordre biochimique sont peu nombreuses pour ces organismes, sauf en ce qui concerne les Nématodes. On possède, depuis peu, des informations précises sur la distribution de la chitine au niveau des formations cuticulaires de ces animaux.

a) Enveloppes embryonnaires

Chez les Rotifères Monogonontes (*Brachionus leydigii* Cohn, *B. calyciflorus* Pallas, *Euchlanis dilatata* Ehrenberg, *Lepadella emarginata* Ehrenberg, *Keratella cochlearis* Gosse, *K. quadrata* Müller, *Mytilina brevispina* Ehrenberg) comme chez les Diganontes (*Philodina roseola* Ehrenberg et *Macrotrachela* sp.), la coque unique entourant les œufs immédiats (parthénogénétiques) est de nature chitineuse (Depoortere et Magis, 1967 ; Piavaux et Magis, 1970). Chez *Brachionus leydigii*, la chitine constitue 14,6 p. 100 du poids sec de l'œuf embryonné entier. Cette enveloppe chitineuse est sécrétée par l'embryon, juste au moment de la ponte.

Dans le cas des œufs durables qui possèdent deux et parfois trois enveloppes (1), la plus interne est toujours formée de chitine, tandis que la ou les plus externes en sont totalement dépourvues et sont formées principalement de protéines tannées (Depoortere et Magis, 1967 ; Piavaux et Magis, 1970). La mise en place de l'enveloppe chitineuse interne est réalisée par l'embryon, au moment de la ponte.

Il semble donc que l'on doit homologuer l'enveloppe embryon-

Ci) Chez *Notommata copeus* Ehrenberg, chez *Brachionus plicatilis* Müller et chez certains *Epiphantes*.

naire unique des œufs immédiats à l'enveloppe la plus interne des œufs durables. Il semble également que l'on doit homologuer ces enveloppes embryonnaires chitineuses des Rotifères à l'enveloppe moyenne des œufs de Nématodes qui est aussi de nature chitineuse et est entourée d'une enveloppe externe de nature protéique (Monne, 1956, 1963). Ces enveloppes externes protéiques sont sécrétées par la paroi utérine maternelle tandis que les enveloppes internes chitineuses sont élaborées par l'embryon, chez les Nématodes (Monne et Hönig, 1954) comme chez les Rotifères (Piavaux, 1970).

TABLEAU 1

Synthèse des données actuelles sur la nature chitineuse ou protéique de la matrice organique des structures anhistes chez les Aschelminthes.

Classes	Structures	Nature de la matrice organique	
		Chitine (1)	Protéines (2)
A. ENVELOPPES EMBRYONNAIRES			
— Rotifères	— coque unique de l'œuf immédiat	+	—
	— coque interne de l'œuf durable	+	—
	— coque(s) externe(s) de l'œuf durable	—	+
— Nématodes	— coque interne ou moyenne	+	—
	— coque externe	—	+
B. FORMATIONS CUTICULAIRES OU SQUELETTIQUES			
— Rotifères	— lorica	—	+
	— mastax	—	+
— Gastrotriches	— cuticules, écailles, plaques, épines	—	+
	— tubes adhésifs	—	+
— Nématodes	— cuticule	—	+
	— organes copulateurs	—	+
— Kinorhynques (Echinodères)	— cuticule	+	—
	— scalides et épines	+	—
	— tubes adhésifs	+	—

(1) Mise en évidence par la résistance de la structure dans la soude 0,5 N à 100 °C et son hydrolyse par les chitinasées purifiées.
(2) Solubilité de la structure dans la soude 0,5 N à froid ou à 100 °C.

Ces similitudes de composition chimique offertes par les enveloppes embryonnaires viennent à l'appui de l'hypothèse d'une parenté phylétique entre Rotifères et Nématodes (Tableau 1).

b) Formations cuticulaires et squelettiques

L'application de la méthode enzymatique pour la recherche de la chitine a permis de résoudre également le problème de la localisation de ce polysaccharide au niveau des formations cuticulaires et squelettiques des adultes de plusieurs classes d'Aschelminthes.

Chez tous les Rotifères étudiés, la lorica et le mastax sont dépour-

vus de chitine et constitués de protéines tannées (Depoortere et Magis, 1967). Chez les Gastrotriches (1) *Thaumastoderma* sp., *Tetranchyderma*, *Cirrhophora* Lévi, *Acanthodasys aculeatus* Remane et *Diplo dasys ankeli* Wilke, la cuticule et les écailles, plaques, épines et tubes adhésifs ne contiennent pas de chitine et sont constitués également de protéines tannées (Depoortere, 1967 et observations inédites). L'absence totale de chitine au niveau des formations cuticulaires ectodermiques, chez les Rotifères et les Gastrotriches, concorde avec la situation que l'on connaît chez les Nématodes où toutes les strates et différenciations cuticulaires sont de nature protéique (« matricine », collagène, glycoprotéines) et lipidique, et sont dépourvues de chitine (Monne, 1955 ; Bird, 1957 ; Fairbairn, 1957 ; Watson, 1965), de même, d'ailleurs, que les spicules de l'appareil copulateur (Depoortère, 1967).

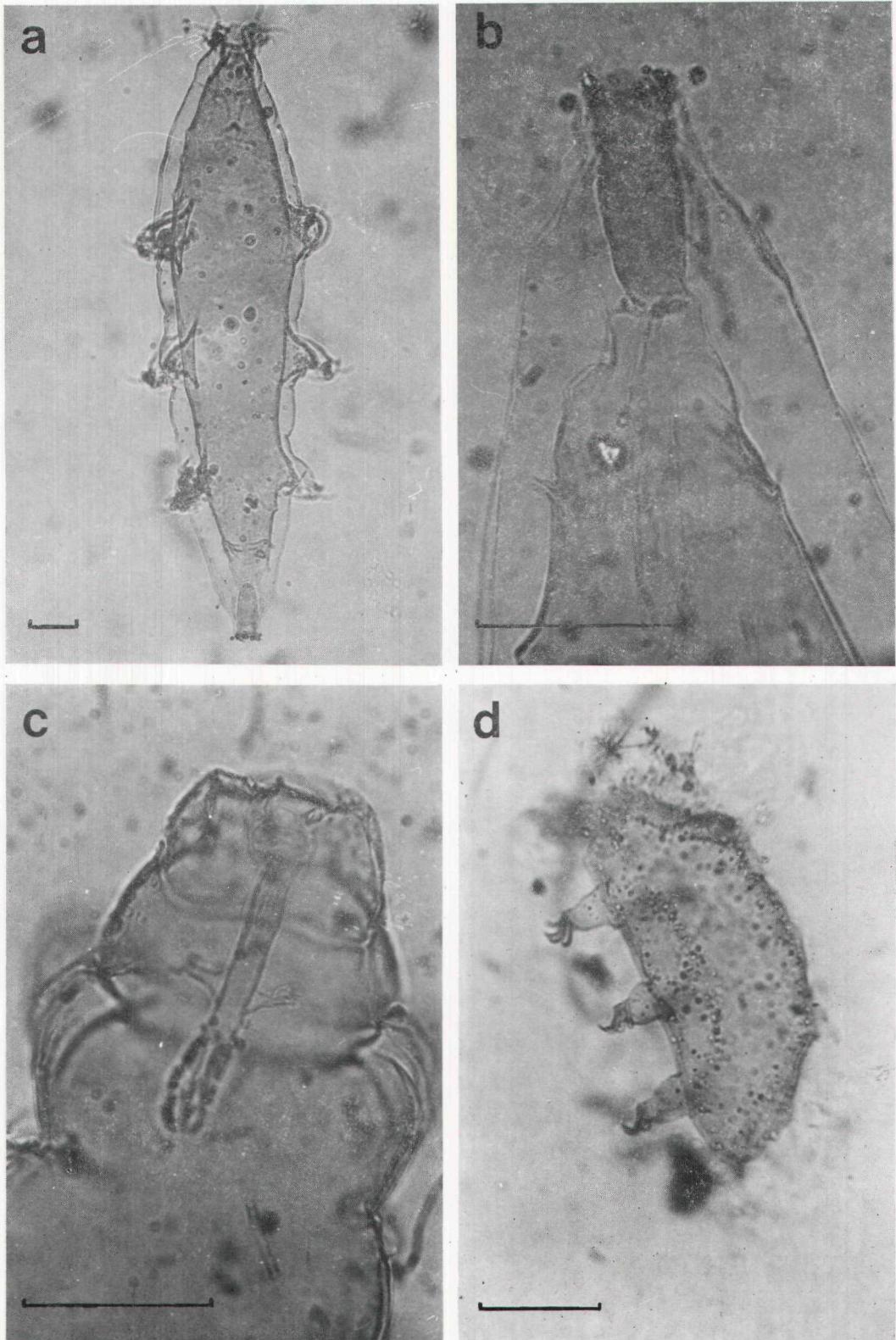
Les Echinodères (ou Kinorhynques) possèdent une constitution chimique totalement différente. La cuticule *d'Echinoderes* sp. résiste à un traitement prolongé (3 heures) par la soude 0,5 N à 100 °C, de même que les scalides de la tête, les épines cuticulaires segmentaires et les tubes adhésifs (Planche 1). Après coloration au Rouge Congo, on peut constater que la cuticule chitineuse est d'une seule venue et constitue aussi bien les membranes articulaires que les épaississements annulaires. De plus, on peut observer la persistance d'un manchon cuticulaire correspondant à un stomodéum. En présence de chitinases purifiées, la cuticule se fragmente d'abord au niveau des membres interannulaires. Les épines se dissolvent ensuite et, après 6 heures d'incubation à 37 °C et à pH 5,2 dans la solution enzymatique, l'hydrolyse de la cuticule est complètement achevée (Depoortere, 1967 ; Jeuniaux et Bussers, inédit).

La nature incontestablement chitineuse de la cuticule et des autres formations cuticulaires épidermiques des Echinodères (Tableau 1) contraste avec l'absence complète de ce polysaccharide au niveau des cuticules des Rotifères, des Gastrotriches et des Nématodes ; il constitue un argument sérieux à l'encontre d'une parenté phylétique entre les Echinodères et ces trois dernières classes.

Composition chimique de la cuticule et position phylétique des Tardigrades

Alors que beaucoup d'auteurs pensent que les Tardigrades sont, comme les Onychophores, des Pararthropodes issus de la base de la lignée arthropodienne, d'autres, au contraire, contestent ce rapprochement et envisagent une parenté avec les Aschelminthes (Crowe *et al.*, 1970). Un des arguments avancés dans ce dernier cas est la nature non chitineuse de la cuticule des Tardigrades. Marcus (1927, 1928) et Cuénot (1949) considèrent, en effet, que cette cuticule est formée de protéines ou d'une « substance chitinoïde » différente de la chitine proprement dite. Plus récemment, Crowe *et al.* (1971) observent, chez *Macrobiotus areolatus*, la présence de mucopolysaccharides acides, de protéines et de polysaccharides indéterminés, mais pas de chitine.

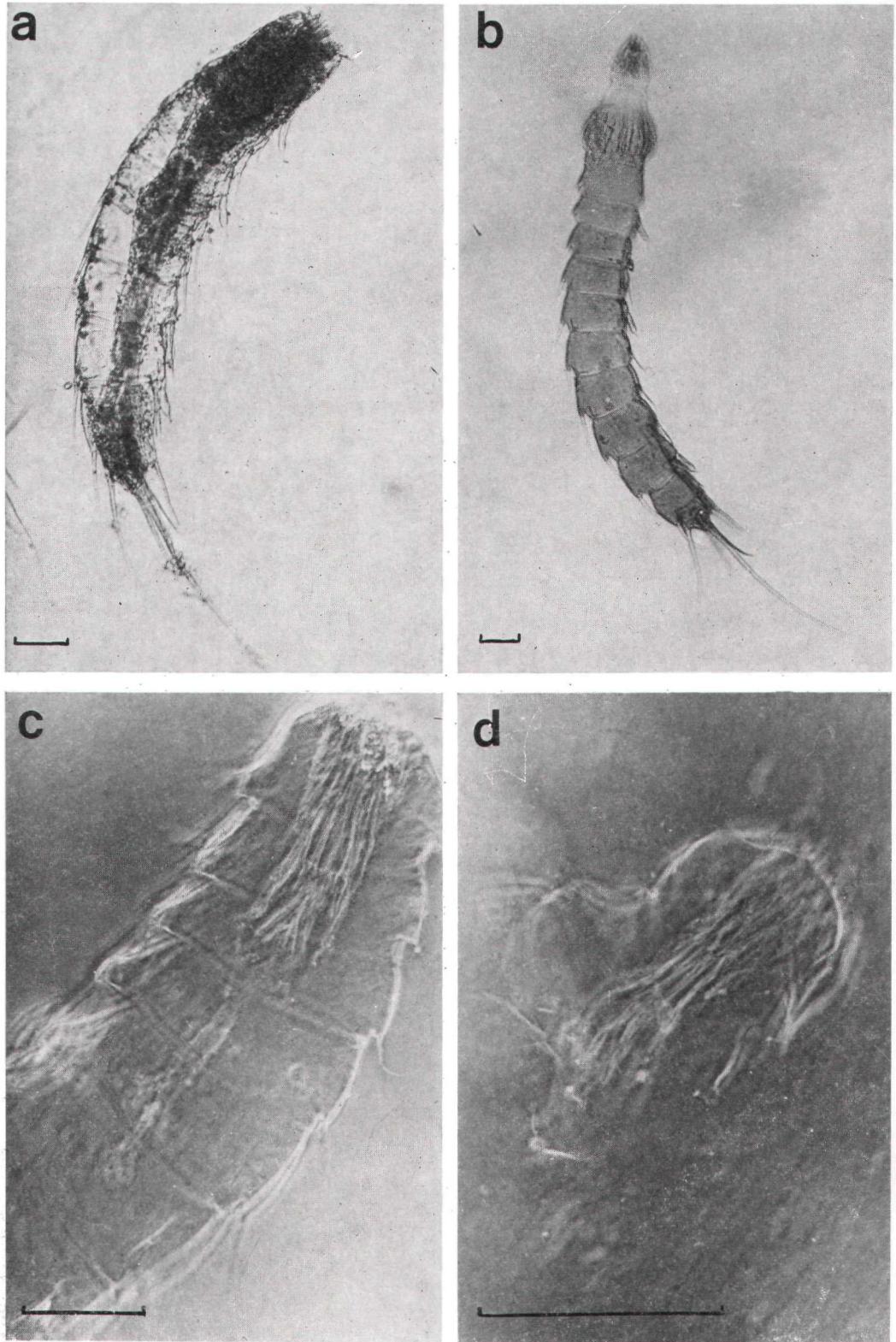
(1) Le matériel a été aimablement fourni et identifié par Mme J. Renaud-Mornant.



CHARLES JEUNIAUX

PLANCHE 1
Echinoderes sp. (Kinorhynques)

a) Individus frais ; b) après traitement pendant 2 h à 100 °C par la soude normale (NaOH 1 N) : toutes les structures cuticulaires sont intactes (coloration de la chitine par le rouge Congo) ; c) (après le même traitement et coloration par le rouge Congo) : l'introvert rétracté se prolonge en un stomodéum chitineux ; d) le même individu au cours de l'hydrolyse de la chitine par la chitinase purifiée (échelle = 50 μ).



CHARLES JEUNIAUX

PLANCHE 2

Tardigrados : les microphotos montrent les animaux **après** traitement pendant 2 h par la soude normale (NaOH 1 N) à 100 °C ; toutes les structures conservées, de nature chitineuse, sont colorées au rouge Congo.

a, b) *Milnesium tardigradum* : la cuticule est double, les griffes et le stomodéum sont intacts ; c) *Macrobiotus*, sp. : la cuticule simple se prolonge dans le stomodéum ; d) *Echiniscus merokensis* : la cuticule et les griffes sont bien visibles (échelle = 50/ μ t).

La méthode enzymatique pour la mise en évidence de la chitine a été appliquée par Bacetti et Bosati (1971) à l'étude de *Macrobiotus hufelandi* et par Bussers et Jeuniaux (1973, a et b) à celle de deux espèces appartenant à l'ordre des Heterotardigrada (*Milnesium tardigradum* Doyere et *Macrobiotus* sp.) et d'une espèce appartenant à l'ordre des Eutardigrada (*Echiniscus merokensis* Bichters), ce qui constitue un bon échantillonnage.

Chez ces différentes espèces, la cuticule et les griffes résistent parfaitement à l'action de la soude 0,5 N à 100 °C (Planche 2), mais sont rapidement hydrolysées par les solutions de chitinases purifiées. On observe également l'existence d'un manchon cuticulaire chitineux au niveau de l'œsophage et du pharynx, ce qui révèle la présence d'une profonde invagination stomodéale (Planche 2). Divers tests histochimiques montrent (Bussers et Jeuniaux, 1973 b) que la cuticule et les griffes contiennent également des protéines partiellement liées, probablement, à la chitine ; la présence de protéines tannées est observée au niveau des griffes. Toutefois, comme chez les Arthropodes, c'est la matrice chitineuse qui confère à la cuticule sa forme et ses détails de structure qui demeurent inchangés après la destruction des protéines cuticulaires.

L'argument de la nature chimique de la cuticule ne peut donc plus être utilisé à l'encontre de l'hypothèse d'un rapprochement phylétique des Tardigrades et des Arthropodes ou des Pararthropodes

Caractères systématiques
au niveau de la composition chimique des mâchoires
de quelques Polychètes

Les mâchoires qui arment la trompe dévaginable de nombreuses espèces d'Annélides Polychètes sont dépourvues de chitine (Jeuniaux, 1963 ; Hyman, 1966) et sont principalement composées de protéines qui peuvent être tannées par des ponts quinoniques, notamment chez *Nephthys* (Michel, 1971).

On sait que l'organisation anatomique de la trompe et la disposition des mâchoires chez les Eunicidae diffèrent considérablement de ce qu'on observe chez la plupart des autres familles de Polychètes dites errantes. Les Eunicidae (et les Amphinomidae) se distinguent par la présence d'un organe buccal ventral et de deux séries distinctes de pièces broyeuses, appelées maxilles (en position dorsale) ou mandibules (en position ventrale) (Dales, 1962 ; Desière, 1967). Sur la base de ces différences anatomiques, les Eunicidae sont considérées comme très éloignées phylétiquement des autres familles de Polychètes errantes, telles que les Phyllodocidae, Glyceridae, Nephthyidae, Aphroditidae et Nereidae (Dales, 1962).

Les caractères de la composition chimique des crochets mandibulaires confirment cette hypothèse (Voss-Foucart *et al.*, 1973).

La composition minérale des maxilles et des mandibules d'*Eunice torquata* et de *Marphysa sanguinea* (Eunicidae) est profondément différente de celle de *Perinereis cultrifera* (Nereidae) et de *Sthenelais boa* (Aphroditidae). Chez les deux espèces d'Eunicidae étudiées, en

effet, les carbonates de calcium et de magnésium représentent de 80 à 88,5 p. 100 du poids sec des maxilles et des mandibules, alors que ces constituants minéraux ne constituent que 0,5 à 0,7 p. 100 du poids sec des mâchoires des autres Polychètes étudiées. Il s'agit là d'une différence aussi profonde que celle qui oppose la composition chimique de la cuticule des Insectes à celle de la plupart des Crustacés.

La composition en acides aminés des protéines composant la matrice organique des crochets mandibulaires a été analysée par chro-

TABLEAU 2

Composition en acides aminés des protéines constitutives des pièces mandibulaires de cinq espèces de Polychètes.

(D'après Voss-Foucart *et al.*, 1973)

(Les résultats sont exprimés en fraction molaire, c'est-à-dire en nombre de résidus de chaque acide aminé pour 100 résidus).

Acides aminés	Crochets mandibulaires				Mandibules	Maxilles
	Glycera <i>convoluta</i> (Glyceridae)	Nephthys <i>hombergii</i> (Nephthyidae)	Sthenelais <i>boa</i> (Aphroditidae)	Perinereis <i>cultifera</i> (Nereidae)	Eunice <i>torquata</i> (Eunicidae)	
Ac. aspartique ...	1,93	4,90	6,26	12,90	9,20	4,74
Thréonine	1,13	1,54	2,55	1,24	4,11	4,32
Sérine	1,98	7,84	6,83	2,22	9,63	9,23
Ac. glutamique ..	2,32	5,90	5,24	4,90	11,62	13,38
Proline	+	1,19	+	2,89	3,32	4,96
Glycine	62,07	56,18	50,10	43,26	40,92	39,16
Alanine	3,28	4,95	9,91	9,10	7,94	9,20
Cystéine	—	—	—	—	TR	+
Valine	0,56	1,04	0,86	0,98	1,06	1,27
Méthionine	—	0,73	—	—	++	0,28
Isoleucine	0,41	0,57	0,38	0,43	0,70	0,89
Leucine	0,64	0,43	2,66	1,24	1,15	1,71
Tyrosine	0,17	3,27	1,33	7,79	0,46	0,44
Phénylalanine ...	0,21	3,05	3,66	1,90	0,58	0,72
Lysine	0,61	1,60	+	0,42	0,71	0,89
Histidine	23,59	2,95	8,16	7,79	1,19	0,65
Arginine	1,03	3,77	2,00	2,87	7,34	8,11

matographie sur colonne échangeuse d'ions, chez cinq espèces de Polychètes, dont une appartenant à la famille des Eunicidae (*Eunice torquata*). Les résultats sont présentés dans le tableau 2. Les patrons de composition en acides aminés de la fraction protéique des maxilles et des mandibules *d'Eunice torquata* sont pratiquement identiques mais diffèrent sensiblement de ceux des mâchoires des autres Polychètes, notamment par les proportions plus élevées de la thréonine, de l'acide glutamique (ou glutamine) et de l'arginine, et par la proportion d'histidine beaucoup plus faible.

Parmi les autres familles de Polychètes considérées, on constate que les compositions globales en acides aminés des mandibules de *Nephthys hombergii* (Nephthyidae), de *Sthenelais boa* (Aphroditidae) et de *Perinereis cultifera* (Nereidae) sont assez voisines, ce qui suggère, pour autant que la fraction protéique soit homogène, un degré d'isologie relativement élevé, entre les protéines constitutives

de ces structures. Par contre, la composition des protéines des mandibules de *Glycera convoluta* (Glyceridae) est très particulière, puisqu'elle est constituée, à concurrence de 88 p. 100 de la somme des acides aminés, de glycine et d'histidine (Tableau 2).

En conclusion, les caractères fournis par l'étude de leur composition chimique confirment que les pièces maxillaires et mandibulaires des Eunicidae ne sont pas homologues des crochets des autres familles de Polychètes errantes, ce qui est en bon accord avec l'opinion de Dales (1962), notamment en ce qui concerne la position isolée des Eunicidae au sein des Polychètes.

Conclusion

Nous avons défini les conditions requises pour que les caractères de la composition chimique puissent être utilisés comme caractères systématiques à implication phylogénétique.

En ce qui concerne les animaux de la méiofaune, la biochimie peut contribuer à résoudre les problèmes posés par la systématique des groupes auxquels ils appartiennent, souvent encore considérés comme des « incertae sedis ». Mais la taille réduite de ces organismes et leur récolte difficile en grande quantité proscrit l'application de la plupart des méthodes classiques d'analyse chimique. La mission des biochimistes intéressés par la systématique est donc de rechercher des microméthodes hautement spécifiques, susceptibles d'être appliquées à des quantités minimes de matériel et capables de révéler l'existence de composés chimiques biosynthétisés par des sémantides suffisamment bien définies pour permettre la discussion de leurs propriétés d'homologie. Nous en avons donné un exemple dans le cas de la chitine et des transférases qui en contrôlent la synthèse.

En dernière analyse, c'est cependant au niveau des protéines que l'on peut espérer trouver les meilleurs critères d'homologie et les meilleurs indices de parenté phylétique. Faute de pouvoir isoler et purifier les protéines des animaux de la méiofaune et d'en établir la séquence aminoacide, pour les raisons techniques évoquées plus haut, le systématicien biochimiste peut tirer des informations précieuses des patrons de composition globale en acides aminés de la fraction protéique de certaines structures bien individualisées ou de l'étude immunoélectrophorétique des protéines solubles.

En tout état de cause, cependant, il faut se garder de substituer une chimiotaxonomie exclusive à la systématique classique. Les arguments nouveaux tirés de l'analyse chimique doivent être considérés en même temps et au même titre que les autres caractères tirés de la morphologie ou de l'embryologie.

Summary

The use of biochemical characters in taxonomy and phylogeny is at first discussed from a general point of view. The presence of a given kind of chemical material in some given species must not be considered as a taxonomic character without criticism. Some criteria are pointed out. The principal condition is the property of homology between the biomolecules which are to be compared in

different taxa. As is the case in comparative morphology, homology is a purely genetic concept. Its demonstration lies on isology, i.e. similarity of chemical composition, but only as far as semantic molecules (in the meaning of Zuckerkandl and PauliDg) are considered, i.e. proteins and peptides (« direct morphology »).

In the case of *episemantic molecules*, i.e. non-proteic biomolecules, the synthesis of which is controlled by one or more semantic molecules (enzymes), these molecules would not be considered as having the value of taxonomic characters unless the demonstration of their production by homologous enzymes or homologous biosynthetic pathways is obtained («indirect homology»). In any case, *analogous molecules* without reference to homology must be avoided in taxonomic or phylogenetic speculations.

Among the methods of biochemical analysis, few of them are suitable to organisms belonging to the meiofauna. The need for highly specific micro-methods is thus pointed out. The most available methods, so far applied to meiobenthic animal taxa, are the enzymatic micromethods for the detection of polysaccharids such as chitin, column chromatography of amino-acid composition of proteins in the case of well-defined and well-isolated morphological structures, and immunoelectrophoresis. The following examples are chosen in the present lecture:

a) close phylogenetic relationships between some classes of the phylum Aschelminthes are confirmed by the chitinous nature of the internal embryonic envelops of the eggs in Rotifers and Nematodes and by the lack of chitin in the cuticular formations of the adults of Rotifers, Gastrotrichs and Nematodes;

b) Kinorhynques, on the contrary, do possess a typical chitinous cuticle, with chitinous stomodaeal invagination, which questions their phyletic position near the three former classes;

c) the chitinous nature of cuticle, jaws and stomodaenum of Tardigrades are not in contradiction with the hypothesis of a phylogenetic closeness between this class and Arthropoda (or Pararthropoda);

d) among Polychaetes, the isolated position of Eunicidae proposed by Dales is confirmed by their highly calcified jaws and by the amino-acid pattern of the structural proteins of their buccal pieces, when compared to those of Nereidae, Aphroditidae, Nephthyidae and Glyceridae.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ACHER, R., 1971. — The neurohypophyseal hormones: an example of molecular evolution, in « Biochemical evolution and the origin of life », Schoffeniels ed., pp. 43-51, North Holland.
- BACETTI, B. et ROSATI, F., 1971. — Electron microscopy on Tardigrada. III. - The integument. *J. Ultrastr.*, 34, p. 214.
- BIRD, A.F., 1957. — Chemical composition of the Nematode cuticule. *Exper. Parasitol.*, 6, pp. 383-403.
- BLOMBACK, B., 1971. — Selectional trends in the structure of fibrinogen of different species, in « Biochemical evolution and the origin of life », Schoffeniels ed., pp. 112-129, North Holland.
- BRICTEUX-GRÉGOIRE, s., SCHYNS, R. et FLORKIN, M., 1971. — Phylogeny of activation peptides of trypsinogen, in « Biochemical evolution and the origin of life », Schoffeniels ed., pp. 130-149, North Holland.
- BOYDEN, A., 1943. — Serology and Animal Systematics. *The Amer. Natur.*, 77, pp. 234-255.
- BUSERS, J.C. et JEUNIAUX, CH., 1970. — Recherches préliminaires sur la présence de chitine dans les kystes de quelques Ciliés. *J. Protozool.*, 17, p. 32.
- BUSERS, J.C. et JEUNIAUX, CH., 1973 a. — Chitinous cuticle and systematic position of Tardigrada. *Biochem. System.*, 1, p. 77.
- BUSERS, J.C. et JEUNIAUX, CH., 1973 b. — Structure et composition de la cuticule de *Macrobiotus* sp. et de *Milnesium tardigradum* (Tardigrades). *Ann. Soc. roy. Zool. Belgique*, 103, pp. 271-279.
- BUSERS, J.C. et JEUNIAUX, CH., 1974. — Recherche de la chitine dans les productions métaplasmatiques de quelques Ciliés. *Protistologica*, 10, pp. 43-46.
- CAREY, F.G., 1965. — Chitin synthesis in vitro by Crustacean enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 16, p. 155.
- CROWE, J.H., NEWELL, I.M. et THOMSON, W.W., 1970. — *Echiniscus viridis* (Tardigrada): Fine structure of the cuticule. *Trans. Amer. Micr. Soc.*, 89, p. 316.

- CROWE, J.H., NEWELL, I.M. et THOMSON, W.W., 1971. — Fine structure and chemical composition of the cuticle of the Tardigrade, *Macrobiotus areolatus* Murray. *J. Micr.*, 11, pp. 107-120.
- CUÉNOT, L., 1949. — Les Tardigrades, in *Traité de Zoologie*, Grasse, Masson éd., Paris.
- DALES, R.P., 1962. — The polychaete stomodeum and the inter-relationship of the families of Polychaeta. *Proc. Zool. Soc. London*, 139, pp. 389-428.
- DEPOORTERE, H. et MAGIS, N., 1967. — Mise en évidence, localisation et dosage de la chitine dans la coque des œufs de *Brachionus leydigii* Cohn et d'autres Rotifères. *Ann. Soc. roy. Zool. Belgique*, 97, pp. 187-195.
- DESIÈRE, M., 1967. — Morphologie de l'organe buccal ventral de *Marphysa bellii* (Audouin et Edwards) (Polychète, Eunicidae). *Ann. Soc. roy. Zool. Belgique*, 97, pp. 65-90.
- FAIRBAIRN, D., 1957. — The biochemistry of *Ascaris*. *Experim. Parasitol.*, 6, p. 491.
- FLORKIN, M., 1962. — Isologie, homologie, analogie et convergence en biochimie comparée. *Bull. Classe Sc. Acad. roy. Belgique*, 48, pp. 819-824.
- PLORKIN, M., 1966. — A molecular approach to phylogeny. Elsevier, Amsterdam.
- GILES, C.H., HASSAN, A.S.A., LAIDLAW, M. et SUBRAMANIAN, R.V.R., 1958. — *J. Soc. Dyers colourists*, 74, p. 647.
- GLASER, L. et BROWN, D.H., 1957. — The synthesis of chitin in cell-free extracts of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*, 228, pp. 729-742.
- HASLEWOOD, G.A.D., 1971. — Examples of vertebrate evolution as indicated by bile salt types and by general morphology, in « Biochemical evolution and the origin of Life », Schoffeniels ed., pp. 191-202, North Holland.
- HYMAN, L.H., 1951. — *The Invertebrates*, vol. III, McGraw-Hill éd., New York.
- JAWORSKI, E.G., WANG, L. et MARCO, G., 1963. — Synthesis of chitin in cell-free extracts of *Prodenia eridania*. *Nature*, 198, p. 790.
- JEUNIAUX, CH., 1958. — Recherches sur les chitinases. I. - Dosage néphéломétrique et production de chitinase par des Streptomycètes. *Arch. Int. Physiol. Bioch.*, 66, pp. 408-427.
- JEUNIAUX, CH., 1959. — Recherches sur les chitinases. II. - Purification de la chitinase d'un Streptomycète et séparation électrophorétique de principes chitinolytiques distincts. *Arch. Int. Physiol. Bioch.*, 67, p. 597.
- JEUNIAUX, CH., 1963. — Chitine et chitinolyse, un chapitre de la biologie moléculaire. Masson éd., Paris.
- JEUNIAUX, CH., 1965. — Chitine et phylogénie : application d'une méthode enzymatique de dosage de la chitine. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 47, pp. 2267-2278.
- JEUNIAUX, CH., 1971. — On some biochemical aspects of regressive evolution in animals. *Biochemical Evolution and the origin of Life*, Schoffeniels éd., pp. 304-313, North Holland.
- MARCUS, E., 1927. — Zur Ökologie und Physiologie der Tardigraden. *Zool. Jahrb. Allg. Zool.*, 44, p. 323.
- MARCUS, E., 1928. — Zur vergleichenden Anatomie und Histologie der Tardigraden. *Zool. Jahrb. Allg. Zool.*, 45, p. 99.
- MC CARTHY, B.J. et BOLTON, E.J., 1963. — An approach to the measurement of genetic relatedness among organisms. *Proceed. Nat. Acad. Sc.*, 50, pp. 156-164.
- MICHEL, c., 1971. — Mise en évidence d'un système de tannage quinonique au niveau des mâchoires de *Nephithus hombergii* (Annelide Polychète). *Ann. Histochim.*, 16, pp. 273-282.
- MONNE, L., 1956. — On the histochemical properties of the egg envelopes and external cuticle of some parasitic nematodes. *Ark. f. Zool.*, 9, pp. 93-113.
- MONNE, L., 1963. — On the formation of the egg shells of the Ascaroides, particularly *Toxascaris leonina*. *Ark. f. Zool.*, 15, pp. 277-284.
- MONNE, L. et HÖNIG, G., 1954. — On the properties of the egg envelopes of various parasitic nematodes. *Ark. f. Zool.*, 7, pp. 261-272.
- PIAVAUX, A., 1970. — Origine de l'enveloppe chitineuse des œufs de deux Rotifères du genre *Euchlanis* Ehrenberg. *Ann. Soc. roy. Zool. Belgique*, 100, pp. 129-137.
- PIAVAUX, A. et MAGIS, N., 1970. — Données complémentaires sur la localisation de la chitine dans les enveloppes des œufs de Rotifères. *Ann. Soc. roy. Zool. Belgique*, 100, pp. 49-59.
- RUDALL, K.M., 1963. — The chitin-protein complexes of insect cuticles. *Adv. Insect Physiol.*, 1, pp. 257-312.
- TESHIMA, I., 1972. — DNA-DNA hybridization in Blackflies (Diptera : Simuliidae, Canad. J. Zool.), 50, p. 931.

- THROCKMORTON, L.H., 1968. — Biochemistry and taxonomy. *Ann. Rev. Entom.*, 13, pp. 99-114.
- VOSS-FOUCART, M.F., FONZE-VIGNAUX, M.-TH. et JEUNIAUX, CH., 1973. — Systematic characters of some Polychaetes (Annelida) at the level of the chemical composition of the Jaws. *Biochem. Systematics*, 1, pp. 119-122.
- WATSON, BD., 1965. — The structure of the body wall and the growth of the cuticle in the adult nematode, *Ascaris lumbricoides*. *Quart. J. Microsc. Sci.*, 106, pp. 83-91.
- ZUCREKANDL, E. et PAULING, L., 1962. — Molecular disease, evolution and genie heterogeneity, in « Horizons in Biochemistry », M. Kasha and B. Pullman ed., pp. 189-225, Academic Press, New York.