

(Communication reçue le 10 février 1981)

MATRICE ORGANIQUE DE LA COUILLE
ET POSITION PHYLÉTIQUE DE
NEOPILINA GALATHEAE
(MOLLUSQUES, MONOPLACOPHORES)

par

M. POULICEK et Ch. JEUNIAUX

Laboratoires de Morphologie, Systématique et Écologie animales

Université de Liège

22, Quai Van Beneden

B-4020 Liège (Belgique)

RÉSUMÉ

L'intérêt de la connaissance de la composition chimique de la coquille des Mollusques dans le cadre de discussions d'ordre phylogénétique est illustré par le cas de *Neopilina* et des Monoplacophores.

L'analyse chimique de la matrice organique des différentes strates de la coquille de *Neopilina galatheae* montre la présence de chitine au niveau des couches calcifiées de nacre et de prismes. La chitine est absente au niveau du péricostracum.

La teneur en chitine est faible (0,3 % du poids sec décalcifié de la coquille totale).

La microstructure et la composition chimique de la coquille sont en faveur d'un rapprochement des Monoplacophores et des Conchifères primitifs.

Organic matrix of the shell and systematic position
of *Neopilina galatheae* (Mollusca, Monoplacophora)

SUMMARY

The interest of the chemical composition of molluscan shells in phylogenetical considerations is illustrated by the case of *Neopilina*.

Chemical analyses of organic matrix of the different shell layers of *Neopilina galatheae* revealed the presence of chitin in nacreous and prism layers. Chitin is lacking in periostracum.

The proportion of chitin is low (about 0.3 % of shell decalcified weight).

Both microstructural and chemical characteristics are in favor of a closest relationship of Monoplacophora with primitive Conchifera rather than with Amphineura.

INTRODUCTION

Depuis sa description par LEMCHE (1957), *Neopilina galatheae* a posé plus de questions qu'elle n'en a résolu, aux malacologistes qui se sont penchés sur le problème de l'origine et de la phylogénie des Mollusques.

Huit espèces du genre *Neopilina* ont été découvertes et décrites depuis le coup de drague de la Galathea, au large de la côte Pacifique du Costa Rica en 1952. Toutes

ces espèces sont abyssales, vivant entre 2000 et 7000 m de profondeur sur des fonds de vase; nulle n'a été observée vivante au laboratoire, et, *a fortiori*, on ne connaît rien de leur embryologie.

La position phylétique des Monoplacophores actuels, et de *Neopilina* en particulier, est le type de problème que peuvent contribuer à résoudre les méthodes de la biochimie systématique, lorsque l'on manque de renseignements d'ordre embryologique, et lorsque les caractères anatomiques et morphologiques sont difficiles à interpréter ou donnent lieu à des interprétations contradictoires.

Nous ne pouvions mieux choisir, pour rendre hommage au Professeur Paul BRIEN, dont on sait avec quelle sagacité et quelle élégance il s'attaquait aux plus difficiles problèmes de la phylogénie animale, que d'exposer ici les résultats d'analyses portant sur la coquille de *Neopilina galathea*. Nous tenterons de confronter ces résultats aux diverses théories concernant la position phylétique des Monoplacophores.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons pu disposer pour ce travail de la coquille d'un individu de *Neopilina galathea* parmi les dix exemplaires récoltés au chalut le 6 mai 1952 par l'Expédition Galathea (Station 716, profondeur 3590 m, coordonnées 9°23'N, 89°32'W) sur un sédiment constitué de vase argileuse de teinte sombre (LEMCHE, 1957).

Le spécimen analysé est un paratype, conservé depuis sa découverte au Musée Zoologique de l'Université de Copenhague. Il nous a été confié pour analyse par le Professeur J. KNUDSEN.

Les fragments de coquille ont été soigneusement débarrassés des épibiontes et le périostracum a été éliminé à la fraiseuse. Il n'a pas été possible de séparer les strates coquillères pour le dosage quantitatif de la chitine. Ce dosage a été entrepris par la méthode enzymatique spécifique décrite par l'un de nous (JEUNIAUX, 1963, 1965) à l'aide de chitinases produites et purifiées au laboratoire (JEUNIAUX, 1958, 1959), à partir d'une souche de Streptomyces. Après décalcification par HCl 0,5 N à 20° C et dégradation des protéines par ébullition dans une solution de NaOH 0,5 N, le matériel résiduel après lavage a été soumis à l'action de ces chitinases purifiées à pH 5,2 et 37° C. Les produits d'hydrolyse ont été incubés ensuite en présence de chitobiase (sérum de homard dilué dix fois) et l'acetylglucosamine dosée par la méthode colorimétrique spécifique de REISSIG *et al.* (1955).

La chitine « libre », non liée aux autres constituants organiques de la coquille (JEUNIAUX, 1965) a été mesurée par dosage de l'acetylglucosamine libérée sous l'action des mêmes solutions de chitinases purifiées, mais sans traitement préalable par la soude à chaud.

Nous avons tenté de localiser la chitine au sein des strates isolées de la coquille en employant d'une part le test du chitosane selon la méthode de RAJULU (comm. pers.) et d'autre part un test enzymatique qualitatif (observation de la résistance après traitement par NaOH 0,5 N à 100° C et de l'hydrolyse par les chitinases purifiées concentrées).

RÉSULTATS

La coquille de *Neopilina galathea* est composée de l'extérieur vers l'intérieur, d'une couche épaisse de périostracum, d'une couche de prismes et d'une couche de

nacre relativement mince. Nous confirmons donc la description antérieure de ERBEN et al. (1968).

Les résultats de l'analyse quantitative du degré de calcification et de la teneur en chitine totale et en chitine « libre » sont présentés dans le tableau I. La localisation de la chitine au niveau des différentes strates coquillières est résumée dans le tableau II.

La coquille de cette espèce est, par rapport aux autres mollusques, relativement peu calcifiée (moyenne 95,53 % du poids sec total de la coquille), ce que l'on pouvait attendre d'une microstructure de type prismes-nacre.

La matrice organique de la coquille contient de la chitine, qui représente entre 0,28 et 0,32 % du poids sec décalcifié. La chitine « libre », directement accessible à l'hydrolyse par les chitinases purifiées sans dégradation préalable des protéines, constitue 25 % de la quantité totale de chitine. La majeure partie de la chitine semble donc exister sous forme « liée », c'est-à-dire probablement sous la forme d'un complexe glycoprotéique.

La chitine n'est pas répartie uniformément dans toute l'épaisseur de la coquille (tableau II). Les deux techniques employées, test du « chitosane » et test enzymatique qualitatif, donnent les mêmes résultats : la chitine est présente au niveau de la nacre et des prismes, mais le péricostracum, qui n'est pas calcifié, en semble totalement dépourvu. En effet, dans ce dernier cas, le résidu insoluble après traitement par NaOH 0,5 N à 100° C pendant deux heures ne donne pas la coloration caractéristique du test du chitosane, et ne se dissout pas pendant une incubation de deux heures dans une solution de chitinases purifiées à pH 5,2.

La chitine est donc localisée au niveau de la matrice organique des deux couches calcifiées, la nacre et les prismes ; les réactions aux tests qualitatifs sont plus nettement positives dans le cas de la nacre, ce qui suggère que la teneur en chitine y est plus élevée que dans les prismes.

DISCUSSION

1. — L'intérêt de connaître la nature chimique d'une structure pour discuter certains problèmes de systématique phylogénétique, ainsi que les limites d'application de tels arguments, ont été envisagés par l'un de nous à propos d'autres groupes zoologiques (JEUNIAUX, 1975).

La connaissance de la composition chimique de la matrice organique constitue un argument particulièrement intéressant pour interpréter l'évolution des coquilles des Mollusques et, partant, l'origine et l'évolution de ce groupe.

En effet, les coquilles de tous les Mollusques, ou du moins de tous les Conchi-fères, sont parfaitement homologues et peuvent donc être directement comparées, au point de vue chimique comme au point de vue morphologique. A l'exception des Polyplacophores, elles sont, au moins sur la majeure partie de leur surface, parfaitement anhydres et dépourvues de toute modification due à la présence de tissus. La matrice organique de la coquille est un matériel bien délimité, facile à isoler, n'impliquant pas l'usage de méthodes d'extraction compliquées susceptibles de constituer des sources d'erreurs ou d'altération.

Des analyses chimiques de plus en plus nombreuses fournissent une documentation précieuse (travaux des équipes de DEGENS, GHISELIN, WILBUR, FLORKIN, MEENAKSHI, MITTERER, HARE, ERBEN, GRÉGOIRE et VOSS-FOUCART, etc). Bornons-nous à souligner que les résultats obtenus jusqu'ici pour la matrice calciffrage montrent

TABLEAU I
Composition de la coquille de Neopilina galatheaee

	Poids total calcifié (mg)	Poids total décalcifié (mg)	Taux de calcification (%)	Chitine totale		Chitine « libre »		
				(μg)	% poids sec décalcifié	(μg)	% chitine totale	% poids sec décalcifié
Échantillon 1	310,75	18,65	95,93	35,25	0,28	—	—	—
Échantillon 2	201,80	9,50	95,29	30,48	0,32	—	—	—
Échantillon 3	246,95	11,45	95,36	—	—	9,26	25,21	0,08

TABLEAU II
Localisation de la chitine au sein de la coquille de Neopilina galatheaee

	Test du chitosane	Test enzymatique qualitatif
Periostracum échantillon 1	0	0
échantillon 2	0	0
Prismes (décalcifiés)	+	+ (?)
Nacre (décalcifiée)	+	++

0 : résultat négatif; absence de chitine.
+ : résultat positif; présence de chitine.

d'une part une parenté de composition suffisante pour confirmer le caractère d'homologie des constituants organiques, d'autre part des différences suffisamment sensibles pour permettre de discuter l'évolution de la coquille dans les différentes lignées. L'évolution chimique des coquilles peut ainsi être discutée parallèlement et avec les mêmes critères que son évolution morphologique.

A côté de la composition en acides aminés des protéines de structure (« conchyolines », nacroïnes), la présence ou l'absence d'un groupement de nature polysaccharidique, en l'occurrence la chitine, peuvent également être discutées en terme d'évolution, compte tenu du fait que la biosynthèse de la chitine semble bien catalysée, dans le règne animal, par des enzymes (chitine-synthétases) homologues (JEUNIAUX, 1963, 1975). C'est principalement sous cet aspect que nous allons considérer le cas de *Neopilina* par rapport aux autres Mollusques.

2. — La matrice organique de la coquille de deux espèces de *Neopilina* (*N. ewingi* et *N. bacescui*) a été analysée par MEENAKSHI *et al.* (1970), après hydrolyse acide. La composition en acides aminés de la trame organique calcifiée (après abrasion du pérostracum, du moins de sa partie externe homogène) se caractérise par une très haute proportion de glycine ce qui la rapproche nettement de la composition d'un pérostracum typique.

Par contre, ces mêmes auteurs n'ont pas décelé de chitine par le test du chitosane.

Nos résultats, obtenus notamment au moyen d'une méthode enzymatique sensible et spécifique, montrent au contraire que la matrice organique de la nacre et de la couche de prismes de *Neopilina galatheae* contient incontestablement de la chitine. Cependant, la teneur en chitine est faible (0,30 % du poids décalcifié, en moyenne) ce qui peut expliquer les résultats négatifs obtenus par MEENAKSHI et ses collaborateurs (*op. cit.*), qui ont utilisé un test peu sensible et parfois peu fiable (1) (bien que ce même test nous ait donné des résultats légèrement positifs, dans le cas présent : cf. tableau II). Nous croyons cette explication plus plausible que d'admettre une différence de composition entre espèces d'un même genre.

Nous proposons donc de conclure que la matrice organique des couches calcifiées de la coquille des espèces actuelles du genre *Neopilina* contiennent de la chitine, comme toutes les autres matrices calcaffines de coquilles de Mollusques analysées jusqu'à présent par la méthode enzymatique (JEUNIAUX, 1963; GOFFINET, 1969; GOFFINET et JEUNIAUX, 1969, 1979; POULICEK, 1978; POULICEK et VOSS-FOUCART, en préparation), mais en proportion beaucoup plus faible. La proportion de chitine libre est nettement moins élevée, par rapport à la chitine totale, que chez les autres Mollusques étudiés à cet égard (JEUNIAUX, *l.c.*, GOFFINET et JEUNIAUX, *l.c.*, POULICEK, *l.c.*).

3. — Considérons à présent les caractères de la coquille de *Neopilina* dans le cadre du problème de la position phylétique des Monoplacophores par rapport aux autres classes de Mollusques. Résumons d'abord brièvement les diverses interprétations proposées par les auteurs à ce sujet depuis la découverte de *Neopilina galatheae* en 1952.

LEMCHE (1957) a d'abord présenté *Neopilina* comme un Amphineure, apparenté aux Polyplacophores, ancêtre des Mollusques actuels, exhibant les restes d'une

(1) Pour une discussion de la valeur relative du test du chitosane, voir RICHARDS (1951), JEUNIAUX (1963), RAJULU, JEUNIAUX, VOSS-FOUCART et POULICEK (en préparation).

métamérie ancestrale. YONGE (1957) sans nier le caractère primitif de ce groupe, propose d'interpréter le caractère répétitif et pseudométamérique de certains organes comme une adaptation à la vie abyssale. Peu après, BEKLEMISHEV (1960), puis IVANOV (1964) isolent *Neopilina* des Amphineures et l'assimilent à un ancêtre « prorhipidoglosse » des Conchifères. LEMCHE remet lui-même en cause ses premières conclusions en 1966, et la tendance actuelle des malacologues est de situer *Neopilina* et les Monoplacophores à la base de la voie évolutive des Conchifères (SALVINI-PLAWEN, 1980).

La coquille de *Neopilina galatheae* présente la même composition microstructurale que la coquille des Conchifères primitifs : péricostracum-prismes-nacre. Ceci est un argument en faveur d'un rapprochement entre Monoplacophores et Conchifères primitifs. La nacre est en effet une structure remarquable, très bien définie (GRÉGOIRE, 1972), tout à fait caractéristique et exclusive des Mollusques Conchifères considérés comme primitifs dans leur lignée : Archéogasteropodes et Bellérophontides chez les Gastéropodes, Proto- et Filibranchiés chez les Bivalves, Tétrabranchiaux chez les Céphalopodes. Au contraire, les « Aculifères », ou Amphineures (Caudofoveata, Solénogastres et Polyplacophora), phylogénétiquement antérieurs aux Conchifères (SALVINI-PLAWEN, 1980), ne diffèrent jamais de microstructures de ce type. La couche de nacre de *Neopilina galatheae* est cependant très mince. Ceci pourrait être interprété comme un caractère d'évolution au sein de la lignée des Monoplacophores éventuellement à mettre en relation avec l'adaptation de l'organisme à un mode de vie abyssal : la minceur de la coquille des Mollusques abyssaux est un caractère assez général (BOUCHET, comm. pers.).

La composition en acides aminés des protéines de la matrice de *Neopilina* serait semblable à celle d'un péricostracum banal (MEENAKSHI *et al.*, 1970). Une telle composition peut être interprétée comme un caractère primitif : les deux entités qui, aux stades ultérieurs de l'évolution, vont acquérir une composition caractéristique, ne sont pas encore parfaitement individualisées chimiquement à ce stade évolutif, qui témoignerait ainsi de l'apparition d'un « vrai » péricostracum, si l'on accepte que le « péricostracum » des cérames de Polyplacophores n'est pas l'homologue du péricostracum des coquilles de Conchifère.

L'absence de chitine au niveau du péricostracum de *Neopilina* est une donnée difficile à interpréter, la composition du péricostracum des autres Mollusques étant très variable à cet égard (JEUNIAUX, 1963; PETERS, 1972; GOFFINET et JEUNIAUX, 1979; POULICEK, 1978; POULICEK et JASPAR-VERSALI, en préparation; POULICEK et VOSS-FOUCART, en préparation).

La faible teneur en chitine des couches calcifiées de la coquille de *Neopilina galatheae* de même que la faible teneur en « chitine libre » de cette matrice organique doit être interprétée comme un caractère évolué au sein de la lignée des Monoplacophores. Il apparaît en effet que, à l'inverse de ce qui se passe pour les coquilles en régression ou internes, la tendance générale de l'évolution des coquilles externes de Conchifères aille dans le sens d'une participation de moins en moins importante de la chitine à la constitution de la matrice organique (POULICEK et VOSS-FOUCART, en préparation). La coquille des espèces primitives des autres classes de Conchifères présente en effet une teneur en chitine nettement plus élevée que celle de la coquille de *Neopilina*. Cette teneur en chitine a tendance à se réduire au cours de l'évolution. D'autre part, les structures coquillières des Aculifères (spicules des Caudofoveata et Solénogastres; spicules, soies, écailles, cuticule et cérames de Polyplacophores) montrent une teneur en chitine beaucoup plus élevée que celle observée dans la coquille de *Neopilina*.

CONCLUSION

Il semble bien que la microstructure et la composition chimique de la coquille de *Neopilina galathea* constituent un argument en faveur des théories qui situent les Monoplacophores au niveau des Conchifères primitifs et qui l'écartent résolument des Amphineures. Rien ne s'oppose, à ces points de vues, à ce que les Monoplacophores constituent le groupe-souche dont seraient issues les différentes lignées conduisant aux Gastéropodes, Bivalves et Céphalopodes actuels ainsi que le proposent BEKLEMISHEV (1960) et IVANOV (1964). Quelques détails de composition nous font cependant placer *Neopilina* à un niveau relativement évolué au sein des Monoplacophores.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à exprimer leur reconnaissance à Monsieur le Professeur J. KNUDSEN (Université de Copenhague) qui leur a aimablement fourni le matériel exceptionnel concerné par cette étude.

Nous tenons également à remercier Monsieur le Professeur L. von SALVINI-PLAWEN (Université de Vienne) qui, par ses suggestions et ses critiques constructives, nous a aidé à interpréter les résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- BEKLEMISHEV, V. N. (1960) — Data on the early evolution of mollusks. Functional-morphological discussion of the structure of *Neopilina galathea* Lemche and its importance in comparative anatomy. In : *Referat. Zhur., Biol.*, n° 30187,
- ERBEN, H. K., FLAJS, G. et SIEHL, A. (1968) — Über die Schalenstruktur von Monoplacophoren. *Abh. Math. Naturwissenschaftlichen Klasse*, **1**, 1-24 (17 tab.).
- GOFFINET, G. (1969) — Étude au microscope électronique de structures organisées des constituants de la conchyoline de nacre du *Nautilus macromphalus* Sowerby. *Comp. Biochem. Physiol.*, **29**, 835-839.
- GOFFINET, G. et JEUNIAUX, Ch. (1969) — Composition chimique de la fraction « nacroïne » de la conchyoline de nacre de *Nautilus pompilius* Lek. *Comp. Biochem. Physiol.*, **29**, 277-282.
- GOFFINET, G. et JEUNIAUX, Ch. (1979) — Distribution et importance quantitative de la chitine dans les coquilles de Mollusques. *Cah. de Biol. Mar.*, **20**, 341-349.
- GRÉGOIRE, Ch. (1972) — Structure of the Molluscan Shell. In : *Chemical Zoology*. M. Florkin et B. T. Scheer, éd. (Academic Press, New York), vol. 7, chap. 2, 45-102.
- IVANOV, A. V. (1964) — *Neopilina* and its significance in the phylogenesis of mollusks. In : *Ref. Zh. Biol.*, n° **11**, D 108.
- JEUNIAUX, Ch. (1958) — Recherches sur les chitinases. I. Dosage néphéломétrique et production de chitinase par des Streptomycètes. *Arch. Internat. Physiol. Bioch.*, **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. *Arch. Internat. Physiol. Bioch.*, **67**, 597-617.
- JEUNIAUX, Ch. (1963) — *Chitine et Chitinolyse, un chapitre de la biologie moléculaire*. Masson éd., Paris, 177 pp.
- JEUNIAUX, Ch. (1965) — Chitine et phylogénie : application d'une méthode enzymatique de dosage de la chitine. *Soc. Chim. Biol. Bull.*, **47**, 2267-2278.

- JEUNIAUX, Ch. (1975) — Principes de Systématique biochimique et application à quelques problèmes particuliers concernant les Aschelminthes, les Polychètes et les Tardigrades. *Cah. Biol. Mar.*, **16**, 597-612.
- LEMCHE, H. (1957) — A new living deep-sea molluse of the cambro-devonian class Monoplacophora. *Nature*, **179**, 413-416.
- LEMCHE, H. (1966) — The place of Mollusca among Invertebrates. *Malacologia*, **5** (1), 7-10.
- MEENAKSHI, V. R., HARE, P. E., WATABE, N., WILBUR, K. M. and MENZIES, R. J. (1970) — Ultrastructure, Histochemistry and Amino Acid composition of the Shell of *Neopilina*. *Sci. Results Southeast Pac. Exped., Anton Bruun report*, **2**, 1-12.
- PETERS, W. (1972) — Occurrence of chitin in Mollusca. *Comp. Biochem. Physiol.*, **41 B**, 541-550.
- POULICEK, M. (1978) — Étude morphologique et chimique comparée de l'évolution régressive de la coquille dans quelques lignées de Gastéropodes Euthyneures. *Mém. de Licence en Sc. Zool.*, 61 pp. (non publié).
- POULICEK, M. et JASPAR-VERSALI, M. F. (1981) — Essai d'interprétation d'un cycle saisonnier de la limaceille chez quelques Pulmonés Limacidae. *Malacologia* (sous presse).
- POULICEK, M. et VOSS-FOUCART, M. F. — Distribution de la chitine dans les structures squelettiques de Mollusques (en préparation).
- REISSIG, J. L., STROMINGER, J. L. and LELOIR, L. F. (1955) — A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.*, **217**, 959-966.
- RICHARDS, A. G. (1951) — *The integument of Arthropods*. Univ. Minnesota Press, Minneapolis, 411 pp.
- SALVINI-PLAWEN, L. von (1980) — A reconsideration of systematics in the Mollusca (Phylogeny and higher classification). *Malacologia*, **19** (2), 249-278.
- YONGE, C. M. (1957) — Reflexions on the Monoplacophoran *Neopilina galatheae* Lemche. *Nature*, **179**, 672-673.