

DISTRIBUTION ET IMPORTANCE QUANTITATIVE DE U CHITINE DANS LES COQUILLES DE MOLLUSQUES

par

Gerhard Goffinet et Charles Jeuniaux

Laboratoires de Morphologie, Systématique et Ecologie animales, Institut Ed. Van Beneden,
et Laboratoires de Biochimie générale et comparée, Institut Léon Fredericq, Université de Liège
(Belgique)

Résumé

1. Au moyen d'une méthode enzymatique hautement spécifique, la chitine a été mise en évidence et dosée chez toute une série de Mollusques, non seulement chez les Céphalopodes et au niveau de structures où sa présence était déjà connue, mais aussi dans la nacre d'autres types de strates calcifiées de la coquille de diverses espèces de Lamellibranches et de Gastéropodes ainsi que, dans certains cas, au niveau des couches de prismes et du périostracum.

2. Le périostracum diffère considérablement, chez les espèces étudiées, sous le rapport de la présence de chitine et de son importance quantitative relative. Par contre, la chitine est toujours présente dans la matrice organique de la nacre, ce qui pourrait confirmer le caractère d'homologie de cette structure à travers le phylum des Mollusques.

3. La participation de la chitine à la constitution de la matrice organique des coquilles de Bivalves peut être interprétée sous l'angle taxonomique ou écologique.

D'un point de vue taxonomique, la constitution chimique du périostracum d'une part est en bon accord avec l'isolement des Nuculidae au sein des Protobranchiés, et avec le regroupement des Arcidae et des Glycimeridae parmi les Filibranchiés Taxodontes. D'autre part, les Adapédontes se caractérisent par une plus forte proportion de chitine dans les strates calcifiées de la coquille que chez les Anisomyaires.

D'un point de vue écologique, c'est chez les espèces fouisseuses (Adapédontes, mais aussi *Venus*, *Arca*, *Glycimeris*) que la chitine est un constituant quantitativement important de la matrice organique du périostracum et/ou des strates calcifiées internes. Chez les espèces fixées ou libres, au contraire, la chitine manque ou n'est présente qu'en faible proportion.

Introduction

On sait depuis longtemps que les Mollusques sont capables de synthétiser la chitine. C'est dans les coquilles internes de divers Céphalopodes (*Sepia*, *Loligo*, *Spinila*) que la présence de chitine fut d'abord démontrée de manière certaine au moyen de méthodes chimiques ou physiques adéquates (Turek, 1933 ; Meyer, 1913, 1942 ; Lotmar et Picken, 1950 ; Rudall, 1955). Elle fut ensuite observée au niveau de la radula et des mâchoires de Gastéropodes (Toth et Zechmeister, 1939 ; Rudall, 1955 ; Runham, 1961).

Plus tard, l'un de nous (Jeuniaux, 1963, 1965) put montrer, grâce à l'utilisation d'une méthode enzymatique spécifique, sensible et quantitative, l'existence de chitine dans les coquilles de Mollusques

appartenant à d'autres classes, à savoir chez l'Amphineure *Acanthochites discrepane* (où la chitine représente 12 p. 100 du poids de la matière organique des cérames), chez les Gastéropodes *Helix pomatia* et *Aplysia depilans* (respectivement 3.0 et 7.17 p. 100 de la matière organique), ainsi que dans le périostracum et le calcitostracum de l'huître *Ostrea edulis*, où la chitine ne représente cependant que 0.58 et 0.26 p. 100 du poids décalcifié.

Plus récemment, Peters (1972) put montrer par le test qualitatif du chitosane, la présence de chitine dans la cuticule de quatre espèces d'Aplacophores.

Etudiant par ailleurs un bon nombre d'espèces de Gastéropodes et de Lamellibranches, cet auteur obtint des résultats variables d'une espèce à l'autre et d'une structure à l'autre ; on doit toutefois tenir compte du caractère peu fiable de la méthode du chitosane employée dans ce cas. Mais Peters put mettre en évidence au microscope électronique, dans les couches calcifiées de plusieurs Prosobranches comme dans le périostracum de deux Pulmonés et de deux Lamellibranches, des microfibrilles correspondant selon toute évidence à des architectures macromoléculaires de nature chitineuse, du type de celles observées par l'un de nous (Goffinet, 1969) dans la nacre du Nautilé.

Notons enfin que la nature chitinoprotéique du bouclier gastrique d'un Lamellibranche et celle des dents géiales d'un Opisthobranche ont pu être confirmées par la méthode enzymatique (Arnould, 1976 ; Arnould et Jeuniaux, 1977). La teneur en chitine y est remarquablement élevée (respectivement 27.7 et 36.6 p. 100 du poids total sec).

Le présent travail présente une série de données quantitatives sur la distribution de la chitine au niveau de diverses strates de la coquille de Mollusques Céphalopodes, Gastéropodes et surtout Lamellibranches. Nous tenterons, par ailleurs, d'y trouver d'éventuels caractères biochimiques taxonomiques. On peut en effet, dans certains cas, utiliser la présence ou l'absence de chitine (c'est-à-dire la propriété de biosynthétiser ce polysaccharide) comme caractère biochimique dans le cadre de considérations d'ordre systématique ou évolutif (Jeuniaux, 1975). Peters (1972) a discuté l'évolution des Mollusques, notamment l'origine de la coquille, à la lumière du critère de la présence de chitine. Nous nous proposons, sur la base de données quantitatives cette fois, de considérer l'intérêt que peut présenter ce caractère biochimique dans le cas des Lamellibranches dont, comme on sait, la systématique et la phylogénie sont périodiquement remises en question à la lumière de caractères nouveaux (Thiele, 1935 ; Abbott, 1954 ; Purchon, 1963 ; Purchon et Brown, 1969).

Matériel et méthodes

a) Dosage enzymatique de la chitine

Les échantillons sont préalablement décalcifiés par HCl 0.5 N à 20°C ; ils sont ensuite traités par NaOH 0.5 N à 100°C pendant 6 heures afin de « démasquer » la chitine de ses complexes glycoprotéiques et de la rendre accessible à l'action des chitinases.

Le principe du dosage consiste à traiter l'échantillon par une solution de chitinase concentrée et hautement purifiée (Jeuniaux, 1963, 1965) à pH 5.2 (tampon acide citrique- Na_2HPO_4 0.1 M) et à 37° C. La chitine est hydrolysée en chitobiose et chitotriose, puis au cours d'une deuxième étape, après addition de chitobiase (sérum de homard dilué 10 fois) en acétylglucosamine que l'on dose par la méthode colorimétrique de Reissig et *al.* (1955).

A partir de la quantité d'acétylglucosamine totale libérée au cours de ces hydrolyses enzymatiques, on exprime les résultats en mg de chitine, en multipliant les valeurs d'acétylglucosamine par le facteur 0.92 (rapport du poids moléculaire d'un résidu d'acétylglucosamine dans la molécule de chitine à celui de l'acétylglucosamine libre).

Les chitinases ont été préparées, isolées et purifiées, suivant les méthodes de Jeuniaux (1958, 1959) à partir des milieux de culture d'une souche de *Streptomyces* sp. (souche G₃), hautement chitinolytique, que nous avons isolée à partir d'un sol de jardin. Cette souche présente, à part l'absence de production de pigment, les mêmes caractéristiques et les mêmes propriétés que celle de *Streptomyces antibioticus* utilisée antérieurement par l'un de nous (Jeuniaux, 1958, 1963).

b) Origine et conservation du matériel

Le matériel étudié provient principalement de Roscoff ou de Wimereux (Manche), à l'exception des spécimens de *Nautilus* et de *Mühlfeldtia*, achetés dans le commerce. Les coquilles ont été prélevées sur des animaux vivants, isolées et soigneusement débarrassées de tissus (muscles ou manteau) ou d'épibiotes. Dans la plupart des cas, elles ont été conservées à sec, sauf dans le cas des lamelles périostracales d'*Ostrea edulis* et de *Mya arenaria* qui ont été conservées au réfrigérateur (0° C) dans de l'eau distillée saturée de thymol. Le périostracum des valves et des siphons de *Barnea candida* et de *Zyrrhaea crispata* a été conservé dans l'alcool 50°.

c) Préparation et pesée du matériel étudié

L'isolement des diverses structures coquillières a été obtenu par divers procédés : meulage, isolement à la pince sous le contrôle de la loupe binoculaire, isolement des strates au cours de la décalcification, etc. Le matériel ainsi isolé est lavé à l'eau distillée et examiné à la loupe binoculaire avant tout traitement chimique, de manière à vérifier sa propreté.

Si le matériel est calcifié, on détermine d'abord le poids sec de deux échantillons de même nature, après dessiccation en étuve à 90° C jusqu'à poids constant. Après décalcification par HCl 0.5 N à la température du laboratoire, un des deux échantillons est lavé à l'eau distillée et séché jusqu'à poids constant en étuve à 90° C pour établir le poids de « matière organique » résiduelle. Le second échantillon est destiné au dosage de la chitine. On en calcule le poids sec de matière organique résiduelle d'après les valeurs obtenues pour l'échantillon précédent.

Si le matériel n'est pas calcifié, il est desséché à l'étuve à 50° C puis en exsiccateur à la température ordinaire en présence de P₂O₅ jusqu'à obtention d'un poids sec constant. Le matériel ainsi séché à basse température est remis ensuite en suspension dans l'eau distillée.

Ces précautions permettent d'éviter le raccornissement de l'échantillon, qui risquerait de compromettre l'hydrolyse rapide et complète du matériel chitineux par les chitinases (Jeuniaux, 1963).

Résultats

Le tableau I regroupe les données relatives à la distribution et à l'importance quantitative de la chitine au niveau de diverses structures des coquilles de Céphalopodes et de Gastéropodes. Le tableau II concerne uniquement les Lamellibranches.

Nous avons dénommé « strates internes » l'ensemble des couches calcifiées débarrassées du périostracum, lorsque les couches n'ont pu être isolées et caractérisées de façon précise.

La chitine est exprimée en mg pour 100 mg de « matière organique » résiduelle, c'est-à-dire de matériel décalcifié. L'importance pondérale de cette fraction organique est indiquée par rapport au poids total (calcifié) du matériel considéré.

Discussion

a) D'après les tableaux I et II, il apparaît que la chitine est présente dans la coquille de toutes les espèces envisagées. Comme nous l'avons montré dans le cas de la nacre du Nautilé (Goffinet et Jeuniaux, 1969), la chitine fait probablement partie de la fraction « conchyoline » de ces coquilles.

Toutefois, la proportion de chitine est souvent très faible (parfois moins de 0.1 p. 100 de la matière organique), ce qui expliquerait, au moins partiellement, les résultats négatifs obtenus par Peters (1972) au moyen du test du chitosane, peu sensible.

L'absence apparente de chitine signalée par cet auteur dans les couches calcifiées de *Glycimeris glycimeris* et de *Mytilus edulis* par exemple, s'explique, d'après nous, par la proportion particulièrement faible de la chitine dans la matière organique de ces structures. Il convient donc de considérer avec prudence les résultats obtenus au moyen du test du chitosane, surtout dans le cas de résultats négatifs.

b) On peut trouver de la chitine au niveau de toutes les structures coquillières, même dans la porcelaine des Nautilés.

La chitine est un constituant permanent de la nacre, qu'il s'agisse de nacre murale ou septale de Céphalopodes Tétrabranchiaux, comme de nacre des coquilles de Gastéropodes ou de Lamellibranches. La présence de chitine dans toutes les nacres étudiées est un argu-

ment supplémentaire en faveur du caractère d'homologie de cette structure coquillière dans tout le phylum des Mollusques.

Par contre, la proportion de chitine est très variable au niveau du périostracum qui peut contenir jusqu'à 7.3 p. 100 de chitine chez un Pholadidae mais peut aussi en être complètement dépourvu, comme chez *Nucula* ou *Mytilus*. Le manque de chitine au niveau du périostracum est toutefois l'exception. Nos résultats, à ce point de vue, confirment donc ceux de Peters (1972).

C'est au niveau de la couche de prismes que la teneur en chitine est systématiquement le plus faible ; nous n'avons d'ailleurs pas pu déceler de chitine dans la couche de prismes de la coquille de *Mytilus*.

TABLEAU I

Distribution et importance quantitative de la chitine au niveau de diverses strates de la coquille de quelques Céphalopodes et Gastéropodes.

Espèces	Nacre		Autres structures	
	Matière organique g/100 g poids total	Chitine, mg/100 mg de matière organique	Matière organique g/100 g poids total	Chitine, mg/100 mg de matière organique
Céphalopodes				
<i>Nautilus pompilius</i>	3. (1)	3.37 (3)		Porcelaine : +(non dosé)
<i>Nautilus macromphalus</i> {	3.24 (1) 2.22 (2)	2.86 (3) 6.34 (2)		
<i>Sepia officinalis</i>	—	—	septa du sépion : 4.65	25.8
<i>Loligo vulgaris</i>	—	—	« plume » : 100	17.9
Gastéropodes				
<i>Haliothis tuberculata</i>	1.63	4.04		
<i>Monodonta lineata</i>	1.42	3.92		
<i>Mühlfeldtia sanguinea</i>	1.05	3.03		

(1) Nacre murale ; (2) nacre septale ; (3) moyenne de deux dosages.

c) La part respective de chaque structure coquillière dans la quantité totale de chitine de la coquille varie donc considérablement d'une espèce à l'autre. Ainsi, chez *Nucula nucleus*, il n'y a pas de chitine dans le périostracum, tandis que cette substance est bien représentée dans la nacre. Par contre, *Arca noe* et *Glycimeris glycimeris* présentent la situation inverse : la proportion de chitine est élevée dans le périostracum (5.58 et 2.76 p. 100) tandis qu'elle est faible dans les strates calcifiées internes (0.25 et 0.64 p. 100 de la matière organique). On ne peut donc se livrer à aucune généralisation quant à la part constitutive que prend la chitine dans la conchyoline des diverses structures coquillières des Lamellibranches.

d) Du point de vue taxonomique, la localisation différente de la chitine dans les structures coquillières est en accord avec l'isolement des Nuculidae au sein des Protobranchiés et le regroupement

TABEAU II
Distribution et importance quantitative de la chitine au niveau de diverses strates
de la coquille de Lamellibranches.

Espèces	Péριοstracum		Nacre		Autres structures	
	mat. org. g/100 g pds total	chitine % mat. org.	mat. org. g/100 g pds total	chitine % mat. org.	mat. org., g/100 g pds total	chitine % mat. org.
PROTOBRANCHIÉS						
<i>Nucula nucleus</i>	100	0	0.63	1.18		
FILIBRANCHIÉS						
Taxodontes :						
<i>Arca noe</i>	51.7	5.52			calcitostracum: 0.14	0.64
<i>Glycimeris glycimeris</i>	93.1	2.76			strates internes: 0.05	0.25
Anisomyaires :						
<i>Mytilus edulis</i>	97.8	0	0.53	0.74	prismes: 0.97	0
<i>Pinctada margaritifera</i>	—	—	1.78	0.17		
<i>Pinctada galstoffi</i>	—	—	1.60	0.19	prismes: 2.17	0.05
<i>Pinna nobilis</i>	1.43	0.33			prismes: 1.65	0.16
<i>Pecten maximus</i>	—	0.96			calcitostracum:	traces
<i>Anomia ephippium</i>					calcitostracum: 0.36	traces
<i>Ostrea edulis</i>	—	0.40-0.58			calcitostracum: —	0.26
EULAMELLI- BRANCHES						
Hétérodontes :						
<i>Venus</i> sp.	80.4	4.31				
<i>Donax vittatus</i>	—	0.14			strates internes: 0.12	0.15
Adapédontes :						
<i>Solen</i> sp.	—	—			strates internes: 0.20	1.25
<i>Mya arenaria</i>	valves: 100 siphons: 100	0.42 1.14			strates internes: 0.16	8.33
<i>Barnea candida</i>	100	7.33				
<i>Zyrphaea crispata</i>	100	5.49			strates internes: 0.17	2.0

des genres *Arca* et *Glycimeris* au sein des Filibranchiés Taxodontes, comme on le proposait naguère.

Les valeurs toujours faibles et parfois nulles de la proportion de chitine, qui caractérisent les différentes structures de la coquille (que ce soit périostacum, prisme, nacre ou calcitostracum) des sept espèces d'Anisomyaires étudiées ici (dix familles) apparaissent comme un argument biochimique confirmant l'homogénéité du sous-ordre des Anisomyaires.

L'homogénéité des Eulamellibranches Adapédontes se marque par l'utilisation de quantités relativement élevées de chitine comme

matériel polysaccharidique associé à la conchyoline, tant au niveau du périostracum qu'au niveau des strates calcifiées internes.

e) L'importance quantitative relative de la chitine dans la coquille des Lamellibranches peut aussi, dans une certaine mesure, être interprétée sous l'angle de considérations écologiques. En effet, les espèces fouisseuses manifestent une tendance assez nette à l'utilisation de quantités relativement élevées de chitine pour l'édification de la trame organique de leur coquille et, plus spécialement, pour la constitution de son revêtement extérieur, le périostracum. C'est le cas de *Glycimeris* et d'*Arca*, ainsi que des Adapédontes en général. Par contre, chez les formes fixées comme *Anomia* ou *Mytilus* ou chez les formes libres comme *Pecten*, la chitine fait défaut ou est utilisée en quantité beaucoup plus faible.

Il est possible que l'augmentation de la proportion de chitine dans les complexes glycoprotéiques qui forment la trame du périostracum soit en relation avec la nécessité fonctionnelle de pallier une usure plus prononcée ou plus rapide chez les formes fouisseuses ou perforantes. Remarquons, à ce propos, que le revêtement externe des siphons de *Lutraria lutraria*, espèce fouisseuse typique, est formé d'un complexe chitino-protéique, dans lequel la teneur en chitine est particulièrement élevée (16 p. 100 dans la couche externe ; 45 p. 100 dans les couches visqueuses internes) (Hunt, 1973).

Conclusion

Sur la base des données quantitatives dont nous disposons actuellement, on peut confirmer que la chitine est un constituant fondamental primitif de la matrice organique de la coquille des Mollusques.

En ce qui concerne les Lamellibranches, on peut tenter de schématiser comme suit les principales tendances évolutives de l'utilisation de la chitine dans l'édification de la charpente organique de la coquille. Partant des Filibranchiés Taxodontes primitifs, chez lesquels la chitine est employée en quantité appréciable dans les diverses structures de la coquille, on constate une restriction de plus en plus marquée de l'utilisation de ce polysaccharide dans la lignée des Anisomyaires (peut-être en rapport avec le mode de vie fixé ou libre). Une tendance évolutive opposée se manifeste chez les Eulamellibranches Adapédontes où, peut-être en relation avec la vie fouisseuse, la proportion de chitine dans les strates coquillières devient plus élevée, notamment au niveau du périostracum et du revêtement cuticulaire des siphons.

Summary

1. The wide distribution of chitin in the shells of Molluscs was confirmed thanks to the application of a quantitative and specific enzymatic method. Chitin was found not only in Cephalopod shells, but also in mother-of-pearl, pseudonacreous layers, and in many cases, in periostracum and prismatic layers of Gastropod and Bivalve shells."

2. The presence and the proportion of chitin are highly variable in the periostracum of the Bivalve species studied so far. On the contrary, **its** permanent presence in the organic matrix, associated with mother-of-pearl, emphasizes the homology of this structure in the whole phylum of Mollusca.

3. The more or less important participation of chitin in the building of the organic matrix of the different shell structures may be related to taxonomic and/or ecological characteristics.

From a taxonomical point of view, on the one hand, chitin distribution is in good agreement with the classification grouping Arcidae and Glycimeridae among the Filibranchia Taxodonta and isolating Nuculidae in the Protobranchia. On the other hand, the lower rate of chitin observed in the inner calcified shell layers of seven species of Anisomyaria and the high chitin rate in those of four species of Adapedonta may be a further indication of the homogeneity of both taxa.

From an ecological point of view, chitin constitutes an important fraction of the shell organic matter in burrowing species, while this polysaccharide is practically lacking or in very low proportions in the shells of fixed or free species.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ABBOTT, R.T., 1954. — American seashells. New York, pp. 332-477.
- ARNOULD, p., 1976. — Chemical composition of the gastric shield of a Bivalve, *Zyrphea crispata*, and of the teeth of the gizzard of a Gastropod Opisthobranch, *Aplysia punctata*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 4, pp. 117-121.
- ARNOULD, F. et JEUNIAUX, CH., 1977. — Caractères morphologiques du revêtement cuticulaire du premier gésier d'*Aplysia punctata* Cuv. (Mollusque Opisthobranch) et homologie avec le bouclier gastrique des Bivalves. *Cah. Biol. Mar.*, 19, pp. 465-473.
- GOFFINET, G., 1969. — Etude au microscope électronique de structures organisées des constituants de la conchioline de nacre de *Nautilus macromphalus* Sowerby. *Comp. Biochem. Physiol.*, 29, pp. 835-839.
- GOFFINET, G. et JEUNIAUX, CH., 1969. — Composition chimique de la fraction « nacroïne » de la conchioline de nacre de *Nautilus pompilius* Lamarck. *Comp. Biochem. Physiol.*, 29, pp. 277-282.
- HUNT, s., 1973. — Chemical and physical studies of the chitinous siphon sheath in the Lamellibranch *Lutraria lutraria* L. and its relationship to the periostracum. *Comp. Biochem. Physiol.*, 45B, pp. 311-323.
- JEUNIAUX, CH., 1958. — Recherches sur les chitinases. I. Méthode néphélométrique et production de chitinase par des Streptomycètes. *Arch. internat. 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. internat. Physiol. Bioch.*, 67, pp. 597-617.
- JEUNIAUX, CH., 1963. — Chitine et chitinolyse. Paris, Masson et Cie éd., 181 pp.
- JEUNIAUX, CH., 1965. — Chitine et phylogénie : application d'une méthode enzymatique de dosage de la chitine. *Soc. Chim. Biol. Bull.*, 47, pp. 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, pp. 597-612.
- LOITMAH, w. et PICKEN, LER., 1950. — A new crystallographic modification of chitin and its distribution, *Experientia*, 6, pp. 58-59.
- MEYER, K.H., 1942. — Natural and synthetic high polymers, Interscience publishers, Inc., New York, 690 pp.
- MEYER, w. TH., 1913. — Tintenfische mit besonderer Berücksichtigung von *Sepia* und *Octopus*. Monographien einheimischer Tiere, W. Klinkhardt ed., Leipzig, 148 pp.
- PETERS, w.p., 1972. — Occurrence of chitin in Mollusca. *Comp. Biochem. Physiol.* 41 (B), pp. 541-550.
- punchON, R.D., 1963. — Phylogenetic classification of the Bivalvia, with special reference to the Septibranchia. *Proceed. Malacological Soc. London*, 35, pp. 71-80.

- PURCHON, R.D. et BROWN, D., 1969. — Phylogenetic interrelationships among families of bivalve Molluscs. *Proc. Third Europ. Malacol. Congr., Malacologia*, 9, pp. 163-171.
- REISSIG, J.L., STROMMINGER, J.L. et LELOIR, L.F., 1955. — A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl-amino-sugars. *J. Biol. Chem.*, 217, pp. 959-966.
- RUDALL, K.M., 1955. — The distribution of collagen and chitin. In « Fibrous Proteins and their Biological Significance ». *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 9, pp. 49-71.
- RUNHAM, N.W., 1961. — Investigations into the histochemistry of chitin. *J. Histochem. Cytochem.*, 9, pp. 87-92.
- THIELE, J., 1935. — Handbuch der Systematischen Weichtierkunde, vol. II, pp. 779-1153.
- TOTH, G. et ZECHMEISTER, L., 1939. — Chitin in *Helix pomatia* mandible. *Nature, Lond.* 144, pp. 1049.
- TUREK, R., 1933. — Chemisch-analytische Untersuchungen an Mollusken Schalen. *Arch. Naturgesch., Neue Folge*, 2 (2), pp. 291-302.