

(Communication présentée le 28 novembre 1964.)

DISTRIBUTION DES CHITINASES CHEZ LES MAMMIFÈRES RONGEURS

par M. FRANKIGNOUL et Ch. JEUNIAUX.

(Institut Léon Fredericq, Biochimie, Université de Liège.)

Résumé. — La distribution de la biosynthèse de la chitinase a été étudiée chez quatre espèces de Rongeurs. C'est la muqueuse gastrique qui est le siège de cette biosynthèse; le pancréas des Rongeurs ne sécrète pas d'enzymes chitinolytiques.

Dans le cas du Rat et de la Souris, la variabilité individuelle peut être réduite au minimum en utilisant des individus de même âge, de même taille et de même sexe, sacrifiés à un même moment par rapport à la distribution du dernier repas.

Parmi les espèces étudiées, seul le Cobaye, végétarien exclusif, ne sécrète pas de chitinase gastrique. Le Hamster, qui est principalement granivore, ne sécrète que de petites quantités de chitinase gastrique, tandis que le Rat Surmulot et la Souris domestique, omnivores, présentent une sécrétion de chitinase gastrique aussi importante que celle que l'on observe chez la plupart des Reptiles, des Oiseaux insectivores et de certains Mammifères Insectivores. Ces observations confirment l'existence d'une corrélation entre la présence de chitinase dans l'équipement enzymatique digestif d'une espèce et le régime alimentaire habituel de cette espèce.

Les recherches de l'un de nous sur la distribution zoologique des enzymes du système chitinolytique ont permis de mettre en évidence l'existence d'une corrélation entre la présence de chitine dans la nourriture habituelle d'une espèce animale et la sécrétion de chitinase par certains tissus du système digestif de cette espèce. Cette observation a été faite aussi bien dans le cas de Vertébrés (JEUNIAUX, 1961, 1962, 1963) que de certains phylums d'Invertébrés, notamment les Arthropodes (JEUNIAUX, 1963). Étant donné que la sécrétion de chitinase a été observée chez beaucoup d'organismes inférieurs (Champignons, Bactéries, Protozoaires, Cnidaires, etc. [cf. JEUNIAUX, 1963]), ces corrélations entre la nature du régime alimentaire et la sécrétion de chitinases ont été interprétées comme le résultat de la perte de la propriété de

synthétiser ces enzymes par les animaux adaptés à des régimes alimentaires spécialisés, dépourvus de chitine (JEUNIAUX, 1963).

Dans le cadre de cette hypothèse, il était intéressant d'étudier la distribution zoologique de la biosynthèse des chitinases à l'intérieur d'une petite entité systématique dont les divers représentants présentent des degrés d'adaptation de plus en plus poussés à un régime alimentaire spécialisé. Nous avons choisi d'étudier à ce point de vue le cas des Mammifères Rongeurs (Ordre des Rodentia).

On sait en effet que les Rongeurs ne sont pas tous exclusivement phytophages; les Souris et les Rats, par exemple, sont franchement omnivores et montrent même une prédilection pour les proies animales, y compris les Insectes (GRASSÉ et DEKEEYSER, 1955). La découverte de la sécrétion de chitinase par la muqueuse gastrique de la Souris domestique, *Mus musculus* L. (JEUNIAUX, 1963) nous a conduit à rechercher la sécrétion de cet enzyme au niveau des organes du système digestif du Rat Surmulot, du Cobaye et du Hamster.

A. — MÉTHODES.

1. Préparation des extraits enzymatiques.

L'animal est anesthésié ou tué par décapitation. Les contenus du tube digestif (chyme gastrique ou intestinal, contenu du caecum) sont recueillis dans un tube gradué puis dilués par de l'eau distillée. Les organes mous, comme le pancréas, sont lavés dans du sérum physiologique de Tyrode, essorés sur papier filtre, pesés, puis homogénéisés au moyen d'un homogénéisateur de Potter en présence d'eau distillée, de telle sorte que la proportion de tissus frais soit de 100 mg/ml de suspension. Quant aux muqueuses gastriques et intestinales, éventuellement débarrassées de leurs tuniques musculaires, elles sont lavées, pesées, puis broyées au mortier en présence de sable lavé; la suspension est additionnée d'eau distillée (poids de tissus frais par ml de suspension : 100 mg). Les extraits sont conservés en glacière pendant 24 heures, puis centrifugés. Les surnageants sont recueillis et conservés dans un congélateur (-15° C) jusqu'au moment du dosage de l'activité enzymatique.

2. Dosage des chitinases.

L'activité chitinolytique des extraits enzymatiques a été dosée par la méthode de JEUNIAUX (1962) consistant à mesurer l'acétylglucosamine libérée à partir d'une suspension de chitine en présence d'un excès de chitobiase (les extraits de tissus des Vertébrés sont pratiquement dépour-

vus de chitobiases, contrairement à ce qui a été constaté (JEUNIAUX, 1961, 1963).

Le milieu réactionnel est constitué de 100 ml de suspension broyée de sépiole de *Squilla* (10 g de sépiole pour 100 ml) broyée de sépiole de *Squilla* (10 g de sépiole pour 100 ml) comme source de chitine. Les prélevements sont effectués à l'heure indiquée. Les enzymes par chauffage sont dosées par la méthode de GRASSÉ (1955).

On exprime l'activité enzymatique en unités par heure et par gramme de tissu.

3. Méthode statistique.

Les valeurs indiquées dans le tableau sont les moyennes des valeurs obtenues pour les différents animaux.

Lorsque l'on dispose de plusieurs valeurs, la moyenne est calculée, ainsi que l'écart-type.

où x est l'activité mesurée, n le nombre de valeurs indiquées.

B. — LOCALISATION

Nous avons mesuré l'activité chitinolytique des extraits de tissus gastriques et intestinaux de l'estomac, du caecum et du colon de nos *Mus musculus* domestiques, élevés et nourris de « composites » pendant quelques heures après leur naissance, semblés dans le tableau.

On voit que les activités chitinolytiques sont élevées dans le chyme intestinal et dans la muqueuse gastrique, ce qui est en accord avec les constatations de GRASSÉ (1955) que des variations de l'activité chitinolytique existent dans le chyme intestinal et dans la muqueuse gastrique.

(*) Les « composites » sont constitués de poudre de soja, de son, de levure de bière et de sucre. On a vérifié qu'ils ne contiennent pas de chitine.

adaptés à des régimes
tine (JEUNIAUX, 1963).
ait intéressant d'étudier
se des chitinases à l'in-
ont les divers représen-
de plus en plus poussés
avons choisi d'étudier
es Ronceurs (Ordre des

ont pas tous exclusive-
par exemple, sont fran-
ne prédilection pour les
GRASSÉ et DEKEEYSER,
itinase par la muqueuse
musculus L. (JEUNIAUX,
étion de cet enzyme au
du Rat Surmulot, du

ion. Les contenus du tube
du caecum) sont recueil-
eau distillée. Les organes
sérum physiologique de
homogénéisés au moyen
d'eau distillée, de telle
100 mg/ml de suspension.
es, éventuellement débar-
sont lavées, pesées, puis
; la suspension est addi-
par ml de suspension :
cière pendant 24 heures,
llis et conservés dans un
dosage de l'activité enzy-

tiques a été dosée par la
esurer l'acétylglucosamine
n présence d'un excès de
sont pratiquement dépour-

vus de chitobiases, contrairement à ceux des Invertébrés : cf. JEUNIAUX, 1961, 1963).

Le milieu réactionnel se compose de 1 ml de suspension de chitine broyée de sépion de Seiche, 1 ml de tampon (acide citrique 0,6 M - Na₂ HPO₄ 1,2 M de pH 5), 1 ml de β-glucosidase N.B.Co (30 mg/100 ml) comme source de chitobiase et 1 ml d'extrait enzymatique. Trois prélèvements sont effectués après 0, 90 et 180 minutes; on inactive les enzymes par chauffage à 100° C. L'acétylglucosamine libérée est mesurée par la méthode colorimétrique de REISSIG, STROMINGER et LELOIR (1955).

On exprime l'activité des chitinases en μg de chitine hydrolysée par heure et par gramme de tissus frais.

3. Méthode statistique.

Les valeurs indiquées dans les tableaux constituent des valeurs individuelles obtenues pour un seul extrait.

Lorsque l'on dispose d'au moins trois valeurs individuelles, la moyenne est calculée, ainsi que l'erreur standard, par la formule

$$S = \pm \cdot \sqrt{\frac{\sum (x - m)^2}{n (n - 1)}}$$

où x est l'activité mesurée, m , la moyenne des résultats obtenus et n , le nombre de valeurs individuelles.

B. — LOCALISATION DE LA SÉCRÉTION DE CHITINASE CHEZ LA SOURIS ET VARIABILITÉ INDIVIDUELLE.

Nous avons mesuré l'activité chitinolytique de différents extraits de tissus glandulaires du système digestif et des contenus de l'estomac, de l'intestin et du caecum chez des souris albinos (*Mus musculus* L.) élevées en laboratoire; les souris étaient nourries de « composés pour rongeurs » (*) et ont été sacrifiées quelques heures après leur dernier repas. Les résultats sont rassemblés dans le tableau I.

On voit que les chitinases sont sécrétées uniquement par la muqueuse gastrique. L'activité de ces enzymes persiste encore dans le chyme intestinal et même dans le bol caecal. On remarque des variations individuelles assez sensibles.

(*) Les « composés pour rongeurs » achetés dans le commerce, sont constitués de poudre de lait écrémé, de diverses farines de céréales, de soya, de son, de levure et de farine de viande et de poisson. Nous avons vérifié qu'ils ne contiennent pas la moindre trace de chitine ni de chitobiose

TABLEAU I. — Localisation de l'activité chitinolytique dans le système digestif de la Souris *Mus musculus* L.

Echantillon n°	Activité chitinolytique				
	en μg chitine/h/g tissu			en μg chitine/h/ml contenu	
	muqueuse gastrique	pancréas	muqueuse duodénale	contenu de l'intestin grêle	contenu du caecum
1 (1)	4.850	0	0	—	—
2 (1)	3.890	0	0	—	—
3 (2)	2.160 \pm 129	0	—	511 \pm 72	388 \pm 62

(1) Résultats individuels (adultes).

(2) Moyenne des résultats obtenus pour trois individus jeunes.

Nous avons cherché dans quelle mesure la variabilité individuelle pouvait être réduite en travaillant dans des conditions plus précises; six souris adultes de même sexe (mâles) et de même âge (quatre mois) ont été tuées par décapitation, exactement trois heures après la distribution d'un dernier repas. Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau II.

TABLEAU II. — Chitinase gastrique de la Souris : variabilité individuelle.

Individu	Activité chitinolytique	
	Extraits aqueux de muqueuse gastrique (1)	Contenu de l'estomac (2)
1	4.166	0
2	3.515	117
3	4.256	73
4	3.808	44
5	3.405	28
6	3.942	295

(1) en μg chitine/h/g de tissus.

(2) en μg chitine/h./contenu total de l'estomac.

Le tableau II montre que l'activité chitinolytique des contenus

de l'estomac est assez variable, mais reste dans des limites relativement étroites. Les contenus prélevés dans des conditions de jeûne, de même âge, de même sexe, par rapport au dernier

C. — VARIATION DE L'ACTIVITÉ CHITINOLYTIQUE AU MOMENT DU MOMENT DE LA DISTRIBUTION DU REPAS

Chez le Rat *Sturnus vulgaris*, le seul tissu où l'activité chitinolytique est la plus élevée, les muqueuses salivaires, de pancréas et de duodénum, ont aucune activité chitinolytique. Les extraits de muqueuse gastrique ont une teneur en chitinase qui varie avec le temps. Quatre rats adultes, de même âge, de même sexe, pendant 24 heures, puis sacrifiés, ont été étudiés. Les résultats sont résumés dans le tableau III.

TABLEAU III. — Sécrétion de chitinase au moment de la distribution du repas.

Délai après le dernier repas	Muqueuse gastrique
3 h	—
3 h	—
18 h	—
24 h	—

(1) en μg chitine hydrolysée/h/g de tissu.

(2) en μg chitine hydrolysée/h./contenu total de l'estomac.

On voit que la teneur en chitinase varie relativement peu au cours des quelques heures qui suivent le jeûne. On observe

activité chitinolytique
Mus musculus L.

activité
en μg chitine/h/ml contenu

contenu de l'intestin grêle	contenu du caecum
—	—
511 \pm 72	388 \pm 62

individus jeunes.

re la variabilité individuelle dans des conditions de même sexe (mâles) et de même âge, par décapitation, exacte-ment d'un dernier repas. Les résultats sont dans le tableau II.

activité de la Souris :
le.

activité chitinolytique	Contenu de l'estomac (2)
0	
117	
73	
44	
28	
296	

activité chitinolytique des contenus

de l'estomac est assez variable. Par contre, la concentration intracellulaire en chitinase des muqueuses gastriques ne varie que dans des limites relativement étroites, lorsque les organes sont prélevés dans des conditions aussi semblables que possible (animaux de même âge, de même sexe, sacrifiés au même moment par rapport au dernier repas).

C. — VARIATION DE LA SÉCRÉTION DE CHITINASE EN FONCTION DU MOMENT DU REPAS, CHEZ LE RAT SURMULOT.

Chez le Rat Surmulot (*Rattus norvegicus* L.), comme chez la Souris, le seul tissu du système digestif capable de sécréter des chitinases est la muqueuse gastrique; des extraits de glandes salivaires, de pancréas et de muqueuse duodénale ne révèlent aucune activité chitinolytique. Nous avons recherché si les extraits de muqueuse gastrique présentent des variations de teneur en chitinase au cours du temps, d'un repas à l'autre. Quatre rats adultes, de même âge, sont privés de nourriture pendant 24 heures, puis nourris pendant 1 heure. Les quatre individus sont sacrifiés après des laps de temps différents. Le tableau III résume les résultats obtenus.

TABLEAU III. — Sécrétion de chitinase gastrique par rapport au moment du repas chez le Rat Surmulot.

Délai après le dernier repas	Activité chitinolytique	
	Muqueuse gastrique (1)	Contenu de l'estomac (2)
3 h	1.029	3.422
3 h	1.060	1.746
18 h	1.808	578
24 h	1.779	118

(1) en μg chitine hydrolysée/h/g tissu.

(2) en μg chitine hydrolysée/h/contenu total de l'estomac.

On voit que la teneur en chitinase de la muqueuse gastrique varie relativement peu. Elle semble plus basse pendant les quelques heures qui suivent le repas et augmente pendant le jeûne. On observe des variations en sens opposé et de plus

grande amplitude au niveau du chyme gastrique : l'activité chitinolytique est très élevée peu après le repas (période de digestion) puis diminue progressivement au fur et à mesure que l'estomac se vide. Ces résultats peuvent s'interpréter en admettant que la prise de nourriture provoque une abondante sécrétion de chitinase dans la lumière de l'estomac.

D. — DISTRIBUTION ET LOCALISATION DE LA CHITINASE
CHEZ QUATRE ESPÈCES DE RONGEURS.

Nous avons complété l'étude de la distribution de la chitinase chez les Rongeurs en examinant deux autres espèces : le Hamster (*Cricetus frumentarius* PALLAS) et le Cobaye (*Cavia porcellus* L.).

TABLEAU IV. — Localisation et activité des chitinases
du système digestif chez quelques Rongeurs.

Espèce	Alimentation en captivité	Activité chitinolytique en µg de chitine hydrolysée/h/g tissu frais			
		glandes salivaires	muqueuse gastrique	pancréas	muqueuse duodénale
<i>Mus musculus</i> L. adultes jeunes	Nourriture composée pr rongeurs.	—	3848±140	—	—
		—	2160±129	0	0
<i>Rattus norvegicus</i> L. albinos (1) sauvage (2)	Nourriture composée pr rongeurs. Jambon et fromage.	0	961± 84	0	—
		—	2087	0	0
<i>Cricetus frumentarius</i> PALLAS	Céréales	—	123	0	—
<i>Cavia porcellus</i> L.	Légumes verts.	—	0	0	—

(1) Elevé en laboratoire.

(2) Individu sauvage, conservé 48 h en captivité.

Nous inspirant de
et la Souris (voir c
animaux adultes de
après le début du
donc comparables à
sont réunis dans le

On voit que l'acti
muqueuses gastrique
est du même ordre
plupart des Reptile
Souris et le Hérisse
peu moins élevée ch
aqueux de muqueu
qu'une faible activi
que chez le Rat e
dépourvu de toute

E. —

L'examen du tabl
tation : chez les l
capable d'opérer la
à d'autres Mammif
1961, 1962), les R
créatique.

Si on compare l'
trique des différent
spécifiques importa
le Rat Surmulot qu
alimentaire omnivo
particulièrement bi
le Hamster, qui es
quantités de chitin
rien, il ne semble
tinolytiques au ni
relation entre l'équ
et la nature du r
JEUNIAUX (1962, 19
tébrés supérieurs à
tophage a entraîné
enzymes chitinolyt

gastrique : l'activité
 le repas (période de
 au fur et à mesure
 peuvent s'interpréter en
 provoque une abondante
 de l'estomac.

N DE LA CHITINASE
 RONGEURS.

distribution de la chi-
 deux autres espèces :
 (s) et le Cobaye (*Cavia*

tivité des chitinases
 ues Rongeurs.

é chitinolytique
 hydrolysée/h/g tissu frais

	pancréas	muqueuse duodénale
40	—	—
29	0	0
84	0	—
	0	0
	0	—
	0	—

cé.

Nous inspirant des résultats des analyses faites sur le Rat et la Souris (voir ci-dessus), nous avons veillé à utiliser des animaux adultes de sexe mâle, sacrifiés environ trois heures après le début du dernier repas. Les résultats obtenus sont donc comparables à ceux obtenus pour le Rat et la Souris. Ils sont réunis dans le tableau IV.

On voit que l'activité chitinolytique des extraits aqueux de muqueuses gastriques est élevée dans le cas de la Souris; elle est du même ordre de grandeur que celle observée chez la plupart des Reptiles, les Oiseaux insectivores, les Chauves-Souris et le Hérisson (JEUNIAUX, 1962, 1963). Elle semble un peu moins élevée chez le Rat Surmulot. Par contre, les extraits aqueux de muqueuse gastrique du Hamster ne présentent qu'une faible activité chitinolytique, 10 à 30 fois plus faible que chez le Rat et la Souris; quant au Cobaye, il semble dépourvu de toute trace de chitinase gastrique.

E. — DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

L'examen du tableau IV nous amène à une première constatation : chez les Rongeurs, seule la muqueuse gastrique est capable d'opérer la biosynthèse de la chitinase. Contrairement à d'autres Mammifères comme la Taupe ou le Porc (JEUNIAUX, 1961, 1962), les Rongeurs ne sécrètent pas de chitinase pancréatique.

Si on compare l'activité chitinolytique de la muqueuse gastrique des différents Rongeurs étudiés, on note des variations spécifiques importantes. Il est remarquable que la Souris et le Rat Surmulot qui, du moins à l'état sauvage, ont un régime alimentaire omnivore et même partiellement insectivore, sont particulièrement bien équipés pour digérer la chitine alors que le Hamster, qui est surtout granivore, n'élabore que de petites quantités de chitinase. Quant au Cobaye, strictement végétarien, il ne semble pas capable de synthétiser des enzymes chitinolytiques au niveau de la muqueuse gastrique. Cette corrélation entre l'équipement enzymatique digestif des Rongeurs et la nature du régime alimentaire confirme l'hypothèse de JEUNIAUX (1962, 1963), qui considère que l'adaptation des Vertébrés supérieurs à un régime alimentaire exclusivement phytophage a entraîné la perte de la capacité de synthétiser des enzymes chitinolytiques, notamment au niveau de la muqueuse

gastrique. Cette corrélation ne semble pas résulter d'une adaptation métabolique (au sens de KNOX). En effet, la modification du régime alimentaire du Rat, de la Souris ou du Hamster, par incorporation de chitine ou par suppression complète de cette substance dans la diète ne modifie pas la sécrétion de chitinase gastrique, même après plusieurs mois d'expérience (JEUNIAUX et FRANKIGNOUL, inédit).

SUMMARY.

The distribution of chitinase secretion has been studied in four species of Rodents. The biosynthesis of this enzyme is only performed by the gastric mucosa; the pancreas seems to be unable to secrete chitinase, as far as Rodents are concerned.

In the cases of the Rat and the Mouse, the individual variability may be reduced to a minimum by using animals of the same age, sex and size, sacrificed at the same moment with respect to the last meal.

Among the species so far studied, the Guinea-pig is the only one which does not secrete a gastric chitinase. The Hamster secretes only small amounts of chitinase, while Rats and Mice, which are omnivorous, exhibit an important gastric chitinase secretion. In the latter animals, the chitinase contents of the gastric mucosa are as high as in some Reptiles or insectivorous Birds.

These observations confirm the existence of a correlation between the ability of a given species to synthesize chitinase and the feeding habits of this species.

BIBLIOGRAPHIE.

- GRASSE, P. P. et DEKEEYSER, P. L. (1955). — Ordre des Rongeurs, in GRASSE, P. P., *Traité de Zoologie*, Tome XVII, 1320-1525.
- JEUNIAUX, Ch. (1961). — Chitinase, an addition to the list of hydrolases in the digestive tract of Vertebrates. *Nature*, **192**, 135-136.
- JEUNIAUX, Ch. (1962). — Digestion de la chitine chez les Oiseaux et les Mammifères. *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.*, **92**, 27-45.
- JEUNIAUX, Ch. (1963). — *Chitine et chitinolyse, un chapitre de biologie moléculaire*. Masson et Cie, édit., Paris, 181 pp.
- REISSIG, J. L., STROMINGER, J. L. and LELOIR, L. F. (1955). — A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamine sugars. *J. Biol. Chem.*, **217**, 959.

COMPOSITION CHIMIQUE (*SIBOGLINUM* SP.) ET DETERMINATION

M. F. FOUCHER
Institut

The chemical composition of the chitinase from *Siboglinum sp.* and *Rhodospirillum rubrum* was determined quantitatively.

The tubes of *Siboglinum sp.* and *Rhodospirillum rubrum* are probably of the same origin. The amino acid composition suggests that the composition is very different from that of the other chitinases.

On the contrary, the coenzyme B₁₂ content of the tubes of the two species is the same. The amounts of proteins are much higher in the tubes of *Siboglinum sp.* than in those of *Rhodospirillum rubrum*. The proportion of glycine (35 % of the total amino acids) is also higher.

La composition chimique de la chitinase de *Siboglinum sp.* et de *Rhodospirillum rubrum* a été déterminée quantitativement.

Les tubes de ces deux espèces sont probablement d'origine commune. La composition en acides aminés suggère que la composition est très différente de celle des autres chitinases. Au contraire, la teneur en coenzyme B₁₂ des tubes des deux espèces est la même. Les quantités de protéines sont beaucoup plus élevées dans les tubes de *Siboglinum sp.* que dans ceux de *Rhodospirillum rubrum*. La proportion de glycine (35 % des acides aminés totaux) est également plus élevée.

Récemment RUDALL (1962) a pu confirmer ces résultats. La teneur en coenzyme B₁₂ de la fraction des rayons X caractéristique de *Siboglinum sp.* est la même que celle de *Rhodospirillum rubrum*.

Chez les Pogonophores, la teneur en coenzyme B₁₂ des tubes de quatre espèces de *Siboglinum* (1962) a pu confirmer ces résultats.

CARLISLE (1964), par une méthode plus récente, a pu confirmer ces résultats. La teneur en coenzyme B₁₂ de la fraction des rayons X caractéristique de *Siboglinum sp.* est la même que celle de *Rhodospirillum rubrum*.

On voit que la nature de la chitinase est pratiquement inconnue. Q

¹ Contribution de la Station