

Reçu le 30 mars 1973.

ACTIVITÉS DES CHITINASES GASTRIQUES DE REPTILES EN FONCTION DU PH

PAR

J. C. MICHA, G. DANDRIFOSSE et CH. JEUNIAUX
(Université de Liège, Institut Ed. Van Beneden, Laboratoires de Morphologie,
Systématique et Ecologie animales et Institut L. Fredericq,
Laboratoire de Biochimie générale et comparée).

(2 figures)

INTRODUCTION

Chez les Invertébrés, les chitinases de toutes les espèces étudiées jusqu'ici présentent un pH optimum compris entre 4.7 et 5.4, et leur courbe d'activité en fonction du pH se caractérise par une pente accusée du côté des pH inférieurs au pH optimum, ce qui traduit une inhibition marquée en milieu acide (KARRER & HOFMANN, 1929; HACKMAN, 1954; JEUNIAUX, 1955 *a* & *b*, 1961-1962, 1963 *b*; JEUNIAUX & AMANIEU, 1955; WATERHOUSE *et al.*, 1961). A pH 3.0, ces enzymes sont complètement inactifs.

Chez certains Vertébrés (Reptiles, Mammifères), par contre, l'activité des chitinases gastriques est toujours très élevée à pH 2.0 (65 % de l'activité maximum) (JEUNIAUX, 1961-1962, 1963 *a* & *b*). Il semble que cette propriété particulière des chitinases gastriques puisse être mise en rapport avec les caractéristiques du milieu (chyme gastrique) dans lequel ces enzymes exercent leur activité catalytique (JEUNIAUX, 1961-1962, 1963 *a* & *b*).

Afin de vérifier la généralité de cette hypothèse, nous nous sommes proposés d'étudier l'activité des chitinases en fonction du pH chez de nombreuses espèces de Vertébrés (JEUNIAUX *et al.*, 1973). Dans ce but, nous avons cherché à mettre au point une méthode d'application plus générale que la méthode néphéломétrique employée par

Enzymes : Poly(1,4- β -(2-acetamido-2-deoxy-D-glucoside)) glycanohydrolase ou chitinase (E.N. 1972, 3.2.1.14); Chitobiase acetamido-deoxyglucohydrolase ou chitobiase (E.N. 1969, 3.2.1.29) défini maintenant comme 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucoside acetamidodeoxyglucohydrolase ou β -N-acetylglucosaminidase (E.N. 1972, 3.2.1.30).

l'un de nous (JEUNIAUX, 1961-1962) pour mesurer l'activité des chitinases. Cette méthode néphéломétrique ne s'applique en effet qu'à l'étude de solutions enzymatiques limpides, ne se troublant pas au cours de l'incubation. Elle ne permet pas le dosage rigoureux de faibles activités chitinolytiques. Elle est donc souvent inutilisable dans le cas des extraits d'organes de Vertébrés.

Une méthode plus adéquate est décrite dans la présente publication, et est appliquée à l'étude des propriétés des chitinases gastriques de deux espèces de Reptiles : *Lacerta viridis* L. et *Clemmys caspica leprosa* L.

MÉTHODE POUR LA MESURE DE L'ACTIVITÉ DES CHITINASES EN FONCTION DU PH

1. — Principe.

On mesure souvent l'activité des chitinases en dosant la quantité de *N*-acétyl-D-glucosamine (ou 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose = AG) libérée par unité de temps à partir d'une suspension de chitine comme substrat. Or, on sait que l'hydrolyse enzymatique de la chitine en AG nécessite l'intervention de deux hydrolases : une chitinase et une chitobiase.

Lorsque les solutions enzymatiques étudiées ne contiennent que peu ou pas de chitobiase, comme dans le cas de la plupart des extraits d'organes de Vertébrés (JEUNIAUX, 1961), la méthode décrite ci-dessus peut être utilisée pour mesurer l'activité de la chitinase, à condition d'ajouter de la chitobiase au milieu réactionnel (JEUNIAUX, 1961 & 1963b) et de mesurer l'activité à un pH voisin du pH optimum des deux enzymes, soit pH 5.0.

Lorsqu'il s'agit d'étudier l'influence du pH sur l'activité de la chitinase, la réaction d'hydrolyse de la chitine en AG doit au contraire se faire en 2 étapes.

Au cours de la première étape, la chitine est soumise à l'action des chitinases contenues dans les extraits enzymatiques à différents pH. Après une certaine période d'incubation, on inactive les enzymes par chauffage à 100 °C et on sépare par centrifugation le matériel insoluble de la solution surnageante contenant les produits de la réaction enzymatique, principalement chitobiose et chitotriose.

Au cours de la seconde étape, le pH des solutions surnageantes est amené au pH 5.3, pH optimum de la chitobiase ; on ajoute de la chi-

tobiase et on incube à 37 °C jusqu'à hydrolyse complète du chitobiose et du chitotriose. L'AG libérée est mesurée par la méthode de REISSIG *et al.* (1955).

2. — Procédé.

1^{re} étape :

Dans un tube à réaction, on introduit 1 ml d'une suspension de chitine « native » (5 mg/ml) préparée à partir de sépions de seiche *Sepia officinalis*, 2 ml d'extrait enzymatique et 1 ml de tampon. Les solutions tampons utilisées sont les suivantes :

- pour les pH compris entre 1 et 3.5 : HCl 0.6 N-citrate Na 0.4 M;
- pour les pH compris entre 3.8 et 7.0 : Acide citrique 0.4 M-
Na₂HPO₄ 0.8 M;
- pour les pH compris entre 7.0 et 10.0 : Acide citrique 0.4 M-
NaOH 0.6 N.

Les milieux réactionnels sont incubés à 37 °C. Ils sont agités toutes les quinze minutes de manière à remettre la chitine en suspension. Après 0, 60 et 120 minutes d'incubation, on prélève 1 ml de ces milieux qu'on transvase dans 1 ml d'eau distillée ; après inactivation des enzymes par chauffage à 100 °C pendant 10 min, les suspensions sont centrifugées, le surnageant est recueilli et le pH est vérifié.

2^e étape :

Dans un tube à centrifuger, on mélange 1 ml du liquide surnageant à 1 ml d'une solution tampon de pH 5.3 (0.3 M en acide citrique, 0.6 M en Na₂HPO₄) et 2 ml d'une solution contenant de la chitobiase (sérum de homard, dilué 10 fois). Après 1 heure et 2 heures d'incubation, on inactive 2 ml de milieu réactionnel par chauffage à 100 °C pendant 10 minutes. Après centrifugation, on mesure la concentration en AG des liquides surnageants suivant la méthode de REISSIG *et al.* (1955). Le pH des milieux réactionnels est systématiquement vérifié. Il est toujours compris entre 4.95 et 5.45, valeurs voisines du pH optimum des chitobiases (JEUNIAUX, 1963 b).

3. — Préparation des extraits.

Les extraits sont préparés suivant la méthode décrite précédemment (MICHA *et al.*, 1973).

4. — Mode d'expression des activités chitinolytiques.

L'activité chitinolytique est exprimée en μg d'AG libérée $\times \text{h}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ de milieu réactionnel. L'activité chitinolytique est ensuite rapportée à l'unité de poids de tissus frais et exprimée en μg d'AG libérée $\times \text{h}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ de tissu frais.

RÉSULTATS

1. — Contrôle de la méthode utilisée.

La méthode décrite ci-dessus n'est applicable que si les conditions générales décrites par JEUNIAUX (1963, b) pour la méthode de mesure de l'activité des chitinases par dosage de l'AG sont respectées. Nous avons notamment veillé à maintenir la concentration en citrate des solutions dans lesquelles la concentration d'AG est mesurée, à une valeur voisine de 0.07 M.

Nous avons successivement vérifié que :

- 1) Les produits d'hydrolyse partielle de la chitine par la chitinase sont stables à 100 °C pendant 10 minutes, quel que soit le pH de la réaction;
- 2) que la chitine n'est pas partiellement hydrolysée à pH 2.0 en l'absence de chitinase;
- 3) que les oligomères résultant de l'hydrolyse de la chitine par la chitinase sont complètement hydrolysés en AG par la chitobiase;
- 4) que l'AG n'est pas métabolisée au cours des réactions enzymatiques.

Les résultats obtenus montrent que :

1) les chitodextrines et autres produits d'hydrolyse partielle de la chitine ne sont pas hydrolysés par chauffage à 100 °C en milieu acide. En effet, le milieu réactionnel amené à pH 5.0 avant inactivation à 100 °C libère la même quantité d'AG sous l'action ultérieure de la chitobiase que le milieu maintenu à pH 2.0, les différences observées n'étant pas significatives (tableau I).

2) la chitine incubée en l'absence d'extraits enzymatiques ne libère pratiquement pas de chitobiose ou de chitotriose à pH 2.0 pas plus qu'à pH 5.0 (tableau I) : en effet, après la seconde étape d'incubation (hydrolyse du chitobiose et du chitotriose par la chi-

TABLEAU I. Stabilité de la chitine et de ses produits d'hydrolyse enzymatique à 37 °C ou à 100 °C, à différents pH.

Chitine «native»	Solution enzymatique (extrait de muqueuse gastrique de lézard, 0.1 g de tissu frais/ml)	pH du milieu d'incubation	Chauffage à 100 °C (10 min)	Quantité d'AG libérée (mg) en 1 h d'incubation (¹)
5 mg	—	5	à pH 5	0.003
5 mg	—	2	à pH 2	0.005
5 mg	1 ml	2	à pH 2	1.261
5 mg	1 ml	2	à pH 5	1.278

(¹) Après hydrolyse du chitobiose et du chitotriose par la chitobiase, à pH 5.2

tobiase), il n'apparaît que très peu d'AG dans les liquides surnageants. Les différences entre les valeurs obtenues à pH 2 et à pH 5 ne sont pas significatives.

3) le chitobiose et le chitotriose, résultant de l'hydrolyse de la chitine par les chitinases, sont totalement dégradés en AG au cours de la seconde étape du dosage (tableau II) : les quantités d'AG libérées par la chitobiase après 1 heure et 2 heures d'incubation sont égales, les différences observées n'étant pas significatives.

TABLEAU II. Activité de la chitinase gastrique de *Lacerta viridis* en fonction du pH.

Première étape d'incubation (chitinase)	Seconde étape d'incubation (chitobiase)	Valeurs réelles du pH des milieux réactionnels		Quantité d'AG libérée : $\mu\text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}$ de tissus frais
		1 h d'incub. en présence de chitobiase	2 h d'incub. en présence de chitobiase	
1.3	4.95	12 500	12 380	
2.3	5.0	13 292	13 162	
3.1	5.05	14 034	13 950	
4.05	5.1	10 320	10 128	
5.1	5.15	10 208	9 870	
6.15	5.2	8 832	8 810	
7.05	5.3	5 696	5 640	
7.4	5.4	4 444	4 386	

Voir explications dans le texte.

4) si l'on ajoute de l'acétylglucosamine dans les extraits enzymatiques ou dans le sérum du sang du homard, on ne constate pas de modifications de la concentration de cette substance pendant une incubation de 60 ou 120 minutes à 37 °C, que les milieux réactionnels soient tamponnés à pH 2.0 ou à pH 5.0. L'AG n'est donc pas métabolisée dans les conditions expérimentales que nous avons choisies.

2. Effet du pH sur l'activité des chitinases gastriques de Reptiles.

L'activité en fonction du pH des chitinases contenues dans les extraits de muqueuse gastrique de *Lacerta viridis* et *Clemmys caspica leprosa*, mesurée au moyen de la méthode décrite ci-dessus, est présentée dans les figures 1 et 2.

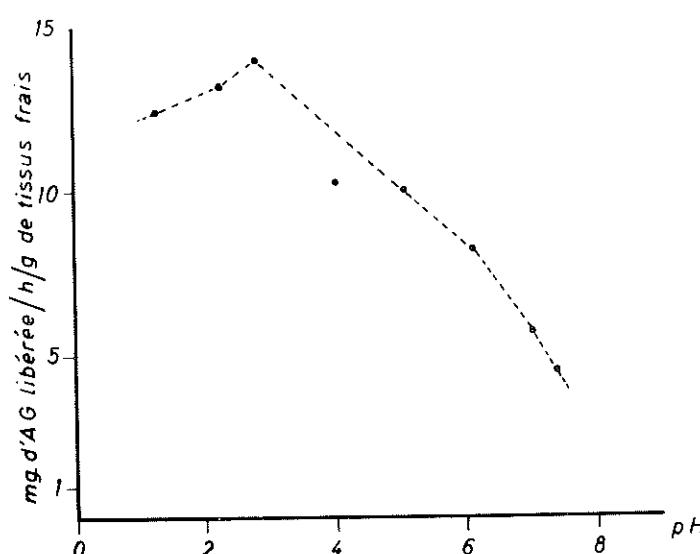


FIG. 1. Activité, en fonction du pH, des chitinases gastriques de *Lacerta viridis* L.

Les chitinases gastriques de ces deux espèces présentent un pH optimum voisin de 3 et une courbe d'activité en fonction du pH ayant une pente peu accusée du côté des pH inférieurs au pH optimum et plus accusée du côté des pH supérieurs à celui-ci. A pH 2.3, par exemple, l'activité des chitinases est très élevée (75 % de l'activité maximum) et est nettement supérieure à celle mesurée à pH 6.0.

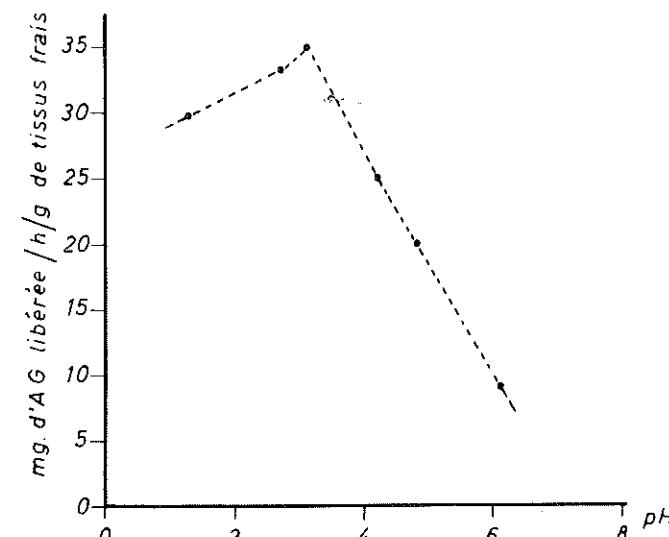


FIG. 2. Activité, en fonction du pH, des chitinases gastriques de *Clemmys caspica* L.

DISCUSSION ET CONCLUSION

La méthode d'estimation de l'activité des chitinases en fonction du pH, que nous proposons, est basée sur la mesure de la quantité de chitobiose et de chitotriose libérés à partir de chitine « native », indépendamment de l'influence du pH sur l'activité de la chitobiase, qui permet la libération de l'acétylglucosamine. Cette méthode est sensible et spécifique, et permet une estimation rigoureuse du pH optimum des chitinases. Nous avons montré que, dans nos conditions expérimentales, la chitine n'est pas hydrolysée à pH 2.0 en l'absence d'enzyme, que les produits d'hydrolyse partielle de la chitine ne sont pas influencés par un chauffage à 100 °C pendant 10 minutes à pH 2.0, que le chitobiose et le chitotriose sont complètement hydrolysés par la chitobiase en AG et que cette dernière substance n'est pas métabolisée.

Au moyen de cette méthode, nous avons observé que le pH optimum des chitinases gastriques de deux reptiles est voisin de 3.0, et que l'activité reste très élevée entre pH 3.0 et pH 1.0.

Ces résultats diffèrent de ceux obtenus antérieurement par l'un de nous (JEUNIAUX, 1961-1962, 1962, 1963 a & b) pour les chitinases gastriques de Reptiles *Lacerta viridis* et *Emys orbicularis*, et

du hérisson *Erinaceus europaeus*, dont l'activité avait été mesurée à l'aide d'une méthode néphéломétrique. Cette méthode, consistant à mesurer directement la quantité de chitine hydrolysée, permettait également d'éviter l'interférence de la réaction due à la chitobiase. La différence principale entre les résultats obtenus concerne la valeur du pH optimum, voisin de 5.0 d'après JEUNIAUX (1961-1962, 1963 a & b) au lieu de 3.0 d'après les résultats présentés ici.

Il n'est pas exclu que cette différence puisse être attribuée au fait que le substrat utilisé pour la méthode néphéломétrique est une suspension de chitine colloïdale, préparée par dissolution de chitine purifiée dans $H_2 SO_4$ 18N et reprécipitation dans l'eau. Il est toutefois plus vraisemblable que ces différences sont dues aux limites de précision et de sensibilité de la méthode néphéломétrique : cette méthode permet difficilement de mesurer les faibles différences d'activité des chitinases gastriques entre pH 3.0 et 5.0. Elle confirme cependant que la chitinase gastrique est peu inhibée dans la zone comprise entre pH 2.0 et 4.0. Pour une mesure rigoureuse du pH optimum, la méthode décrite dans le présent travail nous paraît certainement préférable.

Par rapport aux chitinases des Invertébrés étudiées jusqu'ici, les chitinases gastriques des Reptiles sont donc mieux adaptées au milieu acide du chyme gastrique, où elles sont capables d'assurer l'hydrolyse de la chitine avec une activité maximum.

RÉSUMÉ

L'activité des chitinases gastriques de deux espèces de Reptiles, *Lacerta viridis* et *Clemmys caspica*, a été mesurée en fonction du pH suivant une méthode évitant l'interférence possible entre la réaction des chitinases et celle de la chitobiase. Ces chitinases gastriques ont un pH optimum voisin de 3.0 et une courbe d'activité en fonction du pH se caractérisant par une pente peu accusée du côté des pH inférieurs au pH optimum. La valeur du pH optimum est différente de celle rapportée précédemment par Jeuniaux, qui étudiait ce problème en utilisant une méthode néphéломétrique ; cette différence entre les résultats obtenus est discutée.

Les chitinases gastriques des Reptiles sont bien adaptées au milieu acide du chyme gastrique où elles peuvent hydrolyser la chitine avec une activité maximum.

SUMMARY

The activity of the gastric chitinases of two species of Reptiles *Lacerta viridis* and *Clemmys caspica* was estimated as a function of pH using a method avoiding the possible interferences between chitinase and chitobiase reactions. These chitinases had an optimum pH at about 3.0, kept a strong activity below the pH optimum (till pH 1.5) and were almost completely inhibited at neutral pH. The value of the optimum pH is different from that previously recorded by Jeuniaux, who used a nephelometric method. The discrepancy between these results is discussed.

Gastric chitinases of Reptiles appear as being adequately adapted to the acidic reaction of the gastric fluids, in which they can hydrolyse chitin at a maximum rate of activity.

BIBLIOGRAPHIE

- HACKMAN, R. H. (1954) *Austr. J. Biol. Sci.* **7**, 168-178.
- JEUNIAUX, Ch. (1955, a) *Arch. internat. Physiol. Biochim.* **63**, 114-120.
- JEUNIAUX, Ch. (1955, b) *Mém. Soc. roy. Entom. Belg.* **27**, 312-319.
- JEUNIAUX, Ch. (1961) *Nature (London)* **192**, 135-136.
- JEUNIAUX, Ch. (1961-1962) *Ann. Soc. roy. zool. Belg.* **92**, 27-45.
- JEUNIAUX, Ch. (1963, a) *Arch. internat. Physiol. Biochim.* **71**, 307-309.
- JEUNIAUX, Ch. (1963, b) *Chitine et Chitinolyse*, Masson, Paris.
- JEUNIAUX, Ch. & AMANIEU, M. (1955) *Experientia* **11**, 195-196.
- JEUNIAUX, Ch., MICHA, J. C. & DANDRIFOSSE, G. (1973) *Comp. Biochem. Physiol.* sous presse.
- KARRER, P. & HOFMANN, A. (1929) *Hely. Chim. Acta* **12**, 616-637.
- MICHA, J. C., DANDRIFOSSE, G. & JEUNIAUX, Ch. (1973) *Arch. internat. Physiol. Biochim.* **81**, 439-451.
- REISSIG, J. L., STROMINGER, J. L. & LELOIR, L. F. (1955) *J. Biol. Chem.* **217**, 959-966.
- WATERHOUSE, D. F., HACKMAN, R. H. & MCKELLAR, J. W. (1961) *J. Insect Physiol.* **6**, 96-112.

Ch. JEUNIAUX
Laboratoires de Morphologie, Systématique et Ecologie animales,
Institut E. Van Beneden
22, Quai Van Beneden, B-4000 Liège, Belgique

G. DANDRIFOSSE
Laboratoire de Biochimie générale et comparée, Institut Léon Fredericq
17, Place Delcour, B-4000 Liège, Belgique