

Reçu le 2 mars 1955.

**PROPRIÉTÉS CHITINOLYTIQUES
DES EXTRAITS AQUEUX D'EXUVIES LARVAIRES,
PRENYMPHALES ET NYMPHALES
DE « TENEBRIOS MOLITOR L. »**

PAR

Ch. JEUNIAUX (¹)

(Université de Liège, Institut Léon Fredericq, Chimie Physiologique)

(2 figures)

HAMAMURA et KANEHARA (1940, 1954) ont signalé la présence d'une chitinase dans un extrait aqueux d'exuvies larvaires de *Bombyx mori* L. Ces auteurs ont admis que cet enzyme provient du liquide exuvial, adhérant à l'exuvie après la mue. Cette hypothèse a été confirmée par JEUNIAUX et AMANIEU (1955) qui ont étudié les propriétés chitinolytiques du liquide exuvial accumulé entre la cuticule larvaire et la cuticule nymphale, après ligaturage de la larve.

Outre le Ver-à-soie, les chenilles de *Platysamia cecropia* L. sécrètent également, au moment de la mue, un liquide exuvial doué de propriétés chitinolytiques (PASSONNEAU et WILLIAMS, 1953). L'intervention d'une chitinase au cours du phénomène de la mue peut vraisemblablement être généralisée à tous les Lépidoptères. Nous nous proposons d'en démontrer l'existence chez un Insecte Coléoptère : *Tenebrio molitor* L. et de préciser quelques aspects de la cinétique de cette chitinase.

Techniques

Un ligaturage des larves ou des prénympthes de *Tenebrio molitor* ne permet pas l'accumulation de liquide exuvial, contrairement à ce que nous avions obtenu avec *Bombyx mori*. Quels que soient le moment et l'endroit choisis pour ligaturer les larves, la cuticule larvaire finit par se déchirer dorsalement ; elle adhère seulement à l'endroit même de la ligature. D'autre part, le liquide exuvial n'est

(¹) Aspirant du Fonds National de la Recherche Scientifique.

pas dégluti, comme chez la peau, comme chez la

Nous avons pris, en du liquide exuvial, u *Tenebrio molitor* d'âge et leurs exuvies transp recueilli et conservé se phales. Ces exuvies, 15 jours, sont broyées et lavé. Après addition à grande vitesse en cl 20 minutes. Le liqui incolore, dans le cas broyat d'exuvies ny liquide brun clair et I néphéломétrique (JEU

Ré

1. — MISE EN

L'activité chitinoly fraîches (26 exuvies, p est aisément mise en et à pH 6, le trouble c Un extrait aqueux de ne provoque aucune provient donc bien de farine pouvant adhér

2. — PR A TOUS ET

Les exuvies rejetées et les nymphes sont en lots de poids frais 10 ml. d'eau. Après c

(¹) La nymphose eut (²) Préparation de la s de la chitinase : voir J

Reçu le 2 mars 1955.

CHITINOLYTIQUES
EXUVIES LARVAIRES,
NYMPHALES
LITOR L.»

(¹)
Verhaeghe, Chimie Physiologique)

54) ont signalé la présence d'exuvies larvaires de ce que cet enzyme provient d'après la mue. Cette et AMANIEU (1955) qui du liquide exuvial accumulé nymphale, après ligaturage

de *Platysamia cecropia* L. a mue, un liquide exuvial (ONNEAU et WILLIAMS, 1953). s du phénomène de la mue ée à tous les Lépidoptères. l'existence chez un Insecte préciser quelques aspects de

ymphe de *Tenebrio molitor* de exuvial, contrairement à *Bombyx mori*. Quels que soient naturer les larves, la cuticule ent; elle adhère seulement à part, le liquide exuvial n'est

erche Scientifique.

pas dégluti, comme chez *Bombyx mori*, mais résorbé directement par la peau, comme chez la plupart des Insectes (WIGGLESWORTH, 1948).

Nous avons pris, en guise de témoin des propriétés enzymatiques du liquide exuvial, un extrait aqueux d'exuvies. 700 larves de *Tenebrio molitor* d'âge avancé (¹) ont été surveillées quotidiennement, et leurs exuvies transportées aussitôt en glacière. Nous avons ensuite recueilli et conservé séparément les exuvies prénymphales et nymphales. Ces exuvies, dont le séjour en glacière n'a pas excédé 15 jours, sont broyées au pilon dans un mortier en présence de sable lavé. Après addition d'un volume d'eau déterminé, on centrifuge à grande vitesse en chambre froide (13.000 tours/minute) pendant 20 minutes. Le liquide surnageant est parfaitement limpide et incolore, dans le cas des exuvies larvaires et prénymphales. Le broyat d'exuvies nymphales fournit, après centrifugation, un liquide brun clair et limpide. On dose la chitinase par la méthode néphéломétrique (JEUNIAUX, 1951) (²).

Résultats expérimentaux

1. — MISE EN ÉVIDENCE D'UNE CHITINASE EXUVIALE

L'activité chitinolytique d'un extrait aqueux d'exuvies larvaires fraîches (26 exuvies, poids frais 71 mg., dans 5 ml. d'eau bidistillée) est aisément mise en évidence. Après 17 heures d'incubation à 36° C et à pH 6, le trouble dû à la chitine en suspension diminue de 20 %. Un extrait aqueux de farine de froment (200 mg. dans 15 ml. d'eau) ne provoque aucune variation de trouble. L'activité chitinolytique provient donc bien des exuvies, et non des particules de son ou de farine pouvant adhérer aux exuvies.

2. — PRÉSENCE DE CHITINASE EXUVIALE A TOUS LES STADES DU DÉVELOPPEMENT ET COMPARAISON QUANTITATIVE

Les exuvies rejetées respectivement par les larves, les prénymphes et les nymphes sont conservées séparément en glacière. Réparties en lots de poids frais identiques (300 mg.), elles sont broyées dans 10 ml. d'eau. Après centrifugation, on teste l'activité chitinolytique

(¹) La nymphose eut lieu 1 mois plus tard.

(²) Préparation de la suspension de chitine pulvérisée utilisée pour le dosage de la chitinase : voir JEUNIAUX et AMANIEU, 1955.

des liquides surnageants, dans les mêmes conditions de pH et de température (Tableau 1).

TABLEAU I
Activité chitinolytique d'extraits aqueux d'exuvies larvaires, prénymphales et nymphales

Extrait d'exuvies	Nombre d'exuvies	Poids frais	Poids sec correspondant	Variation du trouble de chitine en suspension (en % du trouble initial). Durée d'incubation :		
				2 h.	3 h.	7 h.
Larvaires.....	120	300 mg.	277.3 mg.	14.5 %	18 %	35 %
Prénymphales.	115	300 mg.	271.3 mg.	15 %	21 %	37.5 % solubilisation complète
Nymphales .	235	300 mg.	258.8 mg.	77 %	90 %	
Témoin (eau) .	—	—	—	0 %	1.2 %	0 %

Conditions expérimentales :

- 4 ml. d'extract aqueux d'exuvies (300 mg. dans 10 ml. d'eau).
- 1 ml. de suspension de chitine pulvérisée (soit 2 mg. de chitine).
- 1 ml. de Tampon Citrate-NaOH 0.6 M, pH 5.2 (pH final des solutions : 5.45).
- 1 grain de thymol.
- En tubes scellés et couchés, à 37° C.

Les différents extraits aqueux d'exuvies sont doués de propriétés chitinolytiques manifestes. Les activités chitinolytiques des exuvies larvaires et prénymphales sont quantitativement identiques, par rapport au poids ou au nombre d'exuvies. Celle des exuvies nymphales est, par contre, beaucoup plus intense (77 % de variation de trouble en 2 heures, au lieu de 14.5 et 15 %, soit une activité au moins 5 fois plus grande que celle des deux autres extraits).

3. — EFFET DU PH SUR L'ACTIVITÉ CHITINOLYTIQUE DES EXTRAITS D'EXUVIES LARVAIRES ET NYMPHALES

a) *Chitinase exuviale des larves.* — Pour que la durée de conservation des exuvies larvaires en glacière n'excède pas 15 jours, deux lots différents d'exuvies ont été utilisés pour cette expérience, à 15 jours d'intervalle.

Lot n° 1 : 187 exuvies soit poids sec 386 mg., 4 ml. d'extract centrifugé (2 mg./ml.), 1 grain de thymol dans 0.6 M, de pH 4.85 et 5.2. Les pH des solutions après équilibration, 4.55 et 4.95.

Lot n° 2 : 236 exuvies soit poids sec 552 mg.), b) centrifugé, on ajoute 1 grain de thymol et 1 ml. de tampons Citrate-solutions enzymatiques. pH brillation, 4.55, 4.95 et 5.2.

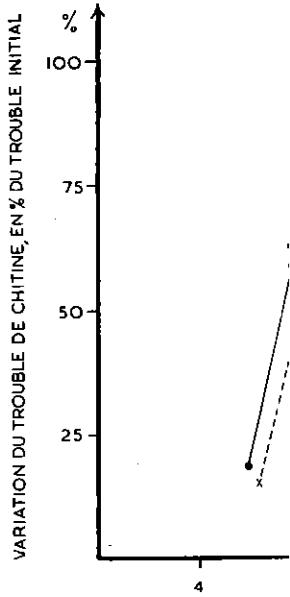


Fig. 1 : Influence d'exuvies

—○— : lot n° 1
●—●— : lot n° 2
×—×— : extract d'

FIG. 1. — Conditions expérimentales.

nes conditions de pH et de

seux d'exuvies larvaires,
nymphales

sec s- ant	Variation du trouble de chitine en suspension (en % du trouble initial). Durée d'incubation :		
	2 h.	3 h.	7 h.
mg.	14.5 %	18 %	35 %
mg.	15 %	21 %	37.5 %
ng.	77 %	90 %	solubi- lisati- on complète
	0 %	1.2 %	0 %

ans 10 ml. d'eau.
lit 2 mg. de chitine).
2 (pH final des solutions : 5.45).

ies sont doués de propriétés chitinolytiques des exuvies relativement identiques, par Celle des exuvies nymphales 7 % de variation de trouble soit une activité au moins autres extraits).

ACTIVITÉ CHITINOLYTIQUE LARVAIRES ET NYMPHALES

pour que la durée de conservation n'excède pas 15 jours, deux fois pour cette expérience, à

Lot n° 1 : 187 exuvies larvaires fraîches (poids frais 426.5 mg., soit poids sec 386 mg.), broyées dans 15 ml. d'eau bidistillée. A 4 ml. d'extrait centrifugé, on ajoute 1 ml. de suspension de chitine (2 mg./ml.), 1 grain de thymol et 1 ml. de tampons Citrate-NaOH 0.6 M, de pH 4.85 et 5.2, ou de tampon Borate-HCl 0.6 M de pH 8.1. Les pH des solutions enzymatiques deviennent respectivement, après équilibration, 4.95, 5.5 et 8.2.

Lot n° 2 : 236 exuvies larvaires fraîches (poids frais 610 mg., soit poids sec 552 mg.), broyées dans 20 ml. d'eau. A 4 ml. d'extrait centrifugé, on ajoute 1 ml. de chitine en suspension (2 mg./ml.), 1 grain de thymol et 1 ml. de tampon Citrate-HCl 0.6 M de pH 4.35, ou de tampons Citrate-NaOH 0.6 M de pH 4.85 et 5.2. Les pH des solutions enzymatiques deviennent respectivement, après équilibration, 4.55, 4.95 et 5.55.

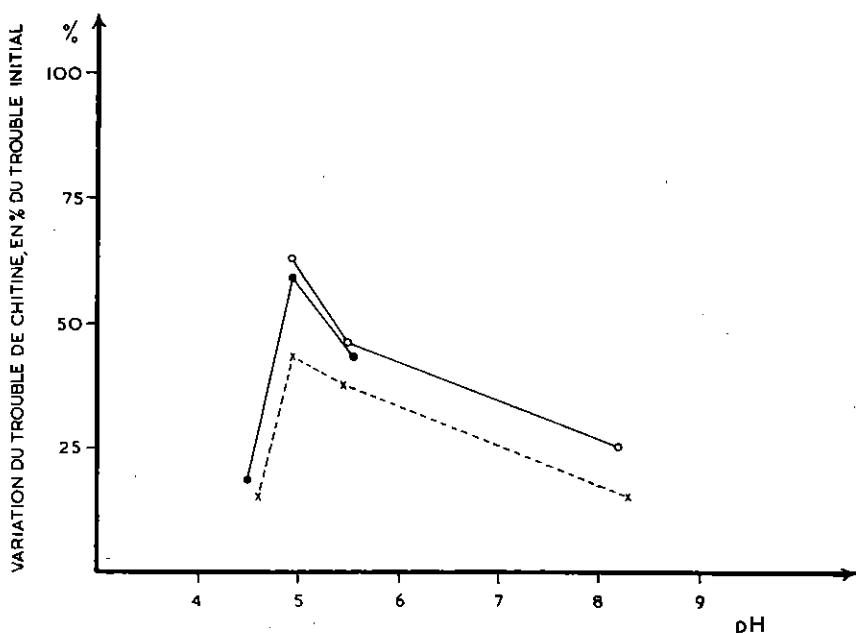


Fig. 1 : Influence du pH sur l'activité chitinolytique d'extraits aqueux d'exuvies

○—○ : lot n° 1 } extraits d'exuvies larvaires, après 8h. d'incubation à 37°C.
●—● : lot n° 2 }
×—× : extrait d'exuvies prénymphales, après 7h. d'incubation à 37°C.

FIG. 1. — Conditions expérimentales et préparation des extraits : dans le texte.

On mesure la variation de trouble après 8 heures d'incubation à 37° C. La courbe d'activité en fonction du pH est présentée dans la figure 1.

b) *Chitinase exuviale des prénymphes.* — 280 exuvies prénymphales (poids frais 750 mg., soit poids sec 678 mg.), sont broyées dans 25 ml. d'eau bidistillée. A 4 ml. d'extrait centrifugé, on ajoute 1 ml. de suspension de chitine (2 mg./ml.), 1 grain de thymol et 1 ml. des solutions tampons 0.6 M suivantes : Citrate-HCl de pH 4.4 ; Citrate-NaOH de pH 4.85 et 5.2 ; Borate-HCl de pH 8.1. Après équilibration, le pH des solutions enzymatiques est respectivement de 4.6, 4.95, 5.45 et 8.3. On dose la chitinase par mesure de la variation de trouble, après 7 heures d'incubation à 37° C (fig. 1).

On obtient, pour les deux types d'extraits, les mêmes courbes d'activité. Le pH optimum est situé aux environs de 4.95. L'activité de l'enzyme est considérablement réduite aux pH inférieurs à 4.6 et supérieurs à 7.

4. — EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA CHITINASE EXUVIALE DE PRÉNYMPHES

224 exuvies prénymphales, poids frais 600 mg. (soit poids sec 542.5 mg.) sont broyées dans 20 ml. d'eau bidistillée. A 4 ml. de l'extrait centrifugé, on ajoute 1 ml. de suspension de chitine pulvérisée (2 mg./ml.), 1 ml. de tampon Citrate-NaOH 0.6 M de pH 4.85 (pH final de la solution enzymatique : 4.95) et 1 grain de thymol. On dose l'activité chitinolytique par mesure de la variation de trouble, à 4 températures d'incubation différentes : 28, 37, 45 et 50° C ($\pm 1^{\circ}$ C) (fig. 2).

La température optimale est située aux environs de 37° C. A 45° C, l'activité est relativement élevée pendant les premières heures d'incubation, mais elle est ensuite rapidement détruite. Elle est pratiquement nulle à 50° C.

Discussion et conclusions

Les extraits aqueux des exuvies larvaires, prénymphales et nymphales de *Tenebrio molitor* L. manifestent une nette activité chitinolytique, témoin de l'existence d'une chitinase dans le liquide exuvial.

Pour des poids identiques d'exuvies fraîches, la teneur des exuvies nymphales en chitinase est 5 fois plus élevée que celle des exuvies larvaires et prénymphales. Nous croyons pouvoir expliquer, au

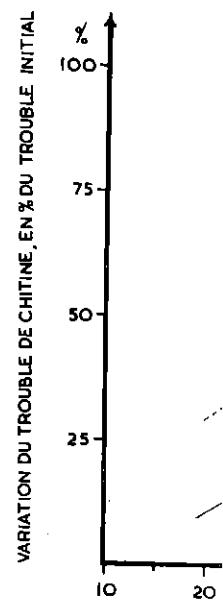


Fig. 2: Effet de la température sur la chitinase exuviale de prénymphes.

FIG. 2. — Con-

moins partiellement, cette chitinase exuviale activerait les exuvies ; dans ce cas, elle agirait surtout sur les exuvies plutôt que de leur faire subir un effet mativtement deux fois plus important. Il n'est donc pas étonnant que la chitinase exuviale nettement plus active que celle des autres extractions.

La chitinase exuviale fonctionne mieux au-delà du pH 4.4 que celle des autres extraits, mais sa fonction est semblable à celle des autres chitinases, qui sont actives au-delà du pH 4.4. Toutes ces chitinases, en effet, sont actives au-delà du pH 4.4 ; leur activité est maximale au-delà du pH 4.4 et supérieure à 7.

rès 8 heures d'incubation à
du pH est présentée dans la

— 280 exuvies prénymphales (sec 678 mg.), sont broyées et extrait centrifugé, on ajoute 1 ml., 1 grain de thymol et 10 g. de sucre : Citrate-HCl de pH 4.4 ; phosphate-HCl de pH 8.1. Après centrifugation à 10000 rev./min les surnatants sont respectivement incubés avec 100 µg d'acétochitinase par mesure de la diminution de l'absorbance à 280 nm. L'incubation à 37°C (fig. 1). Ainsi obtenu, les mêmes courbes d'activation sont obtenues pour les deux types de chitinasques. Les courbes d'activation des deux types de chitinasques sont très proches, mais l'activité est plus élevée pour le type nymphaque que pour le type prénymphaque. Les deux types de chitinasques sont également inhibés par l'acide acétique et l'acide chlorhydrique.

R LA CHITINASE EXUVIALE ES

nis 600 mg. (soit poids sec d'eau bidistillée. A 4 ml. de suspension de chitine pulvérisée-NaOH 0.6 M de pH 4.85 (4.95) et 1 grain de thymol. mesure de la variation de différentes : 28, 37, 45 et

aux environs de 37° C. A vée pendant les premières te rapidement détruite. Elle

clusions

aires, prénymphales et nymphales, ont une nette activité chitinase dans le liquide exuvial. Les racailles, la teneur des exuvies est élevée que celle des exuvies d'adultes nous pouvons pouvoir expliquer, au

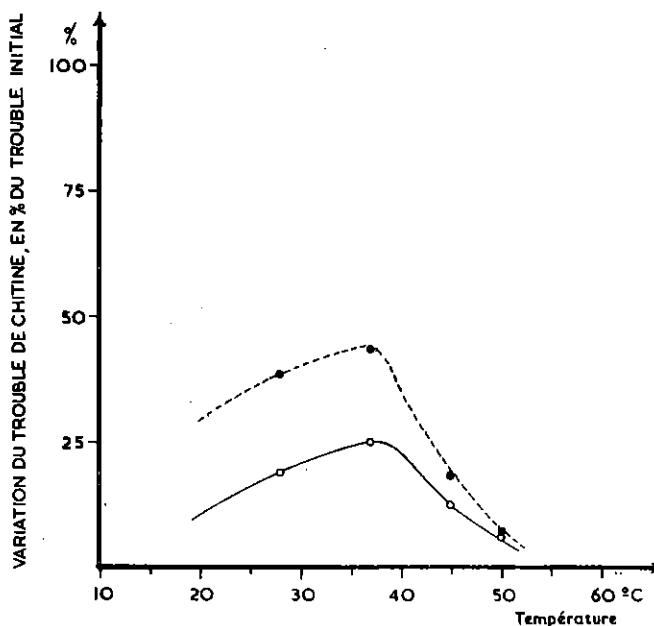


Fig. 2 : Effet de la température sur la chitinase exuviale de prénymphes.

○—○ après 3h. d'incubation } à pH 4.95
 •—• après 7h. d'incubation }

FIG. 2. — Conditions expérimentales dans le texte.

moins partiellement, cette différence quantitative en considérant que la chitinase exuviale adhère seulement à la surface interne des exuvies ; dans ce cas, elle dépend du nombre et de la surface des exuvies plutôt que de leur poids. Une exuvie nymphale pèse approximativement deux fois moins qu'une autre exuvie, et sa surface totale est indubitablement plus étendue (appendices, replis, etc.). Il n'est donc pas étonnant d'enregistrer une teneur en chitinase exuviale nettement plus élevée dans les extraits d'exuvies nymphales.

La chitinase exuviale des larves présente la même cinétique en fonction du pH que celle des prénymphes. Cette cinétique est fort semblable à celle des autres chitinases connues, notamment à celle du liquide exuvial de *Bombyx mori* L. (JEUNIAUX et AMANIEU, 1955). Toutes ces chitinases, en effet, ont un pH optimum situé entre 4.8 et 5.4 ; leur activité est nettement réduite aux pH inférieurs à 4.5 et supérieurs à 7.

L'activité de la chitinase exuviale en fonction de la température est également semblable à celle des autres chitinases, caractérisées par un optimum situé entre 37 et 40° C, et une destruction rapide à des températures légèrement supérieures.

Ces deux aspects de la cinétique de la chitinase exuviale sont toutefois totalement différents de ceux décrits par HAMAMURA et KANEHARA (1940, 1954) pour un extrait aqueux d'exuvies larvaires de *Bombyx mori* L. (pH optimum : 8.3; température optimale : 50° C).

Résumé

Des extraits aqueux d'exuvies larvaires, prénymphales et nymphales de *Tenebrio molitor* L. (Coléoptère) sont doués de propriétés chitinolytiques analogues à celles du liquide exuvial de *Bombyx mori* L. (Lépidoptère). Proportionnellement au poids d'exuvies fraîches, les extraits d'exuvies nymphales sont 5 fois plus riches en chitinase que ceux des autres exuvies. Le pH optimum de cette chitinase exuviale est situé aux environs de 4.95 et la température optimale est voisine de 37° C.

BIBLIOGRAPHIE

- HAMAMURA, Y. et KANEHARA, Y. — *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 1940, **16**, 907.
 HAMARUMA, Y., IIDA, S., OTSUKA, M., KANEHARA, Y. et ITO, S. — *Bull. Faculty Textile Fibers, Kyoto Univ. Industr. Arts Text. Fibers*, 1954, **1**, 127.
 JEUNIAUX, Ch. — *Arch. internat. Physiol.*, 1951, **59**, 242.
 JEUNIAUX, Ch. et AMANIEU, M. — *Arch. internat. Physiol. et Bioch.*, 1955, **63**, 94.
 PASSONNEAU, J. V. et WILLIAMS, C. M. — *J. Exper. Biol.*, 1953, **30**, 545.
 WIGGLESWORTH, V. B. — *Biol. Rev.*, 1948, **23**, 408.

EXCERP

lit tous les périodiques médicaux

Sect. I	Anatomy, A
Sect. II	Physiology,
Sect. III	Endocrinology
Sect. IV	Hygiene and
Sect. V	General Pathology
Sect. VI	Internal Medicine
Sect. VII	Pediatrics
Sect. VIII	Neurology and
Sect. IX	Surgery
Sect. X	Obstetrics and
Sect. XI	Oto-, Rhinology
Sect. XII	Ophthalmology
Sect. XIII	Dermatology
Sect. XIV	Radiology
Sect. XV	Tuberculosis

Prospectus détaillé et déposé

Les