

Reçu le 20 janvier 1955.

MISE EN ÉVIDENCE D'UNE CHITINASE
DANS LE LIQUIDE EXUVIAL
DE *BOMBYX MORI* L.

PAR

Ch. JEUNIAUX ⁽¹⁾ et M. AMANIEU

(Université de Liège, Institut Léon Fredericq, Chimie physiologique,
et Faculté des Sciences de Bordeaux, Laboratoire de Biologie animale)

(1 figure)

L'existence d'un enzyme chitinolytique dans le liquide exuvial des Arthropodes a été maintes fois postulée pour expliquer le ramollissement et la dissolution partielle de la strate membraneuse interne du tégument (endocuticule) au cours de la mue (WIGGLESWORTH, 1933, 1948). DRACH (1939), étudiant la mue chez les Crustacés Décapodes, admet qu'une chitinase doit être sécrétée par les cellules épithéliales, ce qui est également l'opinion de WIGGLESWORTH (1948) et de PASSONNEAU et WILLIAMS (1953); YONGE (1932) attribue ces transformations à l'action de lymphocytes.

La première preuve expérimentale de l'intervention d'un enzyme chitinolytique au cours de l'exuviation est due à HAMAMURA et KANEHARA (1940; et al., 1954). Ces auteurs auraient mis en évidence la présence, non seulement d'amylase, d'invertase et de protéase, mais encore de chitinase dans un extrait aqueux d'exuvies larvaires desséchées et pulvérisées de *Bombyx mori* L. Dosant la glucosamine par la méthode de NILSSON (1936), ils auraient observé l'action lytique de cet extrait sur de la chitine de cuticule de *B. mori*, préparée « *by the estimation of crude cellulose* » ⁽²⁾. 1.5 ml. d'extrait

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

⁽²⁾ Nous remercions M. Y. HAMAMURA, qui a bien voulu nous communiquer plusieurs compléments d'information sur son travail, notamment la description de la méthode employée pour la purification de la chitine, que nous reproduisons *in extenso* : « 18 gr. of the exuvia were boiled for 30 min. with 500 cc. of 1.25 % H₂SO₄. They were filtered and washed with water, and the residue was boiled for 30 min. with 500 cc. of 1.25 % NaOH. It was filtered and washed with water. The residue was heated with 0.5 % KMnO₄ solution and after filtration treated with NaHSO₃ solution and washed with water thoroughly and dried. Grayish white powder. Yield : about 6 gr. » (Y. HAMAMURA, *in litt.*).

d'exuvies (concentration libèrent 1.829 mg. de glucose et pH 7.15. Le pH optimal et la température optimale de l'enzyme sont de 7.15 et 45°C.

Cette démonstration doit être mise en évidence à la plus grande attention et à la plus grande prudence. En effet, la méthode employée ne permet assurément pas de doser uniquement de la chitine. La durée des traitements et le dosage de la glucosamine par hydrolyse préalable, ne permettent pas de dosage spécifique de la chitine pure. Cette grande disproportion entre les résultats des auteurs, pour un même matériel (matériaux identiques) conduisent à penser que ce travail.

RENAUD (1949) a obtenu des produits d'hydrolyse de la chitine au cours des différentes étapes de la mue par la méthode colorimétrique. D'autre part, plongée dans une solution « normale » (poids sec : 4 mg.), dialysés d'une couche de chitine (poids sec : 4 mg.), cet auteur a obtenu de la glucosamine, après 40 h. de digestion. La membraneuse d'animal n'aurait aucune action sur la chitine normale.

La conclusion de ce travail est la confirmation de la présence de chitine dans les Décapodes au cours de la mue. Une hydrolyse de la chitine par l'enzyme utilisé par l'auteur n'a pas permis de doser la chitine.

⁽¹⁾ Cette méthode permet de doser la chitine simultanément, mais les résultats sont faibles (RENAUD, *l. c.*, p. 100).

Reçu le 20 janvier 1955.

LA CHITINASE
EXUVIAL
DE *B. MORI* L.

Y. HAMAMURA
Laboratoire de Chimie physiologique,
Université de Biologie animale

On a cherché dans le liquide exuvial
la substance responsable pour expliquer le
délitement de la strate membraneuse in-
terne de la mue (WIGGLESWORTH,
1936) chez les Crustacés
et il a été démontré qu'elle est
sécrétée par les
cellules de l'opinion de WIGGLESWORTH
(1953); YONGE (1932)
par les lymphocytes.

On a recherché l'intervention d'un enzyme
qui est due à HAMAMURA et
les auteurs auraient mis en
œuvre l'amyrase, d'invertase et de
l'extractum aqueux d'exuvies
de *Bombyx mori* L. Dosant la
chitine (1936), ils auraient observé
l'absence de cuticule de *B. mori*,
chez la « moule » (2). 1.5 ml. d'extrait

Revue Scientifique.
On a bien voulu nous communiquer
ce travail, notamment la description
de la chitine, que nous reproduisons
ci-dessous: 30 min. with 500 cc. of 1.25 %
sodium acetate, and the residue was boiled
in water, filtered and washed with
water, and after filtration
in water thoroughly and dried.
Y. HAMAMURA, *in litt.*)

d'exuvies (concentration : 10 gr. d'exuvies sèches pour 100 ml.)
libèrent 1.829 mg. de glucosamine, après 66 h. d'incubation à 32° C.
et pH 7.15. Le pH optimum de cette chitinase serait de 8.2 et la
température optimale de 50° C.

Cette démonstration de l'existence d'une chitinase ne semble pas
devoir être mise en doute, mais les résultats quantitatifs sont sujets
à caution. En effet, la méthode employée pour purifier la chitine
ne permet assurément pas l'obtention d'un résidu constitué
uniquement de chitine pure : la concentration de réactifs et la
durée des traitements sont nettement insuffisants. D'autre part,
le dosage de la glucosamine libre par la méthode de NILSSON, sans
hydrolyse préalable, ne nous paraît pas constituer une technique
de dosage spécifique des chitinases, lorsque le substrat n'est pas
de la chitine pure. Ces remarques (qui expliquent peut-être la
grande disproportion entre les différents résultats obtenus par ces
auteurs, pour un même extrait enzymatique et dans des conditions
identiques) conduisent à souhaiter une confirmation des conclusions
de ce travail.

RENAUD (1949) a observé, chez *Maia squinado*, l'apparition des
produits d'hydrolyse de la chitine dans la couche membraneuse au
cours des différentes étapes de la mue, en dosant la glucosamine
par la méthode colorimétrique de DUMAZERT et MARQUET (1943) (1).
D'autre part, plongeant des extraits de couche membraneuse
« normale » (poids sec : 2 mg.) dans des extraits glycélinés, filtrés et
dialysés d'une couche membraneuse en voie de gélification (poids
sec : 4 mg.), cet auteur a pu doser la libération de 250 γ de gluco-
samine, après 40 h. d'incubation au pH 8. Des extraits de couche
membraneuse d'animaux au stade de repos de l'intermue (« C 4 »)
n'auraient aucune action sur la chitine d'une couche membraneuse
normale.

La conclusion de ces intéressantes recherches est que la gélifi-
cation de la couche membraneuse tégumentaire des Crustacés
Décapodes au cours de la mue doit effectivement être attribuée à
une hydrolyse de la chitine par une chitinase. Cependant, le substrat
utilisé par l'auteur n'étant pas de la chitine purifiée, mais une portion

(1) Cette méthode permet de doser la glucosamine et l'acétylglucosamine
simultanément, mais les résultats de RENAUD sont exprimés en glucosamine
totale (RENAUD, *l. c.*, p. 295).

de cuticule, on pourrait douter que la glucosamine dosée provienne nécessairement de la solubilisation de la chitine.

Cette objection ne peut être faite à PASSONNEAU et WILLIAMS (1953) qui ont étudié en détail les propriétés du liquide exuvial des nymphes de *Platysamia cecropia* (Lépidoptère). Ils ont d'abord observé la persistance du liquide exuvial sous forme d'un gel inerte au point de vue enzymatique, entre la vieille cuticule et le nouveau tégument en voie d'élaboration. Ce gel se transforme en sol à peu près au moment où l'action du liquide exuvial se manifeste par une décomposition des strates internes. A ce moment, en effet, la teneur en glucosamine et en N-acétylglucosamine du liquide exuvial augmente de 5 à 8 fois (dosage par la méthode colorimétrique de ELSON et MORGAN, après hydrolyse).

Utilisant comme substrat de la chitine purifiée à partir de carapaces d'Ecrevisses, dissoute et reprécipitée par la méthode de KARRER et HOFMANN (1929), ces auteurs ont dosé l'apparition *in vitro* des sucres aminés sous l'action du liquide exuvial : 0.2 ml. de liquide exuvial libère 560 et 720 γ ⁽¹⁾ de sucres aminés, après 5 jours d'incubation à 37° C., au pH 7.1.

Les travaux que nous venons de résumer apportent la démonstration quasi catégorique de la présence d'une chitinase dans le liquide exuvial des Arthropodes.

Cependant, pour rechercher un enzyme catalysant spécifiquement l'hydrolyse d'une substance organique insoluble telle que la chitine, il nous paraît préférable d'employer des méthodes permettant de doser directement le substrat plutôt que les produits de dégradation (JEUNIAUX, 1951). Au cours de ce travail, nous nous proposons de démontrer, par l'emploi d'une méthode permettant de déterminer directement la quantité de chitine solubilisée, que le liquide exuvial recueilli au moment de la mue nymphale du Ver-à-soie (*Bombyx mori* L.) contient un enzyme chitinolytique, ayant un pH optimum situé aux environs du pH 5.4.

Méthodes

1. *Obtention et récolte du liquide exuvial.* — Des Vers-à-soie au dernier âge larvaire sont ligaturés entre la tête et le thorax, 48 heures

(1) Résultats de 2 tests différents.

après la dernière défec-
avancé. Une ligature
nymphale, une ligature
complet du sujet liga
d'énoncer, qui donne
nymphale dans les 48
un décollement entre
sous-jacent, mais ce
véritable de l'animal.
sac fermé antérieurement
aux derniers segment

Il est difficile de rep
l'exuvie larvaire n'est
vation attentive et l
permet cependant de
rapprochés que possib
encore mué : les pre
frippé du tégument l
noire correspondant à

Les individus ligat
sous deux aspects dif
dès la mue par un r
renflement correspon
l'exuvie larvaire et le
pratiquant une incisi
du thorax ; le liquid
s'écouler spontanément
« massant » légèrement
prudemment, ne risq
nymphal susceptibles
est jaune clair, limp
contact de l'air, mêm

Les autres anima
très différent : on n'
cique, mais, dans les
se boursouffle par a
qui noircit intensém
cas, mais avec plus
ration de la nymph

cosamine dosée provienne
chitine.

ASSONNEAU et WILLIAMS
riétés du liquide exuvial
doptère). Ils ont d'abord
ous forme d'un gel inerte
ille cuticule et le nouveau
transforme en sol à peu
exuvial se manifeste par
ce moment, en effet, la
samine du liquide exuvial
éthode colorimétrique de

rifiée à partir de carapaces
la méthode de KARRER
l'apparition *in vitro* des
uvial : 0.2 ml. de liquide
s aminés, après 5 jours

apportent la démonstra-
e chitinase dans le liquide

catalysant spécifiquement
luble telle que la chitine,
méthodes permettant de
s produits de dégradation
nous nous proposons de
ermettant de déterminer
ée, que le liquide exuvial
du Ver-à-soie (*Bombyx*
, ayant un pH optimum

. — Des Vers-à-soie au
ète et le thorax, 48 heures

après la dernière défécation, alors que le filage du cocon est déjà très avancé. Une ligature trop précoce risque d'empêcher la mue nymphale, une ligature trop tardive permet souvent le dépouillement complet du sujet ligaturé. Dans les conditions que nous venons d'énoncer, qui donnent les meilleurs résultats, l'animal subit la mue nymphale dans les 48 heures qui suivent la ligature ; il se produit un décollement entre le tégument larvaire et le tégument nymphal sous-jacent, mais ce décollement n'est pas suivi du dépouillement véritable de l'animal. L'exuvie larvaire forme en effet une sorte de sac fermé antérieurement par la ligature et adhérant postérieurement aux derniers segments abdominaux de la nymphe.

Il est difficile de repérer le moment exact de l'exuviation puisque l'exuvie larvaire n'est pas véritablement abandonnée ; une observation attentive et fréquemment renouvelée des sujets ligaturés permet cependant de séparer, à des intervalles de temps aussi rapprochés que possible, ceux qui ont mué de ceux qui n'ont pas encore mué : les premiers se distinguent des seconds par l'aspect frippé du tégument larvaire et par la présence d'une ligne latérale noire correspondant à l'exuviation des troncs trachéens principaux.

Les individus ligaturés et venant de muer peuvent se présenter sous deux aspects différents : les uns, peu nombreux, sont déformés dès la mue par un renflement dorsal de la région thoracique ; ce renflement correspond à l'accumulation de liquide exuvial entre l'exuvie larvaire et le tégument nymphal. On recueille ce liquide en pratiquant une incision à travers l'exuvie dans la région dorsale du thorax ; le liquide exuvial jaillit de l'orifice ; lorsqu'il cesse de s'écouler spontanément, on peut en recueillir encore un peu en « massant » légèrement le corps de l'animal. Ce massage, pratiqué prudemment, ne risque pas de provoquer des déchirures du tégument nymphal susceptibles de laisser s'écouler du sang. Ce liquide exuvial est jaune clair, limpide, transparent, mais noircit rapidement au contact de l'air, même en chambre froide.

Les autres animaux ligaturés se présentent sous un second aspect très différent : on n'observe pas, après la mue, de renflement thoracique, mais, dans les heures qui suivent la mue, le tégument larvaire se boursouffle par accumulation sous-jacente d'un liquide exuvial qui noircit intensément. Celui-ci est recueilli comme dans le premier cas, mais avec plus de difficultés : il est moins abondant, et la macération de la nymphe dans ce liquide a provoqué une fragilisation

anormale du tégument nymphal. Pour éviter qu'il ne se déchire, et que le liquide exuvial ne soit souillé par du sang, on doit prendre les plus grandes précautions, et éviter tout massage ; dans ces conditions, on ne peut extraire qu'une faible quantité de liquide exuvial.

Quatre animaux ligaturés du premier type ont été utilisés pour la mise en évidence de la chitinase ; ils ont fourni 4 ml. de liquide exuvial. Douze animaux du second type ont été utilisés pour l'étude de l'influence du pH sur la chitinolyse ; ils ont fourni 3.1 ml. de liquide exuvial. Nous ne pensons pas qu'il existe des différences qualitatives entre les liquides exuviaux des deux types.

Le Ver-à-soie nous paraît constituer un matériel de choix pour l'obtention et la récolte du liquide exuvial : en effet, les ligatures très simples que nous avons décrites empêchent la déglutition du liquide exuvial telle qu'elle a été observée par WACHTER (1930) et LESPERON (1937) (cités par BOUNHIOL, 1948). On sait que, chez de nombreux autres Insectes, le liquide exuvial n'est pas dégluti mais bien absorbé par la surface du nouveau tégument avant qu'il ne soit devenu imperméable.

2. *Dosage de la chitinase.* — Le liquide exuvial brut est dilué 6 fois par de l'eau bidistillée, puis centrifugé à grande vitesse en chambre froide (13.000 tours/minute pendant 20 minutes). Le culot contient quelques débris tissulaires, des lymphocytes probablement et des particules de mélanine. Le liquide surnageant est d'un brun-rougeâtre plus ou moins sombre ; une mesure de pH du liquide exuvial ainsi dilué nous a donné 6.75 (1).

Le liquide surnageant est trop coloré pour permettre l'emploi correct d'une méthode néphélométrique. De plus, il continue à s'assombrir progressivement, surtout à la température d'incubation (35 ou 37° C.). Notons que cet assombrissement est plus rapide à des pH supérieurs à 6 qu'entre les pH 5 et 6. Au-dessous de pH 5, une précipitation de protéines se produit assez rapidement. Ces propriétés nous ont conduit à employer une méthode chimique de

(1) WIGGLESWORTH (1933) le dit de réaction neutre chez *Rhodnius prolixus* ; chez *Platysamia cecropia*, le liquide exuvial, tant sous la forme gel que sol, est incolore et de réaction légèrement alcaline (pH 7.35 à 7.55) (PASSONNEAU et WILLIAMS, 1953). Un extrait aqueux de 10 gr. d'exuvies larvaires desséchées et pulvérisées de *Bombyx mori* a un pH de 6.2 à 6.4 ; il est de couleur brune, avec une fluorescence brun-jaunâtre (HAMAMURA et al., 1954).

dosage de la chitine, cor
après action de l'enzym
(JEUNIAUX, 1951, 1954)

La chitine utilisée co
été purifiée à partir d
BENEKE (1905), solubili
en fines particules pa
HOFMANN, 1929). Aprè
fugations, la suspensio
à l'autoclave. Elle co
(teneur en azote de la

Rés

1. *Mise en évidence*
fournissent 4 ml. de li
l'eau bidistillée, et ce
en deux lots, dont l'un
pendant deux heures (p
précipité brun).

A 1 ml. de suspens
diluée de liquide exu
citrate-NaOH 0.2 M (c
On ajoute un grain c
bactérien. Durée d'incu
d'azote de la chitine re
tableau 1.

Solution

1 ml. suspension de chit
tampon :
a) + 4 ml. eau distillée (c
b) + 4 ml. liquide exuvia
c) + 4 ml. liquide exuvial

(1) Soit 2.3 mg. de chit
(2) Moyenne de 2 dosag

MANIEU

éviter qu'il ne se déchire, du sang, on doit prendre tout massage; dans ces faible quantité de liquide

type ont été utilisés pour ont fourni 4 ml. de liquide ont été utilisés pour l'étude ont fourni 3.1 ml. de liquide les différences qualitatives es.

matériel de choix pour al : en effet, les ligatures empêchent la déglutition du e par WACHTER (1930) et 48). On sait que, chez de rial n'est pas dégluti mais tégument avant qu'il ne

de exuvial brut est dilué ifugé à grande vitesse en ant 20 minutes). Le culot ymphocytes probablement surnageant est d'un brun- ure de pH du liquide exu-

pour permettre l'emploi . De plus, il continue à température d'incubation ssement est plus rapide à et 6. Au-dessous de pH 5, it assez rapidement. Ces une méthode chimique de

neutre chez *Rhodnius prolixus*; t sous la forme gel que sol, est 7.35 à 7.55) (PASSONNEAU et d'exuvies larvaires desséchées à 6.4; il est de couleur brune, A et al., 1954).

dosage de la chitine, consistant à doser l'azote du résidu par Kjedhal, après action de l'enzyme et solubilisation des protéines par NaOH (JEUNIAUX, 1951, 1954).

La chitine utilisée comme substrat au cours de ces expériences a été purifiée à partir de carapaces de Homards par la méthode de BENEKE (1905), solubilisée dans H²SO⁴ 50 % à 0° C., puis reprecipitée en fines particules par dilution dans l'eau distillée (KARRER et HOFMANN, 1929). Après élimination de l'acide par lavages et centrifugations, la suspension de chitine dans l'eau bidistillée est stérilisée à l'autoclave. Elle contient environ 2.5 mg. de chitine par ml. (teneur en azote de la chitine sèche : 6.4 %).

Résultats expérimentaux

1. *Mise en évidence d'une chitinase.* — Quatre chenilles ligaturées fournissent 4 ml. de liquide exuvial. Après dilution au 1/6 par de l'eau bidistillée, et centrifugation, le liquide surnageant est divisé en deux lots, dont l'un (8 ml.) est chauffé au bain-marie à 70° C. pendant deux heures (ce qui entraîne la formation d'un abondant précipité brun).

A 1 ml. de suspension de chitine, on ajoute 4 ml. de solution diluée de liquide exuvial, chauffée ou non, et 1 ml. de tampon citrate-NaOH 0.2 M (conc. finale en tampon : 0.03 M, pH final : 6.9). On ajoute un grain de thymol pour éviter tout développement bactérien. Durée d'incubation : 14 h. à 37° C. Les résultats des dosages d'azote de la chitine restante après incubation sont exposés dans le tableau 1.

TABLEAU 1.

Solution	Azote-chitine restant, en γ	Azote-chitine restant en % des témoins
1 ml. suspension de chitine + 1 ml. de tampon :		
a) + 4 ml. eau distillée (Témoin)	146 γ (1)(2)	100 %
b) + 4 ml. liquide exuvial chauffé	150 γ (2)	102 %
c) + 4 ml. liquide exuvial non chauffé . .	4.5 γ (2)	3.3 %

(1) Soit 2.3 mg. de chitine.

(2) Moyenne de 2 dosages.

2. *Influence du pH sur le déroulement de la chitinolyse.* — Douze chenilles ligaturées fournissent 3.1 ml. de liquide exuvial. A 4 ml. de la solution diluée au 1/6 et centrifugée, on ajoute 1 ml. de tampons citrate-NaOH 0.6 M, ajustés aux pH 4.8, 5.25, 6 et 7.5. La mesure du pH final des solutions enzymatiques tamponnées donne : 4.9, 5.4, 6.3 et 7.15 (conc. finale en tampon : 0.1 M). Durée d'incubation en présence de chitine pulvérisée (1 ml. de suspension) et de thymol : 6 h. à 35° C. Les résultats de cette expérience sont présentés dans le tableau 2 et repris dans la figure 1.

TABLEAU 2.

Solution	pH final	Azote-chitine restant	Azote solubilisé (3)	Azote solubilisé en % du témoin II
Témoin I sans chitine (1 ml. tampon + 1 ml. eau + 4 ml. liquide exuvial)	6.9	4 γ	—	—
Témoin II sans enzyme (1 ml. tampon + 1 ml. suspension chitine, + 4 ml. eau)	5.3	139 γ (1)(2)	—	—
Tests : 1 ml. tampon + 1 ml. susp. chitine, + 4 ml. liquide exuvial dilué; à pH : a) ..	4.9	50 γ	93 γ	67%
b) ..	5.4	22 γ	121 γ	87%
c) ..	6.3	25 γ	118 γ	85%
d) ..	7.15	44 γ	99 γ	71%

(1) Soit 2.2 mg. de chitine.

(2) Moyenne de 2 dosages.

(3) Différence entre la somme des valeurs des témoins I et II et la valeur obtenue pour chaque test.

Discussions et conclusions

Les résultats exposés dans le tableau 1 démontrent indubitablement la présence d'une chitinase très active dans le liquide exuvial de *Bombyx mori*. 2.3 mg. de chitine sont presque complètement solubilisés en 14 h. par 4 ml. de liquide exuvial dilué 6 fois, soit par 0.66 ml. de liquide exuvial brut. Une station de 2 heures à la température de 70° C. inactive complètement l'enzyme.

Il est difficile de co
lytique du liquide exu
cecropia (PASSONNEAU
rience étant fort différe
de *B. mori* est au moind
de *P. cecropia*. En effe
libère, en 5 jours d'inc

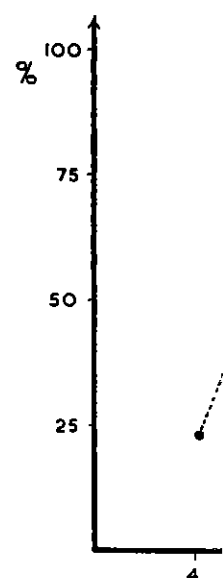


Fig. 1: Influence du pH sur la chitinolyse. — (○) : chitine en ordonnée; (●) : chitine en ordonnée.

maximum) de glucosaminidase intermédiaires de
En 14 h. seulement, à
de liquide exuvial de
d'azote.

(1) En supposant, pour
quement de la glucosaminidase

de la chitinolyse. — Douze ml. de liquide exuvial. A 4 ml. on ajoute 1 ml. de tampons à pH 5, 5.25, 6 et 7.5. La mesure de l'azote soluble dans les tamponnées donne : 4.9, 5.25, 6 et 7.5. La mesure de l'azote soluble dans les tamponnées (0.1 M). Durée d'incubation : 2 heures (à 37° C. et de thymol : 0.1 M). Les résultats de l'expérience sont présentés dans

Proteine tamponnée	Azote solubi- lisé (3)	Azote solu- bilisé en % du témoin II
γ	—	—
(1)(2)	—	—
γ	93 γ	67%
γ	121 γ	87%
γ	118 γ	85%
γ	99 γ	71%

des témoins I et II et la valeur

Conclusions

Les résultats démontrent indubitablement l'activité chitinolytique dans le liquide exuvial de Bombyx mori. On obtient presque complètement l'azote soluble dans le liquide exuvial dilué 6 fois, soit par une incubation de 2 heures à la température de 37° C. et à pH 6.9.

Il est difficile de comparer quantitativement l'activité chitinolytique du liquide exuvial de *Bombyx mori* à celle de *Platysamia cecropia* (PASSONNEAU et WILLIAMS, 1953), les conditions d'expérience étant fort différentes. Toutefois, il est certain que la chitinase de *B. mori* est au moins aussi active (ou aussi concentrée) que celle de *P. cecropia*. En effet, 0.2 ml. de « moulting fluid » de *P. cecropia* libère, en 5 jours d'incubation à 37° C. et à pH 7.1, 0.720 mg. (valeur

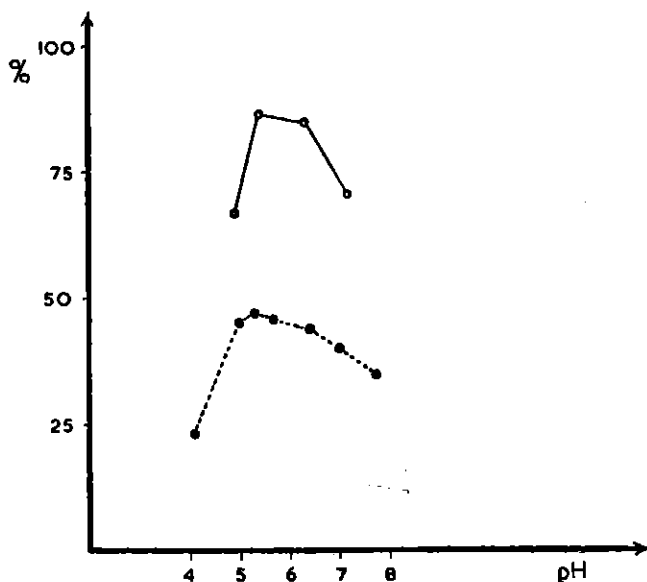


Fig. 1: Influence du pH sur la chitinolyse.
 ○—○ : chitinase du liquide exuvial de Bombyx mori L.
 ●---● : chitinase du filtrat de culture d'un Actinomycète chitinolytique.
 en ordonnées : azote solubilisé en % de la quantité initiale.

Fig. 1.

maximum) de glucosamine, acétylglucosamine et produits d'hydrolyse intermédiaires de la chitine, soit au maximum (1) 56 γ d'azote. En 14 h. seulement, à la même température et à pH 6.9, 0.66 ml. de liquide exuvial de *B. mori* libère, d'après nos résultats, 141.5 γ d'azote.

(1) En supposant, pour faciliter le calcul, que les 0.720 mg. représentent uniquement de la glucosamine.

En ce qui concerne l'influence du pH sur la vitesse de la réaction enzymatique, la chitinase du liquide exuvial de *B. mori* ne diffère guère des autres chitinases connues. Le pH optimum est situé aux environs du pH 5.4 ; l'activité enzymatique est à peine moindre au pH 6.3 ; elle est nettement réduite au pH 4.9 (tableau 2). Ces résultats sont fort semblables à ceux obtenus pour la chitinase du liquide intestinal des Mollusques Gastéropodes *Helix pomatia* (pH optimum : 5.2 ; KARRER et HOFMANN, 1929) et *Helix aspersa* (pH optimum : 4.8 ; HACKMAN, 1954) et pour l'exochitinase libérée par un Actinomycète chitinolytique (pH optimum : 5.3 ; JEUNIAUX, 1951) (fig. 1).

Par contre, nos résultats diffèrent totalement de ceux de HAMAMURA et al. (1940, 1954) pour la chitinase d'un extrait aqueux d'exuvies larvaires du même Insecte. A pH 5.3 (zone optimale pour les autres chitinases citées ci-dessus), ces auteurs n'enregistrent qu'une faible activité ; elle croît rapidement à des pH plus alcalins, et atteint son maximum à pH 8.2 ; elle décroît ensuite rapidement, mais est encore presque aussi sensible à pH 10.14 qu'à pH 7.15 ! Nous avons exposé, au début de ce travail, les restrictions que nous croyons devoir apporter à ces résultats. Nous nous proposons de comparer ultérieurement la chitinase du liquide exuvial obtenu par notre procédé à celle qu'on peut extraire d'une poudre sèche d'exuvies larvaires.

Résumé

Des chenilles de *Bombyx mori* L. sont ligaturées 48 heures avant la mue nymphale, entre la tête et le thorax, pour permettre l'accumulation de liquide exuvial entre la vieille cuticule et le tégument nymphal. Ce liquide exuvial renferme une chitinase très active dont le pH optimum est situé aux environs du pH 5.4. La courbe d'activité en fonction du pH est fort semblable à celle des chitinases de *Helix pomatia* et *aspersa*, et à celle de l'exochitinase du filtrat de culture d'un Actinomycète chitinolytique isolé du sol ; elle diffère nettement de celle figurée par HAMAMURA et al. (1940, 1954) pour la chitinase d'un extrait aqueux d'exuvies larvaires de *B. mori* L.

- BENEKE, W. — *Botan. Z.*
 BOUNHIOL, J. J. — *Aperçu Séricicole Internat.*, 2
 DRACH, P. — *Ann. Inst. Séric.*
 DUMAZERT, C. et MARQUE, J. — *Bull. Entom. Exp. Appl.*, 1409.
 HAMAMURA, Y. et KANEHISA, S.
 HAMAMURA, Y., IIDA, S., et KANEHISA, S. — *Faculty Textile Fibers*
 HACKMAN, R. H. — *Aust. J. Biol. Sci.*
 JEUNIAUX, Ch. — *Arch. Sci. (Geneve)*
 JEUNIAUX, Ch. — *Mém. Soc. Entom. France*
 KARRER, P. et HOFMANN, H. — *Bull. Entom. Exp. Appl.*
 NILSSON, I. — *Biochem. J.*
 PASSONNEAU, J. V. et WIGGLESWORTH, V. B. — *Ann. Entomol. Soc. Amer.*
 RENAUD, L. — *Ann. Inst. Séric.*
 WIGGLESWORTH, V. B. — *Ann. Entomol. Soc. Amer.*
 WIGGLESWORTH, V. B. — *Ann. Entomol. Soc. Amer.*
 YONGE, C. M. — *Proc. R. Soc. Lond. B*

ur la vitesse de la réaction
vial de *B. mori* ne diffère
pH optimum est situé aux
que est à peine moindre
u pH 4.9 (tableau 2). Ces
enus pour la chitinase du
podes *Helix pomatia* (pH
929) et *Helix aspersa* (pH
l'exochitinase libérée par
imum : 5.3; JEUNIAUX,

totalemeut de ceux de
tinase d'un extrait aqueux
H 5.3 (zone optimale pour
ces auteurs n'enregistrent
ent à des pH plus alcalins,
écroît ensuite rapidement,
pH 10.14 qu'à pH 7.15 !
l, les restrictions que nous

Nous nous proposons de
liquide exuvial obtenu par
aire d'une poudre sèche

ligaturées 48 heures avant
ax, pour permettre l'accu-
lle cuticule et le tégument
une chitinase très active
ons du pH 5.4. La courbe
blable à celle des chitinases
de l'exochitinase du filtrat
que isolé du sol ; elle diffère
A et al. (1940, 1954) pour
les larvaires de *B. mori* L.

BIBLIOGRAPHIE

- BENEKE, W. — *Botan. Zeit.*, 1905, **63**, 227.
BOUNHIOL, J. J. — Aperçu sur la mue et sa physiologie, *Actes du VII^e Congrès Séricicole Internat.*, Alès, France, 1948.
DRACH, P. — *Ann. Inst. Océanogr.*, 1939, **19**, 106.
DUMAZERT, C. et MARQUET, M. — *Trav. Membres Soc. Chim. Biol.*, 1943, **25**, 1409.
HAMAMURA, Y. et KANEHARA, Y. — *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 1940, **16**, 907.
HAMAMURA, Y., IIDA, S., OTSUKA, M., KANEHARA, Y. et ITO, S. — *Bull. Faculty Textile Fibers, Kyoto Univ., Industr. Arts Text. Fibers*, 1954, **1**, 127.
HACKMAN, R. H. — *Austr. J. Biol. Sci.*, 1954, **7**, 168.
JEUNIAUX, Ch. — *Arch. internat. Physiol.*, 1951, **59**, 242.
JEUNIAUX, Ch. — *Mém. Acad. Roy. Belg., Classe des Sci.*, 1954, **28**, fasc. 7.
KARRER, P. et HOFMANN, A. — *Helv. Chim. Acta*, 1929, **12**, 616.
NILSSON, I. — *Biochem. Z.*, 1936, **285**, 386.
PASSONNEAU, J. V. et WILLIAMS, C. M. — *J. Exper. Biol.*, 1953, **30**, 545.
RENAUD, L. — *Ann. Inst. Océanogr.*, 1949, **24**, 259.
WIGGLESWORTH, V. B. — *Quart. J. Micr. Sci.*, 1933, **76**, 269.
WIGGLESWORTH, V. B. — *Biol. Rev.*, 1948, **23**, 408.
YONGE, C. M. — *Proc. Roy. Soc. London, B*, 1932, **111**, 297.