

Extrait des *Mémoires de la Société Royale d'Entomologie de Belgique*

TOME XXVII - 1955

La chitinase exuviale des Insectes

PAR

Ch. JEUNIAUX

IMPRIMERIE DES SCIENCES, s. a.
75, avenue Emile de Beco
Bruxelles

La chitinase exuviale des Insectes

par Charles JEUNIAUX (1)

On sait que le phénomène de la mue, chez les Arthropodes, est précédé d'une série de modifications histologiques, intéressant spécialement l'exosquelette chitineux et l'hypoderme qui le secrète. On observe successivement un décollement de l'hypoderme, une multiplication des cellules qui le constituent, parfois suivie de chromatolyse, un développement des œnocytes et une sécrétion de substances lipoprotéiques, constituant un film à la surface externe de l'hypoderme (WIGGLESWORTH, 1954). On observe simultanément l'apparition d'un liquide, ou d'un gel se liquéfiant peu après, dans l'espace laissé libre entre l'hypoderme détaché (déjà recouvert des premières couches de chitine) et la vieille cuticule. C'est le « liquide exuvial » (*moulting fluid*), vraisemblablement sécrété par les cellules de l'hypoderme et non par les glandes exuviales, d'origine dermique (WIGGLESWORTH, 1948; PASSONNEAU et WILLIAMS, 1953).

Depuis que l'existence de ce liquide exuvial a été mise en évidence, on l'a rendu responsable du ramollissement et de la dissolution des strates internes de la vieille cuticule. On a admis, en toute logique, que ce liquide exuvial devait contenir des enzymes capables de solubiliser la chitine et les protéines (TOWER, 1906; WIGGLESWORTH, 1933, 1948, CHAUVIN, 1949). Mais ce n'est qu'en 1940 que HAMAMURA et ses collaborateurs démontrèrent expérimentalement la présence de ces enzymes, bien que n'ayant pas étudié le liquide exuvial lui-même, mais un extrait aqueux d'exuvies larvaires de *Bombyx mori* L. C'est à RENAUD (1949) pour le Crustacé *Maia squinado*, et à PASSONNEAU et WILLIAMS (1953) pour *Platysamia cecropia* L. que revient le mérite d'avoir mis en évidence la présence de chitinase dans le liquide exuvial lui-même, prélevé *in situ*. En collaboration avec AMANIEU (1955, a et b), nous avons confirmé l'existence de chitinase dans le liquide exuvial de *Bom-*

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

byx mori L., et montré que la chitinase exuviale du Ver à soie et du Ver de farine ont des propriétés cinétiques analogues à celles des autres chitinases connues.

Dans les lignes qui vont suivre, nous nous proposons de résumer l'ensemble des connaissances actuelles sur la chitinase exuviale des Insectes, complétées par les résultats de quelques observations personnelles inédites.

1. Moyens d'étude.

On dose les chitinases par différentes méthodes, consistant à faire agir la solution étudiée sur de la chitine purifiée, et à mesurer soit la quantité de produits d'hydrolyse formés au cours de la réaction (dosage de l'acétylglucosamine, ou de la glucosamine après hydrolyse par HCl: PASSONNEAU et WILLIAMS, 1953), soit la quantité de chitine restant après la réaction (méthode néphéométrique, ou dosage de l'azote-chitine: JEUNIAUX, 1951, JEUNIAUX et AMANIEU, 1955).

2. Localisation de la chitinase exuviale.

a) Liquide exuvial.

On a pu étudier jusqu'à présent les propriétés du liquide exuvial de deux Insectes Lépidoptères: *Platysamia cecropia* L. et *Bombyx mori* L.

PASSONNEAU et WILLIAMS (1953) ont prélevé *in situ* le liquide exuvial de nymphes de *Platysamia cecropia* L., en pratiquant une petite incision dans la cuticule nymphale, à l'extrémité de l'abdomen, et en y introduisant une fine pipette. Chaque animal peut fournir jusque 0,1 ml de liquide.

Dès que la nymphe se prépare à la mue, stade indiqué par le décollement de l'hypoderme, le liquide exuvial se présente sous forme d'un gel. Il ne contient que peu d'acétylglucosamine libre, et son activité chitinolytique est nulle. Deux semaines après son apparition, il devient fluide, et on y décèle la présence d'une chitinase active, en même temps qu'une augmentation sensible de l'acétylglucosamine libre. Le sang des mêmes nymphes est par contre dénué de toute activité chitinolytique.

Des quantités plus importantes de liquide exuvial peuvent être obtenus avec *Bombyx mori* L. (JEUNIAUX et AMANIEU, 1955, a et b). Si on ligature des chenilles au dernier stade larvaire, entre la tête et le thorax, 48 heures après la dernière défécation, la mue se

déroule régulièrement. Le rejet de la cuticule et la ligature empêche la mue. Le liquide exuvial est généralement dégluti chez la nymphe. En pratique, on peut recueillir jusque 1 ml

La teneur en chitine est moins aussi élevée (JEUNIAUX et AMANIEU, 1955, nilles ligaturées à un

b) Exuvies.

Peu avant l'ecdysis, la nouvelle cuticule, la teneur de ce liquide est un broyat d'exuvies. Nos collaborateurs ont, en l'absence d'une chitinase exuviale proprement

Toutefois, la cinétique de ces auteurs, bien différente de la chitinase du liquide exuvial de deux chitinases. Les propriétés de ce liquide selon HAMAMURA, sont différentes de celles du liquide exuvial. Les propriétés enzymatiques des exuvies fraîches

c) Teneur en chitine aux différents stades de développement.

Nous avons recherché la teneur en chitine des exuvies de différents stades de développement, tant pour des exuvies fraîches que pour des exuvies pré-nymphes ou de nymphes.

Par rapport au contenu en chitine des exuvies larvaires, on observe une augmentation avec l'âge de la larve. La teneur en chitine de la nymphe, au terme de la mue, est plus élevée.

On observe également

exuviale du Ver à soie et
 étiques analogues à celles

nous proposons de résumer
 sur la chitinase exuviale
 de quelques observations

de.

es méthodes, consistant à
 chitine purifiée, et à mesu-
 rages effectués au cours de
 l'analyse formés au cours de
 l'analyse, ou de la glucosamine
 (et WILLIAMS, 1953), soit
 par réaction (méthode néphélo-
 métrique) (JEUNIAUX, 1951, JEUNIAUX

Chitinase exuviale.

Propriétés du liquide exuvial
 de *Papilio cecropia* L. et *Bombyx*

Le liquide exuvial prélevé *in situ* le liquide
 de *Papilio cecropia* L., en pratiquant une
 incision, à l'extrémité de l'ab-
 domène. Chaque animal peut

être mue, stade indiqué par le
 liquide exuvial se présente sous
 forme d'acétylglucosamine libre,

Deux semaines après son
 mue, la présence d'une chi-
 tinase, augmentation sensible de
 la même nymphettes est par
 réaction chimique.

Le liquide exuvial peuvent être
 analysés (et AMANIEU, 1955, a et b).
 Au stade larvaire, entre la tête
 et l'abdomen, la mue se

déroule régulièrement dans les 48 heures qui suivent, mais le
 rejet de la cuticule larvaire ne peut avoir lieu. D'autre part, la
 ligature empêche la résorption du liquide exuvial, qui est norma-
 lement dégluti chez cette espèce. Le liquide exuvial est par consé-
 quent accumulé dans le sac de cuticule larvaire entourant la
 nymphe. En pratiquant une incision dans le tégument, on peut
 recueillir jusque 1 ml de liquide exuvial par individu ligaturé.

La teneur en chitinase du liquide exuvial de *B. mori* est au
 moins aussi élevée que celle du liquide exuvial de *P. cecropia*
 (JEUNIAUX et AMANIEU, *l.c.*). Elle ne varie guère d'un lot de che-
 nilles ligaturées à un autre.

b) Exuvies.

Peu avant l'ecdysis, le liquide exuvial est résorbé soit à travers
 la nouvelle cuticule, soit par déglutition. Mais une certaine quan-
 tité de ce liquide reste adhérente à l'exuvie. C'est en effet dans
 un broyat d'exuvies larvaires de *B. mori* que HAMAMURA et ses
 collaborateurs ont, pour la première fois, mis en évidence la pré-
 sence d'une chitinase, que nous avons retrouvée dans le liquide
 exuvial proprement dit.

Toutefois, la cinétique de la chitinase d'exuvies, serait, d'après
 ces auteurs, bien différente de celle que nous avons observée pour
 la chitinase du liquide exuvial. Cela pourrait suggérer l'existence
 de deux chitinases différentes. Mais nous montrerons ci-dessous
 que les propriétés de la chitinase d'un extrait d'exuvies, préparé
 selon HAMAMURA, sont en réalité identiques à celles de la chitinase
 du liquide exuvial. Il est donc légitime de prendre, comme témoin
 des propriétés enzymatiques du liquide exuvial, celles des extraits
 aqueux d'exuvies fraîches.

c) Teneur en chitinase des extraits d'exuvies, rejetées à dif- férents stades de développement.

Nous avons recherché la présence de chitinase dans des extraits
 d'exuvies de différents Insectes. Tous les tests ont été positifs,
 tant pour des exuvies de jeunes larves que de larves âgées, de
 prénymphe ou de nymphes (Tableau 1).

Par rapport au poids frais d'exuvies, la teneur en chitinase
 des exuvies larvaires de *Bombyx mori* semble indépendante de
 l'âge de la larve. Les exuvies prénympheales (rejetées par la jeune
 nymphe, au terme du 5^e âge) sont toutefois nettement plus riches.

On observe également une augmentation de la teneur en chiti-

nase des exuvies chez *Tenebrio molitor*, où un broyat de 300 mg d'exuvies nymphales est 5 fois plus actif qu'un même broyat de 300 mg d'exuvies larvaires.

Ces différences quantitatives semblent devoir être attribuées à une différence de surface des exuvies. La surface interne d'une exuvie de nymphe de *Tenebrio* est assurément plus étendue que celle d'une larve et retient plus de liquide exuvial. De même, une larve de Phasme abandonne des exuvies très légères et de grande surface; la teneur en chitinase d'un lot de ces exuvies est effectivement beaucoup plus élevée que celle d'un lot, de poids identique, d'exuvies larvaires de Criquet (Tableau 1).

3. Distribution systématique.

La mise en évidence de chitinase dans le liquide exuvial a pu être faite pour la nymphe de *Platysamia cecropia* L. et pour la larve (prénymphe) de *Bombyx mori* L.

A défaut de liquide exuvial prélevé *in situ*, on peut démontrer la généralité de la présence de chitinase exuviale chez les Insectes, en prenant pour témoin l'activité enzymatique d'extraits aqueux d'exuvies. Nous avons testé l'activité chitinolytique des exuvies de 10 espèces différentes: 7 Coléoptères, 1 Orthoptère, 1 Chéleutop- tère et 1 Lépidoptère. Les exuvies larvaires ou nymphales ont été recueillies deux fois par jour et transportées aussitôt en gla- cière. Les lots d'exuvies ont été broyés en présence de sable lavé, dans de l'eau bidistillée. Après centrifugation (13.000 tours/minute pendant 20 minutes), le liquide surnageant est limpide et à peine coloré. On dose la chitinase par la méthode néphélométrique (Tableau 1).

On constate que, chez toutes les espèces étudiées, les broyats d'exuvies présentent une activité chitinolytique évidente. L'inter- vention d'une chitinase au moment de la mue semble bien être un phénomène général et commun à tous les Insectes.

4. Cinétique.

La chitinase exuviale de *Bombyx mori* est très thermolabile: 8 ml de liquide exuvial dilué au 1/6 et chauffés pendant deux heures à 70° C. ne possèdent plus d'activité chitinolytique. La même sensibilité à l'action de la chaleur a été observée pour la chitinase exuviale de *Tenebrio molitor*.

Tableau 1. — Acti

Espèce
Lépidoptère
<i>Bombyx mori</i> L.
»
»
Coléoptères:
<i>Tenebrio molitor</i> L.
»
»
<i>Tenebrio obscurus</i> L.
<i>Tribolium confusum</i> DUAL.
<i>Dermestes frischii</i> KUGELANN
<i>Dermestes lardarius</i> DEGENER
<i>Dermestes maculatus</i> DEGENER
<i>Timarcha tenebricosus</i>
Orthoptère:
<i>Locusta migratoria gratorioïdes</i> R. et
Chéleutop- tère:
<i>Carausius morosus</i> L.

(1) Conditions exp
 4 ml d'extra
 1 ml de sus
 1 ml de tam
 tions: 5.4 à
 1 grain de t

où un broyat de 300 mg
if qu'un même broyat de

t devoir être attribuées à
La surface interne d'une
trément plus étendue que
le exuvial. De même, une
très légères et de grande
e ces exuvies est effective-
n lot, de poids identique,
1).

matique.

s le liquide exuvial a pu
ia cecropia L. et pour la

in situ, on peut démontrer
exuviale chez les Insectes,
matique d'extraits aqueux
tino-lytique des exuvies de
Orthoptère, 1 Chéleutop-
vaires ou nymphales ont
nsportées aussitôt en gla-
en présence de sable lavé,
ation (13.000 tours/minute
ant est limpide et à peine
méthode néphélométrique

èces étudiées, les broyats
lytique évidente. L'inter-
la mue semble bien être
les Insectes.

Tableau 1. — *Activité chitinolytique d'extraits aqueux d'exuvies.*

Espèce	Stade	Poids d'exuvies dans 10 ml d'eau	Variation du trouble de chitine en présence de 4 ml d'extrait (1) Durée d'incubation:	
			2 heures	7 heures
Lépidoptère :				
<i>Bombyx mori</i> L.	larvaire (fin 3 ^e âge)	500 mg	5 %	12 %
» »	larvaire (fin 4 ^e âge)	1 gr	9 %	20 %
» »	prénymphal (fin 5 ^e âge)	1 gr	22 %	57 %
Coléoptères :				
<i>Tenebrio molitor</i> L.	larvaire	300 mg	14.5 %	35 %
» »	prénymphal	300 mg	15 %	37.5 %
» »	nymphal	300 mg	77 %	solubili- sation complète
<i>Tenebrio obscurus</i> F.	larvaire	300 mg	20 %	40 %
<i>Tribolium confusum</i> DUVAL	nymphal	100 mg	49 %	solubili- sation complète
<i>Dermestes frischii</i> KUGELANN	larvaire	120 mg	11 %	25 %
<i>Dermestes lardarius</i> L.	larvaire	70 mg	—	10 %
<i>Dermestes maculatus</i> DEGEER	larvaire	70 mg	—	9 %
<i>Timarcha tenebricosa</i> F.	nymphal	100 mg	6 %	14 %
Orthoptère :				
<i>Locusta migratoria mi- gratorioides</i> R. et F.	larvaire	300 mg	8 %	17 %
Chéleutoptère :				
<i>Carausius morosus</i> BR.	larvaire	300 mg	70 %	solubili- sation complète

(1) Conditions expérimentales :

mori est très thermolabile :
et chauffés pendant deux
activité chitinolytique. La
ur a été observée pour la

- 4 ml d'extrait aqueux d'exuvies ;
- 1 ml de suspension de chitine pulvérisée (1.8 à 2 mg de chitine) ;
- 1 ml de tampon Citrate-NaOH 0.6 M, pH 5.2 (pH final des solu-
tions : 5.4 à 5.5) ;
- 1 grain de thymol ; en tubes scellés et couchés, à 37°C.

Le pH optimum de la chitinase exuviale est situé aux environs du pH 5.4 (pour *Bombyx mori*) ou du pH 4.95 (pour *Tenebrio molitor*). Dans les deux cas, l'activité de l'enzyme est nettement réduite aux pH inférieurs à 4.6 et supérieurs à 7 (JEUNIAUX et AMANIEU, 1955; JEUNIAUX, 1955).

La température optimale est de 37° C. A partir de 45° C., l'activité est rapidement détruite pendant les premières heures d'incubation.

Ces propriétés cinétiques sont semblables à celles des autres chitinases connues, mais différentes de celles décrites par HAMAMURA et KANEHARA (1940, 1954) pour la chitinase d'un extrait d'exuvies larvaires de *Bombyx mori*. D'après ces auteurs, le pH optimum serait beaucoup plus alcalin (8.3) et la température optimale plus élevée (50° C.). Nous avons comparé, au cours d'une même expérience, l'influence du pH et de la température sur une chitinase de liquide exuvial, obtenu par notre méthode de ligatures, et sur la chitinase d'un extrait aqueux d'exuvies, préparé selon HAMAMURA. L'activité chitinolytique a été dosée par la méthode néphélométrique (1). Les résultats sont présentés dans la fig. 1.

On constate que l'influence du pH sur le déroulement de la chitinolyse est identique pour les deux solutions enzymatiques. L'étude de l'influence de la température donne lieu à la même constatation : la chitinase des deux solutions présente une activité optimale aux environs de 37° C., et est rapidement inhibée et détruite au delà de 45° C.

Nous pouvons donc conclure que les observations publiées par HAMAMURA et KANEHARA sont inexactes à ce point de vue. La chitinase du liquide exuvial est identique à celle des extraits aqueux d'exuvies. La chitinase exuviale de *Bombyx mori* et de *Tenebrio molitor* ne diffère guère des autres chitinases, sous le rapport de leur activité en fonction du pH et de la température d'incubation.

(1) Au cours de recherches antérieures, (JEUNIAUX et AMANIEU, 1955), nous avons étudié l'influence du pH sur la chitinase du liquide exuvial, en dosant la chitinase par estimation de l'azote-chitine restant après incubation. Au cours des expériences présentées ici, nous avons employé la méthode néphélométrique après avoir adsorbé la chitinase sur de la chitine pulvérisée. Après centrifugation, on élimine le liquide surnageant (contenant les substances responsables du noircissement intense de la solution pendant l'incubation). Le culot de chitine, sur lequel la presque totalité de la chitinase est adsorbée, est remis en suspension dans un volume déterminé de tampon, et l'hydrolyse de la chitine peut être aisément suivie au néphélomètre.

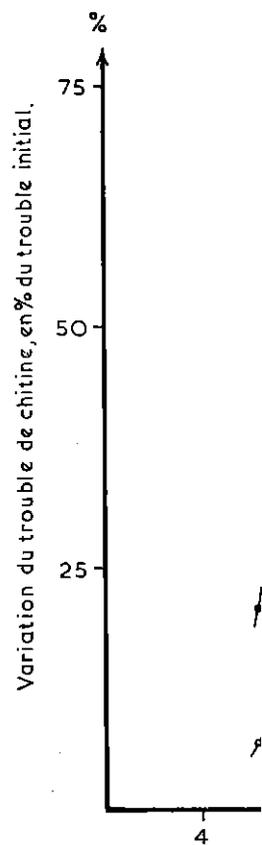


Fig. 1: Influence de la température sur la chitinase des deux chitinases.

—●— liquide exuvial
- - -○- - - extrait aqueux d'exuvies (60)

Température d'incubation (°C)

iale est situé aux environs
u pH 4.95 (pour *Tenebrio*
de l'enzyme est nettement
périeurs à 7 (JEUNIAUX et

C. A partir de 45° C.,
lant les premières heures

lables à celles des autres
celles décrites par HAMA-
la chitinase d'un extrait
d'après ces auteurs, le pH
3.3) et la température opti-
comparé, au cours d'une
de la température sur une
notre méthode de ligatures,
d'exuvies, préparé selon
été dosée par la méthode
présentés dans la fig. 1.

sur le déroulement de la
x solutions enzymatiques.
re donne lieu à la même
tions présente une activité
est rapidement inhibée et

observations publiées par
s à ce point de vue. La
à celle des extraits aqueux
Bombyx mori et de *Tenebrio*
inases, sous le rapport de
température d'incubation.

(JEUNIAUX et AMANIEU, 1955),
chitinase du liquide exuvial,
ote-chitine restant après incu-
s ici, nous avons employé la
é la chitinase sur de la chi-
limine le liquide surnageant
noircissement intense de la
chitine, sur lequel la presque
is en suspension dans un vo-
de la chitine peut être aisé-

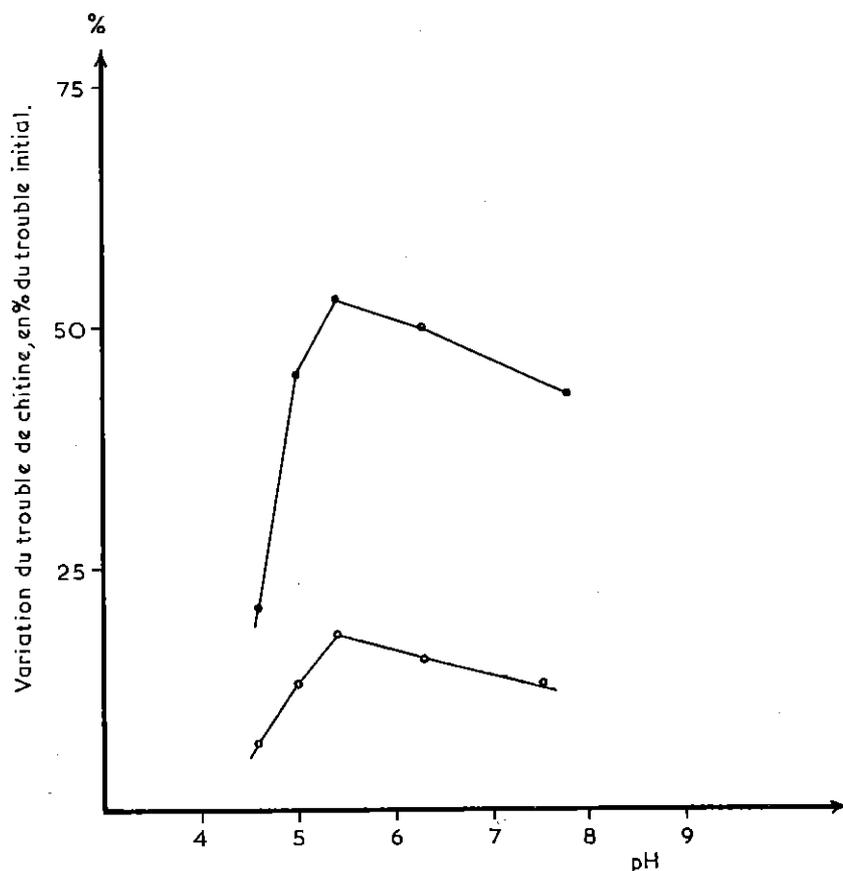


Fig. 1: Influence du pH sur le déroulement de la chitinolyse, pour deux chitinases exuviales d'origines différentes.

- liquide exuvial (chenilles ligaturées de *Bombyx mori*)
4 heures d'incubation.
- extrait aqueux d'exuvies larvaires de *B. mori*
(60 gr. d'exuvies dans 60 ml. d'eau)
6 heures d'incubation.

Température d'incubation: 36° C.

Résumé.

1° Il est prouvé que le liquide exuvial des Insectes, sécrété peu avant la mue, contient une chitinase. Celle-ci dissout une partie importante des strates internes de la vieille cuticule (endocuticule). Chez *Platysamia cecropia* L., le liquide exuvial est d'abord sécrété sous forme de gel, inactif au point de vue enzymatique.

2° Les extraits aqueux d'exuvies larvaires et nymphales sont doués de propriétés chitinolytiques, dues à la présence de liquide exuvial adhérant à la surface interne des exuvies. Certaines exuvies, telles que celles des nymphes de *Tenebrio* et des larves de *Carausius*, sont particulièrement riches en chitinase exuviale.

3° Chez toutes les espèces d'Insectes étudiées jusqu'à présent, on a pu mettre en évidence l'intervention d'une chitinase au moment de la mue.

4° La cinétique de la chitinase des exuvies ou du liquide exuvial de *Bombyx mori* et de *Tenebrio molitor* est identique, et ne diffère guère de celle des autres chitinases connues (pH optimum : entre 4.9 et 5.5 ; température optimale : 37° C.).

BIBLIOGRAPHIE

- CHAUVIN, R., 1949, *Physiologie de l'Insecte*. Paris, Institut. Nat. Rech. Agr.
- HAMAMURA, Y. et KANEHARA, Y., 1940, Enzymatic studies on exuvial fluid of *Bombyx mori*. II. Chitinase. *J. agr. Chem. Soc. Japan*, **16**, 907.
- HAMAMURA, Y. IDA, S., OTSUKA, M., KANEHARA, Y. et ITO, S., 1954, The enzymatic study on the exuvial fluid of Silkworm, *Bombyx mori* L. *Bull. Faculty Textile Fibers, Kyoto Univ.*, **1**, 127.
- JEUNIAUX, Ch., 1951, Une méthode de dosage des chitinases. *Arch. internat. Physiol.*, **59**, 242.
- JEUNIAUX, Ch., 1955, Propriétés chitinolytiques des extraits aqueux d'exuvies larvaires, prénympales et nymphales de *Tenebrio molitor* L. *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **63**, 114.
- JEUNIAUX, Ch. et AMANIEU, M. 1955, Mise en évidence d'une chitinase dans le liquide exuvial de *Bombyx mori* L. *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **63**, 94.
- JEUNIAUX, Ch. et AMANIEU, M., 1955, Propriétés chitinolytiques du liquide exuvial du Ver à soie (*Bombyx mori* L.). *Experientia*, **11**, 195.
- PASSONNEAU, J.V. et WILLIAMS, C.M., 1953, The moulting fluid of the *Cecropia* Silkworm. *Journ. Exper. Biol.*, **30**, 545.
- RENAUD, L., 1949, Le cycle des réserves organiques chez les Crustacés Décapodes. *Ann. Inst. Ocean.*, **24**, 259.
- TOWER, W.L., 1906, Observations on the changes in the hypodermis and cuticula of Coleoptera during ecdysis. *Biol. Bull.*, **10**, 176.
- WIGGLESWORTH, V.B., 1953, The physiology of the cuticle and of exdysis in *Rhodnius prolixus*; with special reference to the fonction of oenocytes and dermal glands. *Quart. J. Micr. Sci.*, **76**, 269.
- WIGGLESWORTH, V.B., 1948, The insect cuticle. *Biol. Rev.*, **23**, 408.
- WIGGLESWORTH, V.B., 1954, *The physiology of Insect metamorphosis*. Cambridge, University Press.

Institut Léon Fredericq,
Université de Liège,
Chimie Physiologique.