

l'électron et du photon ; 1938 ;	60 »
s électrolytes forts ; 1938 ; 52 p.	30 »
ométrie géométrique, les amides	50 »
anitriles-1 ; 1939 ; 33 p. ....	20 »
convergentes. Application aux	
algébriques en $y$ et $\frac{dy}{dx}$ 1939 ; 65 p	30 »
nergie ; 1940 ; 30 p .....	20 »
que entre des organismes végé-	
que analogue ? Des propriétés	
rielles, analogues, de produits	
systematique des organismes	100 »
nis des homographies cycliques	30 »
déterminants du relief belge ;	20 »
du mouvement de l'air dans les	
ondes du front polaire ; 1941 ;	50 »
tion des Isotopes de Carbone ;	40 »
e comparée de l'excrétion chez	60 »
p. ....	
es (dérivés résineux, matières	
aceutiques) des Guttiféracées ;	120 »
ymnoblastiques ; 1942 ; 4 pl.,	80 »
strosopique dans l'infra-rouge	
structure des solutions ; 1943 ;	70 »
la formule de Stokes ; 1943 ;	70 »
otonique ; 1945 ; 34 p. ....	20 »
rales des équations $\frac{dy}{dx} = \frac{P(x, y)}{Q(x, y)}$	
lent simultanément $P$ et $Q$ ;	70 »
air l'adsorption ; 1946 ; 2 fig.,	50 »
érie géométrique. Les alcools a	40 »
edogonium ; 1947 ; 8 tabl.,	60 »
ction écologique, la pression	
abl., 5 graph., 56 p. ....	40 »

# Sur la chitinase et la flore bactérienne intestinale des mollusques gastéropodes

PAR

**Charles JEUNIAUX**

*Licencié en Sciences zoologiques.*

Impression décidée le 5 décembre 1953.

Ce mémoire, que j'ai l'honneur de présenter à l'Académie Royale de Belgique, en réponse à la quatrième question posée dans le cadre du Concours annuel de la Classe des Sciences pour 1953, est le fruit de recherches personnelles poursuivies depuis plusieurs années dans les Laboratoires de Biochimie de l'Université de Liège.

Ma plus vive gratitude s'adresse à M. le professeur M. Florin, directeur de ces Laboratoires, qui n'a cessé de me favoriser de ses conseils, de ses encouragements et de son aide généreuse.

Mes vifs remerciements vont également à M. le professeur M. Welsch, directeur des Laboratoires de microbiologie de l'Université de Liège et du C. R. P. A., qui a si aimablement dirigé mes recherches bactériologiques, réalisées dans ses Laboratoires.

Que M. le professeur C. Liébecq et M. le Docteur J. Leclercq trouvent ici l'expression de ma reconnaissance pour l'aide précieuse qu'ils m'ont souvent apportée par leurs directives et leurs conseils judicieux.

Je n'aurais enfin pu poursuivre mes recherches sans l'aide matérielle du Centre National de Biologie Physico-chimique et de l'Institut pour l'Encouragement à la Recherche Scientifique appliquée à l'Industrie et à l'Agriculture (I. R. S. I. A.).

---

INTRODUCTION ET

SOMMAIRE

INTRODUCTION ET POSITION DU PROBLÈME .....	5
I. ORIGINE MICROBIENNE DE LA CHITINASE DE L'ESCARGOT (HELIX POMATIA L.) .....	9
1. Localisation et variations quantitatives de la chitinase dans les organes du système digestif.	
2. La flore bactérienne chitinasique du tube digestif.	
3. Production d'exochitinase par les bactéries du tube diges- tif. — Nature constitutive de cet enzyme.	
4. Influence du liquide intestinal sur la croissance et l'activité des bactéries chitinasiques.	
5. Conclusions.	
II. RECHERCHE SYSTÉMATIQUE DE LA PRÉSENCE DE CHITINASE ET DE BACTÉRIES CHITINASIQUES CHEZ D'AUTRES MOLLUS- QUES GASTÉROPODES .....	37
III. BIBLIOGRAPHIE .....	44

L'adaptation de certain  
trique » telle que cellulose  
un fort intéressant sujet  
La cellulose ou la chitine,  
la trame squelettique d'  
d'animaux, inattaquable  
présents chez les organis  
fraction importante de l  
Le fait pour ceux-ci de  
spécifiquement ces subs  
biochimique au milieu. C  
longtemps comme le résu  
glandes de l'animal lui-  
la faculté de sécréter ces

Il apparaît toutefois q  
dans la lumière de leur  
spécialisés, des microorg  
bénéfice de leur hôte la c  
fournir l'enzyme qu'on le  
d'abeille par les larves c  
réalité par des bactérie  
LOZET et SARLET, 1949).  
classique que les mammi  
grâce à une flore microbi  
de l'intestin. Les Termi  
uniquement de cellulose  
zoaires Flagellates vivan  
1925).

Des cas analogues de s  
xylophage *Cryptocercus*  
chez les larves de quelq  
etc. : BÜCHNER, 1930). Pl  
ont montré l'existence de  
le tube digestif de l'Esca

## Sur la chitinase et la flore bactérienne intestinale des mollusques gastéropodes.

### INTRODUCTION ET POSITION DU PROBLÈME

L'adaptation de certains animaux à une nourriture « excentrique » telle que cellulose, kératine, cire d'abeille ou chitine est un fort intéressant sujet relevant de la biochimie comparée. La cellulose ou la chitine, hauts polymères organiques constituant la trame squelettique d'un nombre considérable de plantes et d'animaux, inattaquables par les enzymes habituellement présents chez les organismes animaux, peuvent constituer une fraction importante de la nourriture de certains d'entre eux. Le fait pour ceux-ci de posséder les enzymes qui décomposent spécifiquement ces substances est un exemple d'adaptation biochimique au milieu. Cette adaptation fut considérée pendant longtemps comme le résultat d'une modification biochimique des glandes de l'animal lui-même, consistant en « l'acquisition de la faculté de sécréter ces enzymes spécifiques » (YONGE, 1937).

Il apparaît toutefois que nombre de ces animaux hébergent, dans la lumière de leur tube digestif ou dans des diverticules spécialisés, des microorganismes susceptibles d'accomplir au bénéfice de leur hôte la digestion du matériel ingéré, ou de leur fournir l'enzyme qu'on leur croit propre. La digestion de la cire d'abeille par les larves de *Galleria melonella* est accomplie en réalité par des bactéries cérolytiques intestinales (FLORKIN, LOZET et SARLET, 1949). Dans le cas de la cellulose, c'est un fait classique que les mammifères ruminants ne digèrent celle-ci que grâce à une flore microbienne cellulasique abritée dans les replis de l'intestin. Les Termites, qui peuvent subsister longtemps uniquement de cellulose pure, doivent leur cellulase aux Protozoaires Flagellates vivant dans leur tube digestif (CLEVELAND, 1925).

Des cas analogues de symbiose ont été décrits chez la Blatte xylophage *Cryptocercus punctulatus* (TRAGER, 1932) ainsi que chez les larves de quelques Coléoptères (Cétoines, Longicornes, etc. : BÜCHNER, 1930). Plus récemment, FLORKIN et LOZET (1950) ont montré l'existence de bactéries produisant une cellulase dans le tube digestif de l'Escargot *Helix pomatia*, bactéries dont la

RE	5
ÈME .....	9
CHITINASE DE L'ESCARGOT .....	9
ntitatives de la chitinase digestif.	
que du tube digestif.	
es bactéries du tube digestif et cet enzyme.	
al sur la croissance et osiques.	
A PRÉSENCE DE CHITINASE CHEZ D'AUTRES MOLLUS- .....	37
.....	44

prolifération « in vitro » est favorisée par l'addition au milieu de culture des sucs digestifs de l'hôte.

A la suite de ces découvertes, il apparaît maintenant qu'on ne peut admettre l'existence d'une sécrétion glandulaire de cellulase par l'animal lui-même que lorsqu'on possède les preuves que l'enzyme, même si on le trouve dans des organes qui sont en communication avec la cavité du tube digestif, n'a pas été produit dans cette cavité par une flore microbienne symbiotique (FLORKIN, 1952).

Cette conclusion doit évidemment être appliquée aux autres cas d'animaux possédant des enzymes capables de dégrader des substances complexes, notamment des chitinases.

On appelle chitinase l'enzyme qui catalyse les premières étapes de la dégradation de la chitine en acétylglucosamine. L'enzyme fut découvert par KARRER et HOFMANN (1929) dans le liquide intestinal de l'Escargot de Bourgogne *Helix pomatia* L. On trouva ensuite un ferment chitinolytique dans divers extraits végétaux (émulsine des noyaux de prunes, extraits d'*Aspergillus oryzae*, peaux d'amandes douces : GRASSMAN et al., 1934 ; ZECHMEISTER et al., 1932). Bien que, depuis BENEKE (1905), des bactéries chitinolytiques aient été décrites et isolées en abondance des eaux et des sols (notamment par BÜCHERER, 1933, 1935 ; JOHNSON, 1932 ; HOCK, 1940, etc.), les premiers filtrats stériles d'exochitinase microbienne ne furent préparés qu'en 1950 (JEUNIAUX, 1950 b, 1951) à partir de cultures d'Actinomycètes en milieux fluides à base de chitine pulvérisée.

Au chapitre des chitinases animales, on a souvent cité, (KRUEGER, 1933 ; YONGE, 1937), à la suite de l'Escargot, deux insectes capables de sécréter une chitinase et de digérer la chitine : *Platydemus tricuspidis* (Coléoptère mycétophage) et *Pseudogenia carbonaria* (Hyménoptère ectoparasite d'araignées). Il n'en est cependant rien, et il ne peut s'agir que d'une erreur d'interprétation ou de traduction, colportée de traité en traité. En effet, SCHULZE (1927), cité comme référence par KRUEGER (l. c.) et YONGE (l. c.), élimine lui-même l'hypothèse d'une sécrétion de chitinase par *Platydemus tricuspidis*, en disant : « Die Larve... ist nicht imstande, mit der Nahrung aufgenommenes Pilzchitin aufzulösen und zu einem homogenen Spinnfaden zu verarbeiten ». Quant à l'Hyménoptère *Pseudogenia carbonaria*, il est prématuré de le citer comme exemple d'insecte « sécrétant une

chitinase extra-intestinale » (YONGE (l. c.) et WIGGLESWORTH, 1920). Cette observation occasionnelle sur les larves de ce Pompile, et sur la proie (araignée) par laquelle il paraît bien peu robuste, ne justifie pas l'existence d'une chitinase extra-intestinale non vérifiée expérimentalement. On ne peut classer *P. carbonaria* par conséquent de soumettre à l'expérience.

A côté de l'Escargot, on possède une authentique chitinase appartenant aux genres *Eisenia*, *Lumbricus* et *Albionia* (espèces de Nématodes à chitine : CEY, 1952). Tracey a étudié la cellulase de *Lumbricus terrestris* dans les parois musculaires de l'intestin. Il en a conclu qu'il s'agit de produits par le ver lui-même d'une production concomitante de microorganismes vivants.

On ne connaît rien de la chitinase de l'Escargot. Mais on l'a dénommée cet enzyme et on a admis, sans preuve, qu'il vient de l'hépatopancreas, comme par tous les auteurs et par les observations.

Au cours de recherches nous avons émis l'hypothèse que des bactéries symbiotiques sécrètent la chitinase de l'Escargot. Le but de ces recherches est de nouvelles recherches quantitatives de la chitinase constante et spécifique de l'Escargot, l'élaboration par ces bactéries constitutive, et enfin de la flore intestinale de l'Escargot et de ses bactéries symbiotiques. De cet

ée par l'addition au milieu de  
apparaît maintenant qu'on ne  
rétion glandulaire de cellulase  
on possède les preuves que  
s des organes qui sont en com-  
digestif, n'a pas été produit  
robienne symbiotique (FLOR-  
nt être appliquée aux autres  
mes capables de dégrader des  
des chitinasés.

i catalyse les premières étapes  
acétylglucosamine. L'enzyme  
MANN (1929) dans le liquide  
ogne *Helix pomatia* L. On  
lytique dans divers extraits  
prunes, extraits d'*Aspergillus*  
: GRASSMAN et al., 1934 ;  
que, depuis BENEKE (1905),  
t été décrites et isolées en  
(notamment par BÜCHERER,  
CK, 1940, etc.), les premiers  
robienne ne furent préparés  
à partir de cultures d'Actino-  
de chitine pulvérisée.

es, on a souvent cité, (KRUE-  
de l'Escargot, deux insectes  
e et de digérer la chitine :  
ycétophage) et *Pseudagenia*  
site d'araignées). Il n'en est  
ue d'une erreur d'interpréta-  
e traité en traité. En effet,  
ence par KRUEGER (l. c.) et  
ypothèse d'une sécrétion de  
en disant : « Die Larve...  
g aufgenommenes Pilzchitin  
en Spinnfaden zu verarbei-  
*Pseudagenia carbonaria*, il est  
ple d'insecte « sécrétant une

chitinase extra-intestinale » comme l'ont fait KRUEGER (l. c.), YONGE (l. c.) et WIGGLESWORTH (1947), en se référant à un travail de RAMME (1920). Ce dernier s'est borné en effet à relater une observation occasionnelle sur la structure et le développement des larves de ce Pompile, et à interpréter la consommation complète de la proie (araignée) par la larve, dont les pièces buccales peuvent paraître bien peu robustes, comme pouvant résulter de la sécrétion d'une chitinase extra-intestinale. Cette simple induction, non vérifiée expérimentalement, peut suffire tout au plus à classer *P. carbonaria* parmi les animaux qu'il serait intéressant de soumettre à l'expérimentation.

A côté de l'Escargot, on compte au nombre des animaux possédant une authentique chitinase digestive, des vers annelés appartenant aux genres suivants : *Allobophora*, *Dendroboena*, *Eisenia*, *Lumbricus* et *Octolasion* (TRACEY, 1951), et deux espèces de Nématodes appartenant au genre *Ditylenchus* (TRACEY, 1952). Tracey a étudié la localisation de la chitinase et de la cellulase de *Lumbricus terrestris* ; il a trouvé ces deux enzymes dans les parois musculaires de la première moitié du tronçon intestinal. Il en a conclu que les enzymes sont probablement produits par le ver lui-même, tout en n'excluant pas la possibilité d'une production concomitante de ces mêmes enzymes par des microorganismes vivant dans l'intestin.

On ne connaît rien de l'origine et de la localisation de la chitinase de l'Escargot. Mais depuis que KARRER et HOFMANN (1929) ont dénommé cet enzyme « Ferment des Hepatopancreassaftes », on a admis, sans preuves expérimentales, que la chitinase provient de l'hépatopancréas. Cette assertion fut répétée depuis par tous les auteurs et traités classiques.

Au cours de recherches préliminaires (JEUNIAUX, 1950), nous avons émis l'hypothèse d'un rôle essentiel joué par des bactéries symbiotiques dans la production de la chitinase de l'Escargot. Le but de ce mémoire est d'étayer cette hypothèse par de nouvelles recherches, portant notamment sur les variations quantitatives de la chitinase chez l'Escargot, sur la nature constante et spécifique de la flore bactérienne intestinale, sur l'élaboration par ces bactéries d'une exochitinase de nature constitutive, et enfin sur le rôle favorable qu'exerce le milieu intestinal de l'Escargot sur la prolifération de ces bactéries symbiotiques. De cet ensemble de faits, nous concluerons à

L'origine bactérienne de la chitinase de *Helix pomatia*. L'étude de plusieurs autres Mollusques Gastéropodes conduira enfin à généraliser au groupe des Gastéropodes Pulmonés terrestres (Stylommatophores de LAMEERE, 1933) l'hypothèse, formulée par FLORKIN et LOZET (1949), de l'existence de propriétés biochimiques propres au milieu intestinal de ces Mollusques, permettant la sélection de quelques types bactériens caractéristiques, leur prolifération et leur production de chitinase

## ORIGINE DE LA CHITINASE

### 1. — LOCALISATION DE LA CHITINASE DANS L'ESCARGOT

#### A. TECHNIQUES.

##### 1. Préparation d'extraits

Pour empêcher les coagulations lors des tests enzymatiques, on ajoute à quelques gouttes de chitine (LAMEERE, 1929 ; ZECHMEISTER et al., 1950) des substances organiques troublent rationnel de l'Escargot, les méthodes métriques. On peut les utiliser d'azote.

Le liquide intestinal est précipité rapidement sur du sulfate d'hépatopancréas ne permettant l'adsorption des particules (d'infusoires) et filtration. Ces solutions ne s'écoulent pas « filter cells ». Le liquide est limpide.

Lorsqu'on dose l'activité métrique, on peut utiliser des tubes préalablement stérilisés, en milieu réactionnel, avant l'ajout du liquide. Nous avons vérifié que la chitine bactérienne dans ces conditions à 37° C.