

e *Helix pomatia*. L'étude
ropodes conduira enfin à
odes Pulmonés terrestres
33) l'hypothèse, formulée
istence de propriétés bio-
l de ces Mollusques, per-
actériens caractéristiques,
e chitinase.

ORIGINE MICROBIENNE DE LA CHITINASE DE L'ESCARGOT (*Helix pomatia*).

1. — LOCALISATION ET VARIATIONS QUANTITATIVES DE LA CHITINASE DANS LES ORGANES DU SYSTÈME DIGESTIF.

A. TECHNIQUES.

1. Préparation d'extraits enzymatiques stériles.

Pour empêcher les développements bactériens au cours des tests enzymatiques, on a coutume d'ajouter au milieu réactionnel quelques gouttes de chloroforme ou de toluol (KARRER et al., 1929 ; ZECHMEISTER et al., 1931, 1932, 1939, etc.). Ces solvants organiques troublent rapidement les solutions de liquide intestinal de l'Escargot, les rendant impropres aux mesures néphéométriques. On peut les utiliser dans le cas des mesures par dosages d'azote.

Le liquide intestinal d'Escargot, dilué ou non, filtre relativement rapidement sur les bougies de porcelaine. Les broyats d'hépatopancréas ne peuvent être filtrés sur bougie qu'après adsorption des particules en suspension sur « filter cells » (terre d'infusoires) et filtration sur Büchner. La chitinase que renferment ces solutions ne s'adsorbe ni sur la bougie filtrante ni sur les « filter cells ». Le liquide filtré est rigoureusement stérile et limpide.

Lorsqu'on dose l'activité chitinasique par la méthode néphéométrique, on peut utiliser des solutions qui n'ont pas été préalablement stérilisées, en ajoutant un petit grain de thymol au milieu réactionnel, avant de sceller le tube où a lieu la réaction. Nous avons vérifié qu'il ne se produit aucun développement bactérien dans ces conditions, endéans 24 heures d'incubation à 37° C.

2. Dosage des chitinases.

Lorsqu'on laisse agir une chitinase sur une suspension de chitine pas trop dense, on observe aisément une clarification progressive de la suspension. Cette diminution de trouble est due à la solubilisation de la chitine par dégradation en sucres aminés (acétylglucosamine : KARRER, 1929). On a coutume de mesurer l'activité des chitinases en dosant les produits d'hydrolyse (KARRER et al., 1929 ; GRASSMAN et al., 1934 ; ZECHMEISTER et al., 1931, 1932, 1939 ; TRACEY, 1951).

Dans l'étude d'une hydrolyse qui peut être le résultat d'une succession de réactions catalysées par des enzymes différents (ZECHMEISTER et TOTH, 1939), il nous a paru préférable de mesurer la disparition du substrat plutôt que l'apparition des produits finaux, en dosant la chitine avant et après la réaction, soit par une méthode chimique, soit par une méthode néphélométrique.

Méthode chimique : On arrête la réaction par addition de soude bouillante (Conc. finale : 5 %). Une ébullition d'une demi-heure solubilise complètement les protéines et n'altère pas la chitine. Après centrifugations et lavages, on minéralise le résidu et on en dose l'azote par Kjeldahl.

Méthode néphélométrique : A l'aide du néphélomètre de Pulfrich (filtre vert L₂), on peut mesurer le trouble d'une suspension de chitine. La mesure de trouble est une fonction pratiquement linéaire de la concentration en chitine pour des suspensions contenant moins de 0.75 mg. de chitine pulvérisée par ml., en liquides incolores comme en liquides colorés. L'emploi de cette méthode plus rapide et plus simple, quoique suffisamment rigoureuse, a été justifiée dans une publication antérieure (JEUNIAUX, 1951). La variation du trouble de la suspension de chitine au cours de la réaction, calculée en % du trouble initial, mesure l'activité de l'enzyme.

Unité arbitraire de chitinase : Pour comparer plus aisément les résultats quantitatifs, nous avons établi des courbes étalon permettant de rapporter la quantité de chitine solubilisée en un temps et dans des conditions données à la quantité de chitinase présente dans le milieu réactionnel (Fig. 1). Les courbes étalon ont été établies à l'aide d'un mélange de liquides stomacaux de

8 Escargots adultes, prélevés après leur dernier repas. Les macaux d'escargots prélevés ont une activité enzymatique à reproduire les mêmes co

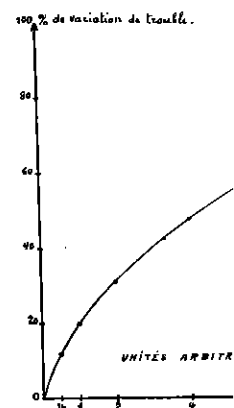


FIG. 1. — Courbe étalon

Nous avons choisi une unité arbitraire définie comme suit : trouble d'une solution limpide, obtenue en diluant à 20 % de la suspension de chitine après 1 heure d'incubation (0.1 M) à 37.5° C, sans ajout de soude (volume total du milieu réactionnel = 1 ml).

3. Préparation et conditions des tests enzymatiques.

Nous avons, par une méthode soignée, purifié la chitine des escargots. Une suspension de fin chitine est obtenue en versant les bandes de chitine dans l'acide sulfurique, puis en diluant avec un volume d'eau. La chitine est lavée par centrifugation

ase sur une suspension de e aisément une clarification e diminution de trouble est e par dégradation en sucres R, 1929). On a coutume de osant les produits d'hydrolyse t al., 1934 ; ZECHMEISTER et 51).

i peut être le résultat d'une par des enzymes différents s a paru préférable de mesu- que l'apparition des produits et après la réaction, soit par e méthode néphélométrique.

action par addition de soude ébullition d'une demi-heure es et n'altère pas la chitine. minéralise le résidu et on en

du néphélomètre de Pulfrich trouble d'une suspension de une fonction pratiquement e pour des suspensions conte- ulvrisée par ml., en liquides L'emploi de cette méthode suffisamment rigoureuse, a ntérieure (JEUNIAUX, 1954). on de chitine au cours de initial, mesure l'activité de

comparer plus aisément les abli des courbes étalon per- le chitine solubilisée en un s à la quantité de chitinase (Fig. 1). Les courbes étalon e de liquides stomacaux de

8 Escargots adultes, prélevés pendant leur repos diurne, 48 heures après leur dernier repas. Nous avons vérifié que les liquides stomacaux d'escargots prélevés dans ces conditions présentent une activité enzymatique à peu près constante, et permettent de reproduire les mêmes courbes étalon.

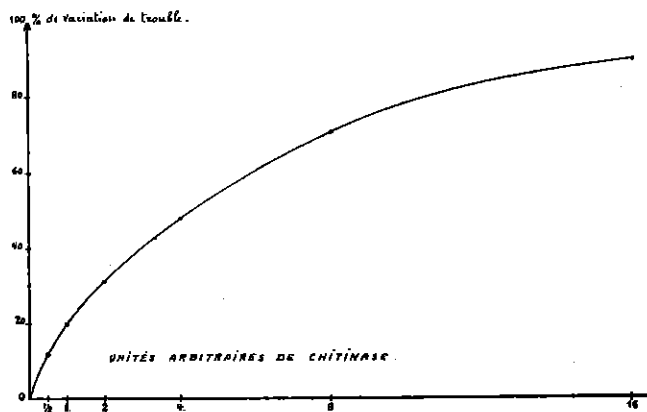


FIG. 1. — Courbe étalon pour la chitinase de l'Escargot.
(Conditions expérimentales dans le texte).

Nous avons choisi arbitrairement une « Unité-chitinase » définie comme suit : « la quantité de chitinase présente dans une solution limpide, qui provoque une variation de trouble de 20 % de la suspension de chitine pulvrisée (0.75 mg. par ml.), après 1 heure d'incubation, au pH 5.3 (Tampon Citrate-NaOH 0.1 M) à 37.5° C, sans agitation, en tubes scellés et couchés (volume total du milieu réactionnel : 6 ml) ».

3. Préparation et conservation de la chitine utilisée pour les tests enzymatiques.

Nous avons, par la méthode classique de BENEKE (1905), purifié la chitine des carapaces de Homards et de Langoustines. Une suspension de fines particules est ensuite préparée en dissolvant les bandes de chitine pure dans une solution à 50 % d'acide sulfurique, puis en diluant la solution sirupeuse par 10 fois son volume d'eau. La chitine précipite en fines particules, qu'on lave par centrifugations successives jusqu'à ce que tout l'acide

soit éliminé. La chitine pulvérisée, en suspension dans l'eau distillée, peut être ensuite stérilisée à l'autoclave et conservée indéfiniment en glacière. Dix litres de suspension bien homogène, contenant 5 mg. de chitine pure par ml., ont constitué notre stock standard, suffisant pour tous nos tests enzymatiques.

B. LOCALISATION DE LA CHITINASE.

1. Extraits de tube digestif lavé.

Les tubes digestifs de 10 escargots sont vidés de leur contenu et soigneusement lavés à l'eau distillée. On les broie au mixer dans de l'eau distillée. Le broyat est filtré sur papier puis sur bougie. L'activité de cet extrait, mesurée par la méthode néphélométrique, après 24 heures d'incubation, est pratiquement nulle. L'addition d'un peu de liquide intestinal frais à l'extrait de tissus n'active pas un éventuel proferment.

2. Extraits de glandes salivaires.

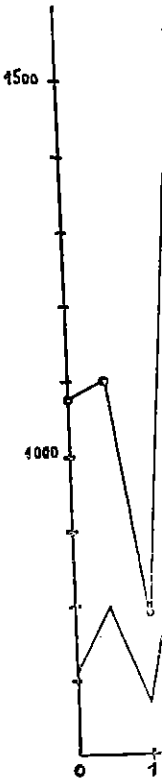
Les glandes salivaires de 18 escargots sont broyées au pilon en présence d'eau. Après centrifugation, on teste l'activité chitinasique de la solution. Les résultats restent négatifs, après 24 heures d'incubation, même en présence d'un peu de liquide intestinal frais.

3. Extraits d'hépatopancréas.

Les hépatopancréas de 22 escargots sont broyés au mixer dans 150 ml. d'eau. Le contenu intestinal de ces 22 escargots est également dilué dans 150 ml. d'eau (dilution 1/5). Les liquides sont filtrés sur Büchner puis sur bougie. Nous appellerons « extrait d'hépatopancréas » et « liquide intestinal », les filtrats stériles, dilués tous deux par un même volume d'eau.

On dose l'activité chitinasique de ces extraits par la méthode néphélométrique. D'autre part, le filtrat hépatopancréatique est mis en présence de quelques gouttes de liquide intestinal frais pendant plusieurs heures, soit à 0°C, soit à 37°C, afin de permettre l'activation d'un éventuel proferment.

On constate (tableau 1) que les extraits d'hépatopancréas, réalisés dans les conditions précitées, manifestent une action



Activité de la lipase, dans
de la digestion.
En abscisses : temps (en he
(D



Activité des enzym
premi
(D'aprè
S = Sacchara

FIG. 2 : Variat
chez

(D'après KRIJGSMAN 192

ACTÉRIENNE INTESTINALE

en suspension dans l'eau à l'autoclave et conservée en suspension bien homogène, 10 ml., ont constitué notre matériel pour nos tests enzymatiques.

SE.

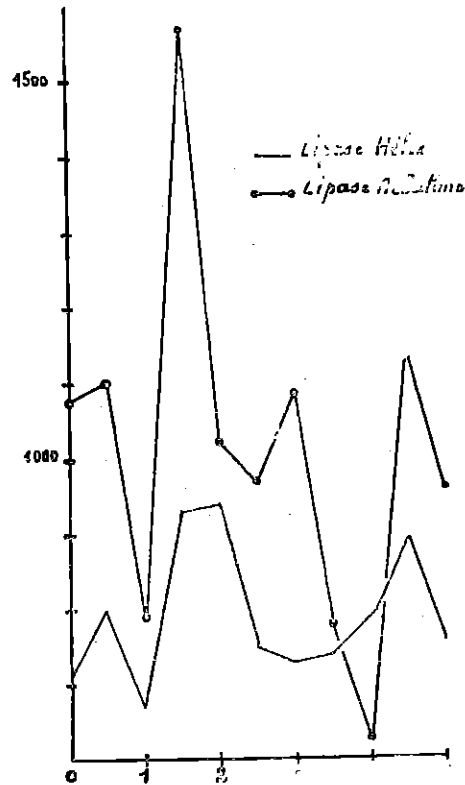
Les escargots sont vidés de leur contenu intestinal. On les broie au mixer et le liquide est filtré sur papier puis sur papier Whatman. La suspension mesurée par la méthode néphelométrique, est pratiquement équivalente à l'extrait intestinal frais à l'extrait de porc fermenté.

Les escargots sont broyés au pilon en présence de leur contenu intestinal. On teste l'activité chitinasique. Les résultats sont négatifs, après 24 heures de digestion dans un peu de liquide intestinal.

Les escargots sont broyés au mixer et le liquide intestinal est dilué (dilution 1/5). Les liquides obtenus sont appelés « extrait intestinal », les filtrats stériles, obtenus par la méthode de l'acide d'eau.

Les extraits par la méthode de l'acide hépatopancréatique est obtenu à partir de liquide intestinal frais et est incubé à 37°C, afin de permettre le développement du ferment.

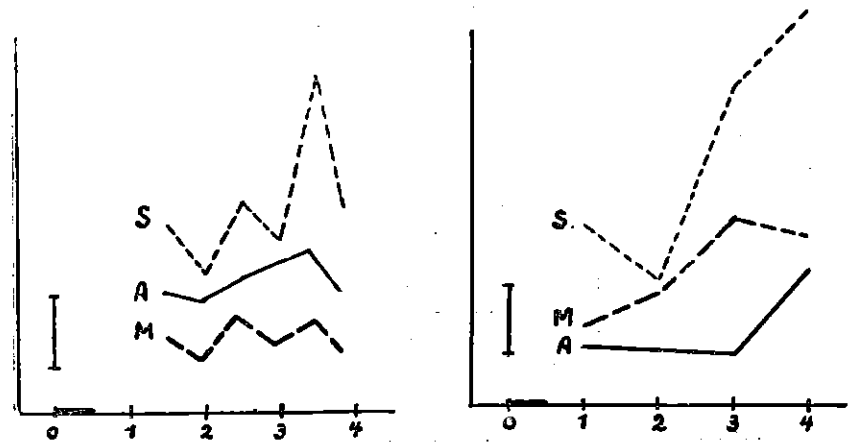
Les extraits d'hépatopancréas, obtenus par la méthode de l'acide, manifestent une action



Activité de la lipase, dans l'hépatopancréas, pendant les premières heures de la digestion.

En abscisses : temps (en heures) après la fin du jeûne.

(D'après VAN WEEL 1950 et KRIJGSMAN 1928).



Activité des enzymes dans le liquide stomacal, pendant les premières heures de la digestion.

(D'après POSTMA et WITMER (1949).

S = Saccharase — M = Maltase — A = Amylase.

FIG. 2 : Variations quantitatives de différents enzymes chez *H. pomatia* et *A. fulica*.

(D'après KRIJGSMAN 1928, VAN WEEL 1950 ; POSTMA et WITMER 1949).

chitinasique évidente (1). Celle-ci est néanmoins très faible en comparaison de l'action chitinasique du liquide intestinal, identiquement dilué (2). L'activité chitinasique de l'extrait hépatopancréatique est plus faible que celle d'une dilution au 1/20 de l'extrait de liquide intestinal (3). Enfin, l'addition d'une petite quantité de solution de liquide intestinal actif (dilution finale : 1/20) à l'extrait d'hépatopancréas, n'est pas accompagnée d'une augmentation de l'activité chitinasique (4). Il n'y a donc pas d'activation de proferment par une kinase.

Nous avons vérifié la différence de concentration de la chitinase dans le liquide intestinal et dans l'hépatopancréas au cours de l'expérience suivante. Les liquides stomacaux de 3 escargots sont recueillis, mesurés, et dilués par une fois leur volume en eau distillée. Les hépatopancréas de ces mêmes escargots soigneusement débarrassés de tout autre organe, sont rincés, séchés sur papier filtre, et broyés dans un mortier, dans le même volume d'eau que celui utilisé pour diluer le liquide intestinal. Après centrifugation, on dose l'activité chitinasique par la méthode chimique (KJELDAHL). (Tableau 2).

TABLEAU 1. — Dosage de chitinase dans des extraits d'hépatopancréas.

n° (voir texte)	liquides testés.	Variations de trouble (moyenne de 2 dosages) (méthode néphélométrique)
1	extrait d'hépatopancréas	20%
2	liquide intestinal	92%
3	{ liquide intestinal (dilution 1/20 dans H ₂ O)	36%
4	{ liquide intestinal (dilution 1/20 dans extrait d'hépatopancréas)	39%

Conditions : 1 ml de suspension standard de chitine
1 ml de tampon Sørensen-phosphates au pH 6 (0.2 M).
4 ml de solution enzymatique,
en tubes scellés, à 37° C, après 24 h. d'incubation.

TABLEAU 2. — Activité d'hépatopancréas

Solution enzymatique
liquide intestinal
Extrait d'hépatopancréas

Conditions : 0.05 gr de chitine
2 ml de tampon C
3 ml de solution
6 gouttes de toluène
10 ml d'eau ; en 1

(1) Azote, en mgr. par prise de

Nous constatons que le chitine, l'extrait hépatopancréatique (1929) a établi, pour la mesure de l'activité de chitine solubilisée, une courbe étalon ainsi établie pendant 24 heures correspondant approximativement 20 fois moins à l'activité de chitine purifiée. Chez l'Escargot, la glande chitinasique est donc 20 fois moins active que celle de l'estomac.

4. Localisation de la chitinase

Nous avons recherché la localisation de la chitinase est le plus abondante dans l'intestin.

Technique et résultats : Les contenus de l'intestin moyen (caecum) et de l'intestin postérieur de plastron ont été analysés. Ces contenus sont distillés, par rapport à l'eau, et on dose l'activité chitinasique.

est néanmoins très faible
sique du liquide intestinal,
é chitinasique de l'extrait
que celle d'une dilution au
(3). Enfin, l'addition d'une
de intestinal actif (dilution
réas, n'est pas accompagnée
chitinasique (4). Il n'y a donc
une kinase.

concentration de la chiti-
s l'hépatopancréas au cours
s stomacaux de 3 escargots
r une fois leur volume en
es mêmes escargots soigneu-
ane, sont rincés, séchés sur
tier, dans le même volume
le liquide intestinal. Après
chitinasique par la méthode

chitinasique dans des extraits
réas.

	Variations de trouble (moyenne de 2 dosages) (méthode néphélométrique)
s	20%
	92%
D)	36%
ait	39%

chitine
nates au pH 6 (0.2 M).

h. d'incubation.

TABLEAU 2. — *Activité chitinasique comparée d'extraits
d'hépatopancréas et de liquide intestinal.*

Solution enzymatique	Azote restant (= Chitine non solubilisée) (1)		% de chitine dissoute
	0 heure	24 heures	
liquide intestinal	0.399 mg	0.025 mg	94%
Extrait d'hépatopancréas	0.404 mg	0.313 mg	23%

Conditions : 0.05 gr de chitine pulvérisée,
2 ml de tampon Citrate-NaOH, 0.5 M, au pH 5.3
3 ml de solution enzymatique
6 gouttes de toluol.
10 ml d'eau ; en tubes scellés, à 37° C.

(1) Azote, en mgr. par prise de 2 ml. (moyenne de 2 dosages).

Nous constatons que le liquide intestinal solubilise 94 % de la chitine, l'extrait hépatopancréatique 23 % seulement. KARRER (1929) a établi, pour la chitinase de l'Escargot, que la quantité de chitine solubilisée pendant un temps donné, augmente de 1.4 lorsque l'on double la quantité d'enzyme. D'après une courbe étalon ainsi établie, la solubilisation de 23 % de chitine pendant 24 heures correspond à l'action d'une chitinase approximativement 20 fois moins concentrée que celle qui peut solubiliser 94 % de la chitine pendant le même temps.

Chez l'Escargot, la glande digestive, ou hépatopancréas, contient donc 20 fois moins de chitinase qu'il n'y en a dans la lumière de l'estomac.

4. Localisation de la chitinase dans le tube digestif.

Nous avons recherché en quel endroit du tube digestif la chitinase est le plus abondante.

Technique et résultats : Le contenu stomacal, le contenu de l'intestin moyen (caecum et première anse intestinale) et celui de l'intestin postérieur de plusieurs escargots sont recueillis séparément. Ces contenus sont pesés et dilués 20 fois par de l'eau distillée, par rapport à leur poids frais. Après centrifugation, on dose l'activité chitinasique des liquides par la méthode né-

phérométrique. Le pourcentage de chitine dissoute est converti en nombre d'Unités-chitinase correspondant, en se référant aux courbes étalon (Tableau 3).

TABLEAU 3. — Localisation de la chitinase dans le tube digestif.
(Conditions expérimentales : voir tableau 4).

Escargots	Unités-chitinase pour 4 ml. de solution 1/20 (moyenne de 2 dosages)		Rapport b/a
	a) Estomac	b) Intestin	
nourris	1 U	0.25 U	1/4
nourris	1.7 U	0.4 U	1/4
operculés	2.6 U	0.9 U	1/3
à jeûn	3.4 U	int. moyen : 1.8 U int. post. : 0.6 U	1/2 1/6

On constate que la chitinase est surtout concentrée dans l'estomac ; elle est deux fois moins concentrée dans l'intestin moyen, et sa concentration diminue encore dans l'intestin postérieur (1/6 seulement, par unité de volume de contenu).

C. VARIATIONS QUANTITATIVES DE LA CHITINASE.

On sait que, chez les Gastéropodes, la digestion a lieu principalement dans l'estomac, sous l'action des sucs digestifs sécrétés surtout par l'hépatopancréas. La sécrétion des cellules hépatopancréatiques est plus ou moins rythmique. Aussitôt après l'ingestion de nourriture, la sécrétion glandulaire augmente. KRIJGSMAN (1925, 1928) a décrit une relation entre le nombre de cellules glandulaires en activité sécrétoire et la quantité de lipase présente dans les sécrétions. La lipase augmente en proportion notable deux heures après l'ingestion de nourriture, puis diminue à nouveau. VAN WEEL (1950) a fait une observation similaire pour la lipase, la saccharase et les protéases d'un autre Gastéropode : *Achatina fulica* Fer. (fig. 2, p. 13).

POSTMA et al. (1949) ont également décelé un certain rythme dans la sécrétion des carbohydrases d'*Helix pomatia*, et ont observé une augmentation de la quantité de saccharase et d'amylase dans le liquide stomacal, peu de temps après l'ingestion de

nourriture par l'escargot. La chitinase de l'hépatopancréas montre ces mêmes variations, par rapport aux résultats ci-dessous.

Première expérience.

Conditions expérimentales : Les escargots jeûne depuis 7 jours, sont successivement prélevés 2 heures et 4 heures après l'ingestion des liquides stomacaux, ou de l'eau distillée. La chitinase est mesurée par la méthode néphélométrique (Tableau 4).

TABLEAU 4. — Variations quantitatives totales de la chitinase.

Nombre d'escargots	Temps après la fin du jeûne
3	} à jeûn
3	
3	} 2 heures
2	
3	} 4 heures
3	

Conditions : 1 ml de chitine
1 ml de tampon
4 ml de solution
Incubation à 37°C

(*) pour 4 ml de solution 1/20

Les hépatopancréas sont successivement prélevés, débarrassés de la nourriture, broyés au pilon sur sable fin (tamis n° 40, 1 minute, en glacière), l'extractum est mesuré, et dilué 10 fois dans l'eau distillée par la méthode chimique

chitine dissoute est converti
spondant, en se référant aux

chitinase dans le tube digestif.

les : voir tableau 4).

pour 4 ml. de de 2 dosages)	Rapport b/a
Intestin	
0.25 U	1/4
0.4 U	1/4
0.9 U	1/3
moyen : 1.8 U	1/2
st. : 0.6 U	1/6

est surtout concentrée dans
s concentrée dans l'intestin
ne encore dans l'intestin
té de volume de contenu).

LA CHITINASE.

es, la digestion a lieu princi-
on des sucs digestifs sécrétés
crétion des cellules hépato-
hmique. Aussitôt après l'in-
ndulaire augmente. KRIJGS-
n entre le nombre de cellules
a quantité de lipase présente
ente en proportion notable
nourriture, puis diminue à
une observation similaire
rotéases d'un autre Gastéro-
. 13).

nt décelé un certain rythme
s d'*Helix pomatia*, et ont
tité de saccharase et d'amy-
e temps après l'ingestion de

nourriture par l'escargot. Nous avons recherché si la teneur en
chitinase de l'hépatopancréas et du liquide intestinal présente
ces mêmes variations, par deux expériences dont nous exposons
les résultats ci-dessous.

Première expérience.

Conditions expérimentales et résultats : Des escargots, soumis au
jeûne depuis 7 jours, sont nourris de laitues. Des lots de 3 escar-
gots sont prélevés successivement avant l'ingestion de nourriture,
2 heures et 4 heures après le début de l'alimentation. On recueille
les liquides stomacaux, on mesure leur volume, on dilue 20 fois
par de l'eau distillée. L'activité chitinasique est estimée par la
méthode néphélométrique et exprimée en Unités-chitinase
(Tableau 4).

TABLEAU 4. — *Variation de la concentration et de la quantité
totale de chitinase dans l'estomac.*

Nombre d'escargots	Temps après la fin du jeûne	Volume total de liqu. stom.	Nb d'Unités -chitinase (1)	Nb total d'Uni- tés-chitinase dans liqu. stomac.
3	} à jeûn	2.4 ml	3.75	22.5
3		2 ml	5	25
3	} 2 heures	4.2 ml	2	20
2		3.8 ml	2	19
3	} 4 heures	4 ml	2.15	15
3		6 ml	1.25	18

Conditions : 1 ml de chitine (suspension standard),
1 ml de tampon Citrate-NaOH, pH 5.3 (0.6 M.).
4 ml de solution enzymatique.
Incubation à 37° C pendant 1 heure.

(1) pour 4 ml de solution 1/20, moyenne de 2 dosages.

Les hépatopancréas de ces mêmes escargots sont soigneuse-
ment prélevés, débarrassés des autres fragments d'organes, et
broyés au pilon sur sable. Après centrifugation (13.000 tours par
minute, en glacière), les liquides surnageants sont recueillis,
mesurés, et dilués 10 fois par de l'eau distillée. On dose la chitinase
par la méthode chimique (Tableau 5).

TABLEAU 5. — *Variation de la chitinase dans l'hépatopancreas.*

Extrait d'hépatopancreas provenant de :	Azote restant (¹)	Azote solubilisé (¹)	% de chitine solubilisée.
Témoin (4 ml extrait hépatop. inactivé par chauffage)	0.300 mg	0 mg	0 %
6 escargots à jeûn depuis 7 jours	0.217 mg	0.083 mg	27.5 %
5 escargots, 2 heures après la fin du jeûne	0.262 mg	0.038 mg	13 %
6 escargots, 4 heures après la fin du jeûne	0.276 mg	0.024 mg	8 %

Conditions : 1 ml de suspension standard de chitine,
1 ml de tampon citrate-NaOH, pH 5.3 (0.6 M).
4 ml de solution enzymatique,
0.5 ml de toluol.
Incubation pendant 3 heures à 35° C.

(¹) Azote, en mg. par prise de 2 ml (moyenne de 2 dosages).

Discussion des résultats :

a) Liquides stomacaux : (tableau 4).

Au cours des premières heures de réalimentation qui suivent une période de jeûne de 7 jours, l'activité chitinasique du liquide stomacal diminue sensiblement. Cette diminution d'activité est certainement due à une dilution de la chitinase. En effet, pour 3 escargots à jeûn, on recueille 2 à 2.4 ml de liquide stomacal, tandis qu'après 4 heures de réalimentation, on recueille 4 à 6 ml. Par unité de volume (4 ml) de solution enzymatique, la concentration en chitinase diminue au fur et à mesure que l'Escargot se nourrit, jusqu'à ne plus représenter que le tiers de ce qu'elle était précédemment. Cependant, par volume total de liquide stomacal récolté, on passe de 22.5 ou 25 Unités-chitinase, chez les escargots à jeûn, à 15 et 18 Unités après 4 heures d'alimentation.

On peut donc conclure que la quantité de chitinase du liquide stomacal n'augmente nullement après la fin du jeûne. La chitinase paraît au contraire varier peu en quantité absolue, mais subir une dilution sensible, probablement par l'apport des sécrétions glandulaires et par les liquides résultant du broyage des aliments (laitues).

b) Extraits d'hépatopancreas. Les variations parallèles à celles de l'activité chitinasique des extraits sont faibles, faibles au départ, diminuent à la fin du jeûne.

Deuxième expérience.

Conditions expérimentales. Les escargots sont élevés pendant 1 mois. Ils sont élevés en lots de 3 escargots. On recueille les liquides intestinaux et les extraits d'hépatopancreas destinés à mettre en évidence la quantité de chitinase, comme solvant, et par dilution des extraits secs des glandes, d'après la méthode de l'Escargot hépatopancreas sont séchés à l'étuve à 60° C. On mine le poids frais et le poids sec afin de calculer le poids sec. Les extraits sont broyées dans 15 fois leur volume de toluol. On extrait pendant 24 heures et on dose la chitinase par la méthode de l'Escargot. Les extraits sont condensés dans la filtration à l'alcool. L'activité chitinasique est exprimée en mg. de chitine pendant 2 heures à 37° C. dans 0.1 M, pH 5.3.

Discussion des résultats.

Comme dans l'expérience précédente, les extraits stomacaux d'escargots se nourrissent. Au fur et à mesure que l'Escargot se nourrit, la concentration diminue considérablement. En ce qui concerne les extraits d'hépatopancreas, il n'y a pas de variations aussi sensibles que dans l'expérience précédente, probablement en raison de la faible activité chitinasique des extraits d'hépatopancreas (élimination du facteur de chitinasique) lorsque l'Escargot sort de l'eau.

chitinase dans l'hépatopancréas.

restant (¹)	Azote solubilisé (¹)	% de chitine solubilisée.
0 mg	0 mg	0 %
7 mg	0.083 mg	27.5 %
2 mg	0.038 mg	13 %
3 mg	0.024 mg	8 %

chitine,
pH 5.3 (0.6 M).

35° C.

de 2 dosages).

4).

réalimentation qui suivent
activité chitinasique du liquide
diminution d'activité est
chitinase. En effet, pour 3
4 ml de liquide stomacal,
on recueille 4 à 6 ml.
enzymatique, la concentra-
mesure que l'Escargot se
que le tiers de ce qu'elle
volume total de liquide
25 Unités-chitinase, chez
après 4 heures d'alimenta-

ité de chitinase du liquide
a fin du jeûne. La chitinase
quantité absolue, mais subir
par l'apport des sécrétions
nt du broyage des aliments.

b) Extraits d'hépatopancréas : (Tableau 5). On observe des variations parallèles à celles du liquide stomacal ; l'activité chitinasique des extraits hépatopancréatiques, quoique déjà faible au départ, diminue progressivement peu de temps après la fin du jeûne.

Deuxième expérience.

Conditions expérimentales et résultats : Les escargots ont jeûné pendant 1 mois. Ils sont ensuite réhydratés et nourris de laitues. Des lots de 3 escargots sont prélevés d'heure en heure. On recueille les liquides intestinaux et on mesure leur volume ; on les dilue par une solution de glycérol (concentration finale, 6 %). Les extraits d'hépatopancréas sont réalisés dans des conditions destinées à mettre en valeur une augmentation éventuelle de la quantité de chitinase, par l'emploi d'une solution glycinée comme solvant, et par dilution des extraits en fonction du poids sec des glandes, d'après la méthode de VAN WEEL (1950). Les hépatopancréas sont séchés sur papier filtre et pesés. On détermine le poids frais et le poids sec d'un fragment de la glande, afin de calculer le poids sec de la glande entière. Les glandes sont broyées dans 15 fois leur poids sec en solution glycinée (6 %). On extrait pendant 24 heures en chambre froide, on centrifuge, et on dose la chitinase par la méthode chimique. Les résultats sont condensés dans la figure 3. L'activité chitinasique des extraits est exprimée en mg d'azote solubilisé, après incubation pendant 2 heures à 37° C., en tampon Acide citrique-Na₂HPO₄, 0.1 M, pH 5.3.

Discussion des résultats (fig. 3, p. 20).

Comme dans l'expérience précédente, la chitinase des liquides stomacaux d'escargots soumis au jeûne est fort concentrée. Au fur et à mesure que l'Escargot se nourrit, cette concentration diminue considérablement.

En ce qui concerne les extraits d'hépatopancréas, on n'observe pas de variations aussi prononcées que lors de l'expérience précédente, probablement parce que nous exprimons l'activité chitinasique des extraits par rapport au poids sec de la glande (élimination du facteur dilution, qui peut être assez important lorsque l'Escargot sort d'un jeûne prolongé).

Les extraits hépatopancréatiques des escargots nourris depuis 4 heures manifestent cependant une activité chitinasique légèrement moindre que ceux des escargots à jeûne ou 1 heure après la fin du jeûne. Il est ainsi bien démontré que, dans l'hépatopancréas, la quantité de chitinase reste faible et n'augmente nullement durant les premières heures de la digestion.

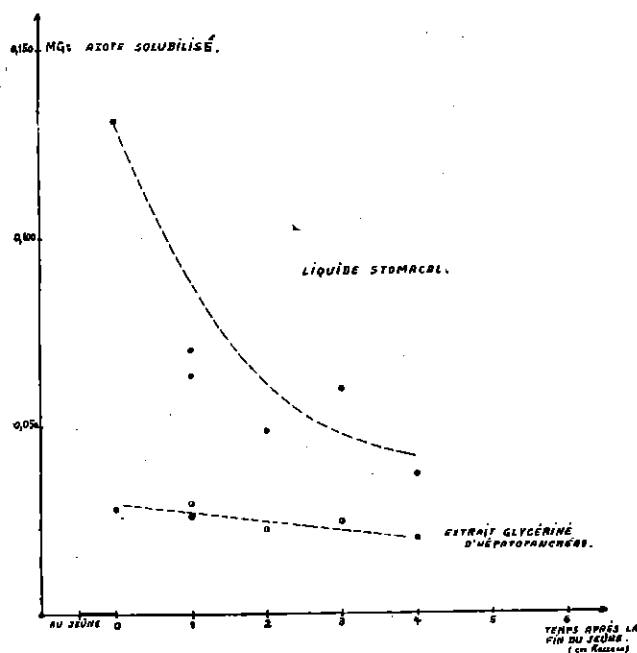


FIG. 3. — Variation de la concentration en chitinase dans le liquide stomacal et dans l'hépatopancréas, pendant les premières heures de digestion, après un jeûne prolongé.

D. DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

La chitinase de l'Escargot n'est certainement pas sécrétée par les glandes salivaires ni par la paroi du tube digestif.

Si l'on admet « a priori » que la chitinase est sécrétée par l'animal lui-même, on doit s'attendre à la trouver dans l'hépatopancréas. A l'aide de techniques de dosage précises, on peut en fait y déceler une certaine activité chitinasique. Cette activité est cependant très faible comparée à celle du liquide stomacal : deux procédés d'extraction différents permettent de préciser que

la chitinase que l'on décelé 20 fois moins concentrée que bien que l'hépatopancréas sécrète une chitinase et extrêmement rare.

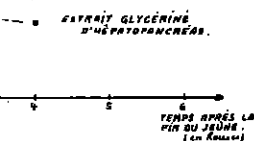
La présence d'une chitinase dans la glande digestive de l'Escargot est une preuve nécessaire de l'existence de cet effet que l'hépatopancréas sécrète. La résorption des produits de digestion de particules non dissoutes dans le liquide stomacal. Un courant de va et vient des particules, musculaires et ciliaires, dans l'estomac, puis dans la glande (MEISENHEIMER, 1925) et bien connu peut expliquer la présence de la chitinase dans l'hépatopancréas, une chitinase sécrétée depuis la lumière du tube digestif pendant les premiers temps que les produits de digestion sont en contact avec la paroi.

C'est cette hypothèse que nous avons mise à la lumière surtout des expériences de ce chapitre. On sait que les escargots ne sécrètent pas sans interruption de chitinase, notamment lorsque l'Escargot est nourri (MAN d'abord (1925), P. VAN WEEL (1950) pour l'Escargot). On a vu que de nombreux enzymes (chitinase, *H. pomatia*; lipase, saccharase, etc.) apparaissent en quantité appréciable au cours des premières heures de la digestion, dans l'estomac (fig. 2, p. 13).

Ce qui est vrai de ces enzymes, ne l'est pas de la chitinase. On ne décelé d'augmentation de la concentration en chitinase dans l'hépatopancréas au cours des premières heures de la digestion. Au contraire, la concentration en chitinase dans l'hépatopancréas (comparer les figures 2 et 3) est plus faible que celle du liquide stomacal pendant les premières heures de la digestion. On peut s'expliquer partiellement cette différence et la concentration de s

des escargots nourris depuis
activité chitinasique légè-
s à jeûn ou 1 heure après la
ntre que, dans l'hépatopan-
faible et n'augmente nulle-
e la digestion.

TOMRCEL.



chitinase dans le liquide stomacal
es heures de digestion, après un

certainement pas sécrétée
proi du tube digestif.

chitinase est sécrétée par
à la trouver dans l'hépatopan-
e dosage précises, on peut
chitinasique. Cette activité
celle du liquide stomacal :
permettent de préciser que

la chitinase que l'on décèle dans l'hépatopancréas y est environ
20 fois moins concentrée que dans la lumière du tube digestif,
bien que l'hépatopancréas soit cependant une glande très volumi-
neuse et extrêmement ramifiée.

La présence d'une chitinase à faible concentration dans la
glande digestive de l'Escargot ne nous paraît pas constituer
une preuve nécessaire de son origine glandulaire. On sait en
effet que l'hépatopancréas est l'organe principal où a lieu la
résorption des produits de la digestion et la phagocytose des
particules non dissoutes (JORDAN, 1918; ROSEN, 1934, 1941).
Un courant de va et vient, assuré par les mouvements péristal-
tiques, musculaires et ciliaires, conduit les sécrétions de la glande
dans l'estomac, puis ramène les liquides stomacaux dans la
glande (MEISENHEIMER, 1912). Ce phénomène caractéristique
et bien connu peut expliquer pourquoi on trouve, dans l'hépatopan-
créas, une chitinase peu concentrée qui serait acheminée
depuis la lumière du tube digestif jusque dans la glande, en même
temps que les produits de la digestion.

C'est cette hypothèse qui nous semble devoir être retenue, à
la lumière surtout des expériences relatées dans la dernière partie
de ce chapitre. On sait que les cellules de l'hépatopancréas ne
sécrètent pas sans interruption, mais surtout à certains moments,
notamment lorsque l'Escargot commence à se nourrir. KRIJGS-
MAN d'abord (1925), POSTMA et al., ensuite (1949) ainsi que
VAN WEEL (1950) pour *Achatina fulica*, ont observé en effet
que de nombreux enzymes (lipase, saccharase et amylase chez
H. pomatia; lipase, saccharase et protéases chez *A. fulica*)
apparaissent en quantité importante pendant les premières
heures de la digestion, dans la glande digestive comme dans
l'estomac (fig. 2, p. 13).

Ce qui est vrai de ces enzymes, certainement d'origine glandu-
laire, ne l'est pas de la chitinase. On ne peut à aucun moment
déceler d'augmentation de la quantité de chitinase au cours des
premières heures de la digestion ni dans l'estomac ni dans la
glande digestive. Au contraire, c'est pendant le jeûne que la
concentration en chitinase des sucs digestifs est maximum
(comparer les figures 2 et 3). La forte concentration en chitinase
du liquide stomacal pendant le jeûne et le repos des escargots
peut s'expliquer partiellement par la déshydratation de l'animal
et la concentration de ses sucs digestifs.

Quant à la chitinase présente dans l'hépatopancréas, il nous semble qu'il faut admettre qu'elle n'y est pas sécrétée, puisqu'elle n'y augmente pas en concentration au moment où la glande est en pleine phase sécrétoire, mais qu'elle y est amenée depuis la lumière du tube digestif en même temps que les produits de la digestion. Nous nous proposons de montrer, au cours des chapitres suivants, l'existence dans le tube digestif de l'Escargot, d'une flore bactérienne qui présente toutes les conditions requises pour être la source de chitinase recherchée.

2. — LA FLORE BACTÉRIENNE CHITINASIQUE DU TUBE DIGESTIF.

Au cours de nos recherches antérieures (JEUNIAUX, 1950, *b*), nous avons analysé quantitativement et qualitativement la flore bactérienne chitinolytique des contenus intestinaux d'escargots, par des isolements en milieux gélosés à base de chitine, dont le pH était toujours compris entre 7 et 7.4.

Nous avons ainsi démontré l'existence d'une flore bactérienne chitinolytique, constituée en moyenne de 750.000 germes viables par ml de contenu intestinal. Cette flore est constituée presque exclusivement d'Eubactéries, contrairement à la flore chitinolytique du sol et des végétaux, dont les éléments dominants sont les Actinomycètes, les Myxobactéries et les Champignons filamenteux chitinolytiques. Nous avons isolé 11 formes différentes de bactéries chitinasiques intestinales, dont aucune ne nous a paru constamment présente, du moins en quantité appréciable, chez les différents escargots examinés. Toutefois, l'absence quasi complète de 7 de ces formes bactériennes dans le milieu extérieur (sol, plantes basses, etc.) et le manque total d'Actinomycètes et d'autres formes telluriques caractéristiques dans les contenus intestinaux des escargots conduit à penser qu'il doit se produire, dans le tube digestif de l'Escargot, une sélection des bactéries ingérées, permettant à quelques espèces seulement de se multiplier et de faire souche. L'examen comparé de la flore intestinale et des excréta, peu après défécation, montre que la flore des excréta devient rapidement analogue à celle du sol.

Nous avons observé ultérieurement que les colonies chitinolytiques développées à partir d'un contenu intestinal donné

sont plus abondantes et plus variées que dans le milieu de culture, lorsque le milieu de culture est exposé à l'air ambiant, environ, qui est précisément le milieu de culture de l'Escargot (KRUEGER, 1933). Nous avons donc isolé une flore chitinolytique de l'Escargot dans un milieu « acide ». Les résultats de ces recherches sont l'objet du présent chapitre.

A. MÉTHODES.

La préparation de la gélose a été exposée dans le chapitre précédent.

Pour la mise en évidence de bactéries chitinolytiques, nous avons utilisé un gel d'agar-agar (gel d'agar-agar) ne contenant que de la chitine comme unique source de carbone. La composition de la gélose est la suivante : Agar-agar : 20 gr ; sucrose : 10 gr (contenant 10 à 15 gr de chitine) à 1 litre par addition de 100 ml de solution stérilisée à l'autoclave. Les boîtes Petri (20 ml par boîte).

Les bactéries chitinolytiques sont cultivées sur ou dans la profondeur de la gélose. Les fines particules de chitine sont une clarification caractéristique autour de leurs colonies. Les organismes chitinolytiques sont caractérisés par leur propriété, de les isoler.

Les numérations bactériennes sont effectuées par la méthode classique des dilutions. Les suspensions sont diluées 10 fois par la suspension, on réalise la progression géométrique de chaque dilution de la suspension, et conservé fl.

Pour l'analyse quantitative, la gélose pouvait être questionnée. La plupart n'ont vraisem.

de l'hépatopancréas, il nous est pas sécrétée, puisqu'elle au moment où la glande est elle y est amenée depuis la temps que les produits de la montrer, au cours des cha-tube digestif de l'Escargot, toutes les conditions requises archée.

FLORE CHITINASIQUE

MÉTODIF.

URES (JEUNIAUX, 1950, b), ent et qualitativement la contenus intestinaux d'escar-gélosés à base de chitine, entre 7 et 7.4.

ence d'une flore bactérienne e de 750.000 germes viables flore est constituée presque rement à la flore chitinoly- s éléments dominants sont s et les Champignons fila- isolé 11 formes différentes s, dont aucune ne nous a s en quantité appréciable, inés. Toutefois, l'absence bactériennes dans le milieu le manque total d'Actino- es caractéristiques dans les onduit à penser qu'il doit e l'Escargot, une sélection quelques espèces seulement L'examen comparé de la après défécation, montre ement analogue à celle du

t que les colonies chitino- contenu intestinal donné

sont plus abondantes et présentent des aspects moins variés lorsque le milieu de culture gélose-chitine est amené au pH 5.5 environ, qui est précisément le pH du milieu intestinal de l'Escargot (KRUEGER, 1933). Nous avons poursuivi notre étude de la flore chitinolytique de l'Escargot en utilisant systématiquement un milieu « acide ». Les résultats de ces nouvelles recherches font l'objet du présent chapitre.

A. MÉTHODES.

La préparation de la chitine pure et de la chitine pulvérisée a été exposée dans le chapitre précédent (p. 11).

Pour la mise en évidence, l'isolement et la culture des bactéries chitinolytiques, nous avons utilisé un milieu de culture solide (gel d'agar-agar) ne contenant que des sels minéraux, et de la chitine comme unique source d'azote et de carbone. Sa composition est la suivante : K_2HPO_4 : 0.5 gr ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.2 gr ; Agar-agar : 20 gr ; suspension aqueuse de chitine pulvérisée (contenant 10 à 15 gr de chitine sèche par litre) : 100 ml ; amener à 1 litre par addition d'eau distillée. Le milieu ainsi préparé est stérilisé à l'autoclave. Pour l'emploi, on le coule en boîtes de Petri (20 ml par boîte). Il est d'un blanc laiteux homogène.

Les bactéries chitinolytiques qui se développent à la surface ou dans la profondeur de ce milieu solubilisent dans leur voisinage les fines particules de chitine, de sorte qu'après quelques jours, une clarification caractéristique se manifeste spécifiquement autour de leurs colonies. Cette clarification permet de distinguer les organismes chitinolytiques de ceux qui ne possèdent pas cette propriété, de les isoler et de les dénombrer.

Les numérations bactériennes ont été effectuées par la technique classique des dilutions successives : les contenus intestinaux sont dilués 10 fois par de l'eau stérile. Après homogénéisation de la suspension, on réalise des dilutions successives, sériées, en progression géométrique de raison 1/10. On inocule ensuite 1 ml de chaque dilution dans des tubes contenant le milieu sélectif liquéfié, et conservé fluide à 55° C, qu'on coule en boîtes de Petri.

Pour l'analyse qualitative des flores chitinolytiques, il ne pouvait être question d'identifier les bactéries isolées, dont la plupart n'ont vraisemblablement jamais été décrites. Nous nous

sommes borné à différencier entre eux les principaux types observés, à l'aide des critères suivants :

- a) Caractères morphologiques des colonies sur gélose-chitine.
- b) Caractères microscopiques des germes constituant ces colonies, après coloration au bleu de toluidine.
- c) Réaction de Gram.

B. OBSERVATIONS EXPÉRIMENTALES.

1. Répartition de la flore chitinolytique dans les divers tronçons du tube digestif.

Nous avons recueilli séparément les contenus des différents tronçons du tube digestif : intestin antérieur (œsophage, estomac), intestin moyen (cæcum et premier tronçon intestinal jusqu'à la première anse intestinale), intestin postérieur (de la première anse intestinale jusqu'à l'anus) d'escargots de provenances diverses, ou ayant été soumis à des conditions de vie différentes.

Chaque escargot, lavé abondamment à l'eau, est débarrassé de sa coquille. La dissection est effectuée aseptiquement en cage vitrée stérile. Le tube digestif, mis à nu, est ligaturé à l'extrémité postérieure de l'estomac et à la première anse intestinale. Les contenus de chacun des trois tronçons intestinaux sont recueillis séparément et pesés en petits Erlenmeyers tarés stériles. Les numérations portent sur les contenus intestinaux mélangés de 2 ou 3 escargots (Tableau 6).

La flore bactérienne chitinolytique est relativement pauvre dans l'intestin antérieur (généralement entre 10 et 100 mille germes par gr. de contenu). Elle est plus abondante au delà de l'estomac, surtout dans l'intestin moyen, probablement dans le cæcum.

Deux lots d'escargots (tableau 6 : *), conservés trois mois en milieu sec, à la température du laboratoire, ont un contenu intestinal particulièrement pauvre en germes chitinolytiques.

TABLEAU 6. — *Analyses dans les différe*

Nombre d'escargots	Origine et état de
3	} Ardennes
3	
3	} Brabant
3	
(*) 3	} Ardennes,
2	
3	} Brabant
3	

2. Flore chitinolytique

Une série de numéra contenus liquides et solide de divers tronçons, prép digestif sont ligaturés, s puis aseptiquement bro broyat est repris dans r et des numérations mi sont effectuées à partir

TABLEAU 7. — *Flore*

Nombre d'escargots	État des escargots
3	Terrarium, nourri
2	Terrarium, à jeun depuis 2 jours
3	A jeun, 3 mois à temp. laborat.
3	idem, puis réhydr et nourris pdt 2

eux les principaux types
s :

colonies sur gélose-chitine.

germes constituant ces
toluidine.

ue dans les divers tronçons

es contenus des différents
rieur (œsophage, estomac),
nçon intestinal jusqu'à la
ostérieur (de la première
escargots de provenances
aditions de vie différentes.

nt à l'eau, est débarrassé
ectuée aseptiquement en
mis à nu, est ligaturé à
à la première anse intesti-
tronçons intestinaux sont
ts Erlenmeyers tarés sté-
les contenus intestinaux
1 6).

est relativement pauvre
nt entre 10 et 100 mille
lus abondante au delà de
en, probablement dans le

, conservés trois mois en
oratoire, ont un contenu
a germes chitinolytiques.

TABLEAU 6. — Analyse quantitative de la flore bactérienne
dans les différents tronçons du tube digestif.

Nombre d'escar- gots	Origine et état des escargots	Nombre de bactéries chitinolytiques par gr. de contenu :	
		d'intestin antérieur	d'intestin moyen et postérieur
3	} Ardennes nourris 1 mois en terrarium	100.000	750.000
3		40.000	300.000
3	} Brabant operculés (6 mois en glacière)	110.000	2.400.000
3		80.000	500.000
3	} Ardennes, (3 mois à temp. laboratoire).	1.000	—
2		2.000	—
3	} Brabant operculés (6 mois en glacière) puis nourris 8 jours.	60.000	I. moyen : 7.000.000
3		10.000	I. postér.: 175.000

2. Flore chitinolytique de broyats d'intestins.

Une série de numérations a été effectuée, non plus sur les contenus liquides et solides du tube digestif, mais sur des broyats de divers tronçons, préparés comme suit : les tronçons du tube digestif sont ligaturés, sectionnés, pesés en Erlenmeyers stériles, puis aseptiquement broyés dans un petit mortier stérile. Le broyat est repris dans neuf fois son poids d'eau distillée stérile et des numérations microbiennes en gélose-chitine de pH 5.5 sont effectuées à partir de dilutions sériees. (Tableau 7).

TABLEAU 7. — Flore bactérienne des broyats d'intestins.

Nombre d'escar- gots	État des escargots	Nombre de bactéries chitinolytiques par gr. de broyats (organes et contenu)	
		Estomac	Intestin moyen
3	Terrarium, nourris	20.000	1.500.000
2	Terrarium, à jeun depuis 2 jours	10.000	200.000
3	A jeun, 3 mois à temp. laborat.	10 millions	100 millions
3	idem, puis réhydratés et nourris pdt 2 j.	1.800.000	20 millions

On constate que : (tableau 7).

1) *En broyant le tube digestif*, on peut mettre en évidence une flore chitinolytique particulièrement abondante chez les escargots jeûnant en milieu sec depuis plusieurs mois, alors que les *liquides intestinaux* d'escargots identiques sont particulièrement pauvres en bactéries (tableau 6 : *). Les germes chitinolytiques paraissent se multiplier pendant les périodes de repos de l'Escargot, si la température est suffisante, mais ils restent sans doute fixés aux parois du tube digestif.

2) L'abondante flore chitinolytique des escargots en repos s'appauvrit rapidement lorsque l'animal reprend son activité normale.

3) Les bactéries chitinolytiques sont régulièrement 10 fois plus abondantes (par gr. d'organes et de contenus) dans les broyats d'intestin moyen que dans ceux d'estomac, ce qui est en accord avec le résultat des numérations effectuées à partir de contenu intestinal seul (voir tableau 6).

3. Étude qualitative.

Les isollements en milieu acide ont permis de distinguer 4 types bactériens bien caractérisés, qui constituent la majeure partie de la flore chitinolytique intestinale. Nous résumons en une clé d'identification les principaux caractères qui nous permettent de distinguer ces formes entre elles. Toutes ces bactéries sont gram-négatives ; elles ne sporulent pas dans les milieux où nous les avons cultivées.

Clé d'identification des 4 types principaux de bactéries chitinolytiques intestinales, isolées sur des milieux gélosés à la chitine, de pH 5.5.

A. *Aspect des colonies incluses dans la profondeur de l'agar, et morphologique microscopique.*

- a_1 : punctiformes, bords sinueux, blanc-jaunâtre très opaque. Bâtonnet de taille moyenne, à extrémités arrondies ; longueur = 3 à 5 fois la largeur B.
- a_2 : circulaires, de grande taille (diam. = 4 à 5 mm), bords finement découpés, blanc opaque, strié radiairement. Bâtonnet court (longueur = 2 à 3 fois la largeur) ou Coccobacille C.

B. *Aspect des colonies*

- b_1 : centre punctiforme, léger d'une lame plate, rigide (par transparence) qu'on déplace.
Bords sinueux et décolorés.
- b_2 : centre punctiforme, très foncé très denses et très visqueux.
Bords profondément décolorés.

C. *Aspect des colonies*

- c_1 : colonie irrégulière, très épaisse. Bacilles courts.
- c_2 : colonie circulaire, blanche. Coccobacilles.

Nous avons déterminé quatre types bactériens. Quelle que soit l'origine (dans le cæcum ou environs de Liège), les escargots au moment de leur jeûne, au jeûne depuis plusieurs mois et plus récemment représenté, chez les escargots du type I constituent 13,5% de ces 24 escargots. La présence est moins fréquente. Les types III et IV constituent respectivement 13,5% chitinasique. Un certain nombre constituant les 13,5% mais n'ont pas été étudiés relative.

Les bactéries du type I au nombre total de 13,5% que dans le cæcum ont été examinés. Ces bactéries sont les plus dominants et plus caractéristiques de l'Escargot. Elles sont isolées sur gélose neutre et leur présence est inconstante. L'emploi de l'agar permet de mettre en évidence l

peut mettre en évidence une
abondante chez les escargots
rs mois, alors que les *liquides*
nt particulièrement pauvres
es chitinolytiques paraissent
de repos de l'Escargot, si la
restent sans doute fixés aux

que des escargots en repos
animal reprend son activité

sont régulièrement 10 fois
s et de contenus) dans les
eux d'estomac, ce qui est
ations effectuées à partir de
au 6).

ont permis de distinguer 4
qui constituent la majeure
estinale. Nous résumons en
ux caractères qui nous per-
e elles. Toutes ces bactéries
ent pas dans les milieux où

principaux de bactéries
des milieux gélosés à la
H 5.5.

ns la profondeur de l'agar,

c-jaunâtre très opaque. Bâ-
ités arrondies; longueur = 3 à
..... B.
- 4 à 5 mm), bords finement
irement. Bâtonnet court (lon-
Coccobacille C.

B. Aspect des colonies âgées (8 jours) en surface.

- b_1 : centre punctiforme, légèrement bombé, d'aspect muqueux, entouré d'une lame plate, rugueuse, portant des granulations d'aspect doré (par transparence) qui s'espacent et disparaissent vers la périphérie. Bords sinueux et découpés type I.
- b_2 : centre punctiforme, lame plate, rugueuse, à granulations brun foncé très denses et fines, qui envahissent presque toute la colonie. Bords profondément découpés en arborescences type IV.

C. Aspect des colonies âgées et morphologie microscopique.

- c_1 : colonie irrégulière, très plate, rugueuse, à bords profondément découpés. Bacilles courts type II.
- c_2 : colonie circulaire, bombée, d'aspect muqueux, bords arrondis. Coccobacilles type III.

Nous avons déterminé la fréquence et la localisation de ces quatre types bactériens dans le tube digestif de 24 escargots. Quelle que soit l'origine des escargots (Ardennes belges, Brabant, ou environs de Liège), quelles que soient les conditions de vie des escargots au moment du prélèvement bactérien (nourris en terrarium, au jeûne depuis plusieurs jours, ou conservés operculés depuis plusieurs mois en chambre froide), le type I est abondamment représenté, chez tous les escargots examinés. Les bactéries du type I constituent en moyenne 72 % de la flore bactérienne de ces 24 escargots. Le type II est beaucoup moins fréquent, et sa présence est moins constante; il représente 7 % de la flore. Les types III et IV ne se rencontrent qu'occasionnellement et constituent respectivement 4.5 % et 3 % de la flore bactérienne chitinasique. Un certain nombre d'autres types bactériens, constituant les 13.5 % restants de la flore, ont été observés mais n'ont pas été étudiés davantage, étant donné leur rareté relative.

Les bactéries du type I sont aussi fréquentes (par rapport au nombre total de bactéries chitinolytiques) dans l'estomac que dans le cæcum ou dans l'intestin, chez tous les escargots examinés. Ces bactéries doivent être considérées comme les éléments dominants et permanents de la flore chitinolytique intestinale de l'Escargot. Elles correspondent au type 6 des bactéries isolées sur gélose neutre, dont la présence nous avait paru être inconstante. L'emploi d'un milieu légèrement acide permet de mettre en évidence leur abondance et leur constance.

3. — PRODUCTION D'EXOCHITINASE PAR LES BACTÉRIES DU TUBE DIGESTIF. NATURE CONSTITUTIVE DE CET ENZYME.

Dans le cas qui nous occupe, il est important de savoir si les bactéries chitinolytiques de l'intestin de l'Escargot sont capables de laisser diffuser dans les milieux de culture une exochitinase qu'il serait possible d'isoler et d'étudier comme celle du liquide intestinal. Les techniques expérimentales ont d'abord été mises au point pour des cultures d'Actinomycètes, puis adaptées à des cultures en milieux fluides ou semi-fluides, à base de chitine ou non, de bactéries isolées du contenu intestinal de l'Escargot.

MILIEUX DE CULTURE.

Milieux fluides à base de chitine : même composition que le milieu solide décrit au chapitre précédent (p. 23), mais avec 1 gr d'agar seulement par litre.

Milieux semi-fluides : même composition que le milieu solide, mais avec 5 gr d'agar par litre.

Ces milieux sont répartis en boîte de Roux (100 ml par boîte) qu'on stérilise ensuite à l'autoclave. Onensemence chaque boîte par 1 ml de bouillon de culture ou de suspension de germes cultivés sur milieu gélosé. Les boîtes sont incubées à 20 ou 25° C. Après un temps variable, qui doit être déterminé pour chaque type de bactéries, on filtre les milieux sur papier ou on les centrifuge, afin de séparer les voiles bactériens et la chitine non solubilisée du liquide contenant la chitinase. On stérilise ensuite par filtration sur bougie.

Milieux fluides peptonés sans chitine : au milieu de base de Czapek, sans glucose, on ajoute 1 % de peptone et on ajuste au pH 6.5.

ACTINOMYCÈTES.

Les milieux de culture doivent être de réaction neutre ou légèrement alcaline (pH 7 à 7.6). La chitinase n'est présente en quantité appréciable dans les milieux de culture que pendant peu de temps. Nous avons testé quotidiennement la teneur en chitinase des milieux fluides ou semi-fluides ensemencés d'un Actinomycète chitinolytique isolé du sol. 20 ml de liquide de culture sont préle-

vés de jour en jour dans des tubes testés en présence de chlorure de calcium. Dans les conditions de culture décrites, la chitinase n'est plus détectable qu'après 7 jours de culture, ce qui est très avancé. Elle atteint son maximum vers le 9^e jour, puis disparaît complètement. On peut pratiquement plus de 10 jours de culture. Pour observer la teneur en chitinase, il est nécessaire de tester les cultures.

Dans ses grandes lignes, la courbe de croissance microbienne est identique à celle de la chitine. Le pH est de 5.2 à 5.3 ; la température de fermentation est rapidement élevée à 45° C. La quantité de chitine est multipliée par 1.6 quand on passe de la chitine à l'Escargot : KARRE (1934).

BACTÉRIES CHITINOLYTIQUES.

1. *Cultures en milieu solide* : les bactéries isolées du tube digestif de l'Escargot se développent dans le milieu solide. La croissance à 20° C est rapide. La teneur en chitine est multipliée par 2.0. Après 10 jours de culture, les boîtes sont pesées (souche 3 et 5) et on trouve :

2. *Cultures en milieu liquide* : la culture fluide n'offre pas de avantages digestifs de l'Escargot les plus intéressants. Or ces bactéries sont très convenables. Or ces bactéries sont soit que les impuretés du milieu de culture source de vitamines, soit que les impuretés de l'agar des conditions d'ensemencement.

Nous avons cultivé les bactéries dans des milieux fluides, qui réalisent par leur croissance. Après 10 jours d'incubation, on trouve dans le milieu par les souches 3 et 5. Dans ces conditions à part, on obtient la chitine obtenue à partir d'une souche (voir ci-dessus) dans les

PAR LES BACTÉRIES
CONSTITUTIVE DE CET ENZYME.

important de savoir si les
de l'Escargot sont capables
de culture une exochitinase
comme celle du liquide
solides ont d'abord été mises
en culture, puis adaptées à des
milieux, à base de chitine ou
de l'intestinal de l'Escargot.

de même composition que
celle de l'Escargot (p. 23), mais avec

de même composition que le milieu solide,

de Roux (100 ml par boîte)
de culture. Onensemence chaque
boîte de suspension de germes
dans des tubes incubés à 20 ou 25° C.
On a déterminé pour chaque
boîte sur papier ou on les centri-
fuge et la chitine non solubili-
sée. On stérilise ensuite par

de : au milieu de base de
de peptone et on ajuste

de réaction neutre ou légè-
rement acide n'est présente en quan-
tité appréciable que pendant peu de
temps. On a mesuré la teneur en chitinase
obtenue à partir d'un Actinomycète
dans des milieux de culture sont préle-

vés de jour en jour dans chaque boîte de Roux, centrifugés, et
testés en présence de chloroforme par la méthode néphélométrique.
Dans les conditions de cette expérience, la chitinase n'apparaît
qu'après 7 jours de culture, alors que la croissance est déjà très
avancée. Elle atteint son maximum de concentration après
le 9^e jour, puis disparaît rapidement. Après le 11^e jour, on ne
peut pratiquement plus déceler de chitinase dans les milieux de
culture. Pour observer la production d'exochitinase, il est donc
nécessaire de tester les cultures de jour en jour.

Dans ses grandes lignes, la cinétique de la chitinase d'origine
microbienne est identique à celle de l'Escargot : le pH optimum
est de 5.2 à 5.3 ; la température optimale est de 40° C. environ ;
le ferment est rapidement détruit à des températures supérieures
à 45° C. La quantité de substrat dégradé par unité de temps est
multipliée par 1.6 quand on double la quantité d'enzyme (1.4
chez l'Escargot : KARRER et HOFMANN (1929).

BACTÉRIES CHITINASIQUES INTESTINALES DE L'ESCARGOT.

1. *Cultures en milieu fluide à base de chitine* : Des bactéries
isolées du tube digestif de l'Escargot sont ensemencées en milieu
fluide. La croissance à 20° C. est très lente ainsi que la solubilisa-
tion de la chitine. Après 1 mois, deux cultures se sont dévelop-
pées (souche 3 et 5) et ont libéré une exochitinase dans le milieu.

2. *Cultures en milieu semi-fluide* : Il apparaît que le milieu
de culture fluide n'offre pas à la plupart des bactéries du tube
digestif de l'Escargot les conditions requises pour une croissance
convenable. Or ces bactéries se développent bien en milieu solide,
soit que les impuretés apportées par la gélose leur soient une
source de vitamines, soit qu'elles trouvent dans l'épaisseur de
l'agar des conditions d'anaérobiose qui leur seraient favorables.

Nous avons cultivé ces bactéries dans des milieux semi-
fluides, qui réalisent partiellement les conditions du milieu solide.
Après 10 jours d'incubation à 20° C, une exochitinase est libérée
dans le milieu par les souches n° 1, 3 et 5. La chitinase obtenue
dans ces conditions à partir de la souche 1 est plus active que celle
obtenue à partir d'une culture d'Actinomycète (isolé du sol,
voir ci-dessus) dans les mêmes conditions.

3. *Cultures en milieu-chitine fluide, additionné de liquide intestinal stérile et inactivé.*

Différentes souches appartenant au type I ont été ensemencées en milieu-chitine fluide, additionné de liquide stomacal d'Escargot (concentration finale, 1 %), stérilisé par filtration sur bougie, et dont la chitinase a été inactivée par chauffage. Après 8 jours d'incubation à 25° C, les milieux sont centrifugés. Les liquides surnageants sont testés par la méthode néphélométrique (Tableau 8).

TABLEAU 8. — *Exochitinase produite par différentes souches du type I en milieu chitine fluide (pH 5.5) + liquide intestinal (1 %).*

Filtrat de culture des souches n° :	Variation du trouble (24 heures).
12	9 %
13	1 %
14	0 %
17	22 %
18	12 %
19	4 %
20	12 %
21	32 %

Conditions : voir tableau 9 (p. 31).

La forme I est donc capable de laisser diffuser une exochitinase. La croissance et la production de chitinase sont favorisées par l'addition de liquide intestinal d'Escargot aux milieux de culture.

NATURE CONSTITUTIVE DE L'EXOCHITINASE DES BACTÉRIES INTESTINALES.

10 souches différentes de bactéries chitinolytiques intestinales appartenant au type I sont cultivées en milieu Czapek peptoné, ajusté au pH 6.5, exempt de toute trace de chitine ou de sucres. Les cultures sont incubées à 26° C. Tous les 2 jours, on prélève stérilement une goutte de chaque culture, qu'on dilue dans 5 ml d'eau stérile. Une goutte de cette dilution sert à ensemencer un milieu peptoné frais stérile. On fait ainsi 6 subcultures. On recherche l'activité chitinasique de la 6^e subculture après 20

heures et 42 heures d'incubation. Les milieux de culture stérilisés par filtration, l'activité chitinasique est toujours présente. Après 48 heures, 9 milieux sur 10 sont encore positivement actifs. (Tableau 9).

Les bactéries du type I sont donc capables de produire de la chitinase même ne contenant pas du tout

TABLEAU 9. — *Exochitinase produite par différentes souches du type I en milieu chitine fluide (pH 5.5) + liquide intestinal (1 %).*

Souches n°	Variation du trouble
	6 ^e subculture
12	0
16	2
17	7
18	2
19	0
20	0
21	0
25	4
30	4
32	3

Conditions : 1 ml de suspension de culture +
1 ml de tampon (pH 5.5)
0.2 M).
4 ml de filtrat de culture
6 heures d'incubation.

CONCLUSIONS.

Lorsqu'on les cultive en milieu chitineux, les bactéries du type I produisent de la chitinase. Actinomycètes chitinolytiques, qui peut être aisément isolée, est présente dans le milieu de culture.

On peut également isoler la chitinase à partir de cultures, en particulier certaines bactéries chitinolytiques de mollusques d'escargots.

de, additionné de liquide

type I ont été ensemencées
le liquide stomacal d'Escar-
sé par filtration sur bougie,
par chauffage. Après 8 jours
et centrifugés. Les liquides
méthode néphélométrique (Ta-

te par différentes souches
(H 5.5) + liquide intestinal

Variation du trouble (24 heures).
9 %
1 %
0 %
22 %
12 %
4 %
12 %
32 %

diffuser une exochitinase.
chitinase sont favorisées par
got aux milieux de culture.

CHITINASE DES BACTÉRIES

chitinolytiques intestinales
en milieu Czapek peptoné,
ce de chitine ou de sucres.
ous les 2 jours, on prélève
culture, qu'on dilue dans
dilution sert à ensemencer
it ainsi 6 subcultures. On
a 6^e subculture après 20

heures et 42 heures d'incubation (tableau 9) sur les filtrats de culture stérilisés par filtration sur bougie. Après 20 heures d'incubation, l'activité chitinasique est à peine décelable. Après 42 heures, 9 milieux sur 10 contiennent une exochitinase relativement active. (Tableau 9).

Les bactéries du type I de la flore chitinasique de l'Escargot sont donc capables de produire une exochitinase dans des milieux ne contenant pas du tout de chitine.

TABLEAU 9. — Exochitinase produite par différentes souches du type I en milieux peptonés sans chitine.

Souches n°	Variation du trouble après 6 heures d'incubation	
	6 ^e subculture âgée de 20h.	6 ^e subculture âgée de 42 h.
12	0 %	3 %
16	2 %	17 %
17	7 %	18.5 %
18	2 %	14 %
19	0 %	23 %
20	0 %	18 %
21	0 %	14 %
25	4 %	16 %
30	4.5 %	18 %
32	3.5 %	18 %

Conditions : 1 ml de suspension standard de chitine
1 ml de tampon Citrate-NaOH, pH 5.3 (Concentration finale 0.2 M).
4 ml de filtrat enzymatique stérilisé par filtration sur bougie.
6 heures d'incubation à 38° C.

CONCLUSIONS.

Lorsqu'on les cultive dans un milieu liquide ou semi-fluide contenant de la chitine, susceptible d'assurer leur croissance, les Actinomycètes chitinolytiques laissent diffuser une exochitinase, qui peut être aisément séparée du milieu de culture. Elle n'est présente dans le milieu que pendant un laps de temps déterminé.

On peut également isoler une exochitinase, parfois très active, à partir de cultures, en milieu semi-fluide à base de chitine, de certaines bactéries chitinolytiques isolées des contenus intestinaux d'escargots.

Des souches bactériennes se rapportant au type I, le plus abondant et le plus constant de la flore chitinasique du tube digestif des escargots, sont capables de laisser diffuser une exochitinase, non seulement dans des milieux contenant de la chitine, mais encore dans des milieux peptonés privés de chitine. La chitinase de ces bactéries est un enzyme constitutif. L'addition de liquide intestinal d'Escargot, dont la chitinase a été inactivée par chauffage, favorise la croissance des bactéries et la production de chitinase.

4. — INFLUENCE DU LIQUIDE INTESTINAL DE L'ESCARGOT SUR LA CROISSANCE ET L'ACTIVITÉ DES BACTÉRIES CHITINASIQUES.

La possibilité d'une sécrétion de chitinase par les bactéries intestinales de l'Escargot dans son tube digestif ne peut être admise que pour autant que les conditions de vie trouvées par ces bactéries dans la lumière du tube digestif se révèlent favorables à leur croissance et à la sécrétion d'exochitinase.

Nous avons recherché l'influence de différents extraits sur la croissance des bactéries intestinales ; nous avons choisi deux types d'extraits :

a) Des extraits de plantes ou de sols, apportant des substances susceptibles d'être trouvées par les bactéries dans n'importe quel milieu naturel.

b) Des extraits de liquide intestinal stérile et inactivé, ou des extraits d'hépatopancréas, qui sont susceptibles de contenir des principes chimiques spécifiques du milieu intestinal de l'Escargot.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES.

Deux souches bactériennes chitinolytiques (souches 12 et 13), appartenant au type I, le plus constant et le plus abondant de la flore intestinale, sont repiquées sur différents milieux à base de chitine pulvérisée et incubées à 25° C.

Composition des milieux : à 25 ml du milieu gélose-chitine habituel, ajusté au pH 5.3 et fondu, nous ajoutons 1 ou 2 ml des extraits aqueux suivants :

— Liquide intestinal d'Escargot : dilué au 1/5 par de l'eau distillée et stérilisé par filtration sur bougie ; la chitinase qu'il contient est inactivée par station de 12 heures à 47 ° C.

— Extraits aqueux d'Escargot lavés et séchés, sont broyés 4 fois leur poids en eau distillée additionnée de terre d'infusoire, puis par filtration sur bougie.

— Extraits aqueux d'hépatopancréas broyées au mixer dans de l'eau, le broyat est centrifugé, filtré.

— Extraits aqueux de sol dilution et même procédé.

RÉSULTATS.

Après 6 jours d'incubation à 25° C, les bactéries et la chitinolyse (1) sont résumés par les résultats suivants :

On constate que, en présence de l'extrait de jardin, la croissance des bactéries est lente et ne s'accroît pas. Les extraits d'hépatopancréas marquée sur la croissance des bactéries dans le liquide intestinal inactivé, le mieux, et d'autant mieux que le milieu est plus élevée.

En conclusion, parmi les extraits de liquide intestinal, l'extrait de liquide intestinal des bactéries du type I du tube digestif, dans les conditions les plus favorables, favorise la production d'exochitinase.

portant au type I, le plus
flore chitinasique du tube
de laisser diffuser une exochi-
eux contenant de la chitine,
onés privés de chitine. La
zyme constitutif. L'addition
t la chitinase a été inactivée
e des bactéries et la pro-

LIQUIDE INTESTINAL DE L'ESCARGOT ET DES BACTÉRIES CHITINASIQUES.

chitinase par les bactéries
tube digestif ne peut être
ditions de vie trouvées par
e digestif se révèlent favo-
ion d'exochitinase.

de différents extraits sur la
; nous avons choisi deux

ls, apportant des substances
s bactéries dans n'importe

al stérile et inactivé, ou des
t susceptibles de contenir
s du milieu intestinal de

lytiques (souches 12 et 13),
ant et le plus abondant de
ur différents milieux à base
5° C.

nl du milieu gélose-chitine
nous ajoutons 1 ou 2 ml des

dilué au 1/5 par de l'eau
r bougie ; la chitinase qu'il
e 12 heures à 47 ° C.

— Extraits aqueux d'hépatopancréas d'Escargot : les glandes, lavées et séchées, sont broyées dans un mixer en présence de 4 fois leur poids en eau distillée. Après centrifugation, le broyat, additionné de terre d'infusoires, est filtré sur Büchner puis stérilisé par filtration sur bougie et inactivé comme le liquide intestinal.

— Extraits aqueux de feuilles de laitues : les feuilles sont broyées au mixer dans 4 fois leur poids en eau distillée ; le broyat est centrifugé, filtré et inactivé par chauffage.

— Extraits aqueux de terre de jardin et d'humus : même dilution et même procédé d'inactivation.

RÉSULTATS.

Après 6 jours d'incubation, on mesure la croissance des colonies et la chitinolyse (largeur de la zone de clarification). Les résultats sont résumés dans le tableau 10.

On constate que, en présence des extraits de laitues et de terre de jardin, la croissance des bactéries du tube digestif de l'Escargot est lente et ne s'accompagne guère de chitinolyse décelable. Les extraits d'hépatopancréas ont une action favorable très marquée sur la croissance des bactéries, mais c'est en présence de liquide intestinal inactivé que la chitinolyse paraît se réaliser le mieux, et d'autant mieux que la quantité de liquide intestinal est plus élevée.

En conclusion, parmi les 4 extraits aqueux étudiés, c'est l'extrait de liquide intestinal de l'Escargot qui assure aux bactéries du type I du tube digestif, cultivées en milieu gélosé, les conditions les plus favorables à leur développement et à leur production d'exochitinase.

TABLEAU 10. — Influence de différents extraits sur la croissance et la production de chitinase des bactéries intestinales.

Milieu Gélose-chitine additionné de :	Aspect des colonies et chitinolyse		
	Diamètre	Largeur de la zone de clarification	
Extrait de terre et d'humus	1 ml 2 ml	0.5 mm 1 mm	nulle nulle
Extrait de laitues	1 ml 2 ml	0.5 mm 1.5 à 2.5 mm	nulle 0.5 mm
Extrait d'hépatopancréas inactivé	1 ml 2 ml	2 à 3 mm 7 à 12 mm	1 à 2 mm 0.5 à 1 mm
Liquide intestinal inactivé	1 ml 2 ml	1 à 2 mm 6 à 8 mm	0.5 à 1 mm 2 à 2.5 mm

5. — CONCLUSIONS.

Lorsqu'on se pose la question de savoir si une substance quelconque (un ferment par exemple), présente chez un animal, y est élaborée par ses propres cellules ou par des microorganismes parasites ou symbiotiques, on conçoit qu'une démonstration apparemment irréfutable consisterait à priver l'animal de ses symbiotes, à l'élever stérilement et à rechercher alors la substance dont on étudie l'origine.

Cette expérimentation nous est apparue d'emblée pratiquement irréalisable dans un délai plus ou moins court. L'élevage de l'Escargot « ab ovo » sur un milieu et avec une nourriture stériles est un problème en soi. La stérilisation même partielle de son tube digestif en est un autre. Il faut pour cela bien connaître les bactéries que l'on désire éliminer, déterminer la nature et la posologie de l'antibiotique ou du sulfamidé adéquat, et étudier l'influence de ce dernier sur l'Escargot lui-même. En se basant sur les éléments que nous avons réunis, on pourrait maintenant entreprendre de telles recherches avec des chances de succès.

Cependant, les différentes investigations que nous avons menées sur la flore chitinolytique de l'Escargot et sur sa chitinase nous ont permis de rassembler un ensemble de faits, que nous

résumons ci-dessous, à partir desquels on peut tirer des conclusions valables.

1. — Une flore chitino-lytique est présente dans le tube digestif de l'Escargot, plus abondante que celle du milieu extérieur.

2. — Elle est surtout représentée par des formes particulièrement abondantes de l'Escargot, où elle est associée à une grande variété de formes grammes d'organes et de tissus.

3. — Sujette à des variations, la flore chitino-lytique de l'Escargot semble provenir de quelques formes bactériennes qui sont constamment présentes dans le tube digestif.

4. — Les bactéries chitino-lytiques ne peuvent pas être cultivées en milieu gélosé, mais elles peuvent laisser diffuser des exoenzymes qui agissent sur la chitine séparément des microorganismes.

5. — Le liquide intestinal de l'Escargot contient des exochitinases dans des proportions élevées.

6. — Le liquide stomacal de l'Escargot est très concentré pendant la digestion et se dilue rapidement lorsque l'Escargot cesse de manger.

7. — Si l'on peut déceler la présence de chitinase dans le tube digestif de l'Escargot, celle-ci y est présente pendant toute la durée de la digestion. L'étude des variations de la chitinase pendant les heures de la digestion, montre que son origine glandulaire de la salive est probable.

De l'ensemble des faits rapportés ci-dessus, on peut conclure que la chitinase de l'Escargot est produite par la flore intestinale de l'animal, mais résulte de la chitinase produite différemment des autres enzymes par le pancréas et le tube digestif. Rien, dans les résultats obtenus, ne permet de déceler un rôle des glandes salivaires. Tout semble indiquer que la chitinase provenait de la salive.

nts extraits sur la croissance
bactériennes intestinales.

t des colonies et chitinolyse	
ètre	Largeur de la zone de clarification
a	nulle
a	nulle
a	nulle
.5 mm	0.5 mm
mm	1 à 2 mm
mm	0.5 à 1 mm
mm	0.5 à 1 mm
mm	2 à 2.5 mm

NS.

savoir si une substance
présente chez un animal,
u par des microorganismes
oit qu'une démonstration
à priver l'animal de ses
chercher alors la substance

parue d'emblée pratique-
ou moins court. L'élevage
u et avec une nourriture
érialisation même partielle
l faut pour cela bien con-
iner, déterminer la nature
du sulfamidé adéquat, et
Escargot lui-même. En se
avons réunis, on pourrait
herches avec des chances

ions que nous avons me-
cargot et sur sa chitinase
semble de faits, que nous

résumons ci-dessous, à partir duquel il nous paraît légitime de tirer des conclusions valables.

1. — Une flore chitinolytique, d'un tout autre aspect qualitatif que celle du milieu extérieur, est présente dans le tube digestif de l'Escargot.

2. — Elle est surtout concentrée dans l'intestin moyen et est particulièrement abondante pendant les longues périodes de repos de l'Escargot, où elle est de 10 à 100 millions de germes par gramme d'organes et de contenu.

3. — Sujette à des variations qualitatives, la flore chitinolytique de l'Escargot semble cependant constituée principalement de quelques formes bactériennes caractéristiques, dont l'une est apparemment constante et prédominante.

4. — Les bactéries chitinolytiques intestinales sont capables de laisser diffuser des exochitinasés qu'on peut isoler et étudier séparément des microorganismes. Elles peuvent en outre produire ces exochitinasés dans des milieux ne contenant pas de chitine.

5. — Le liquide intestinal de l'Escargot favorise le développement de ces bactéries et leur production de chitinase.

6. — Le liquide stomacal de l'Escargot contient une chitinase très concentrée pendant le jeûne. Cette concentration diminue rapidement lorsque l'Escargot se nourrit de nouveau.

7. — Si l'on peut déceler une chitinase dans l'hépatopancréas de l'Escargot, celle-ci y est néanmoins très peu concentrée. L'étude des variations de sa concentration, au cours des premières heures de la digestion, met en doute la croyance classique d'une origine glandulaire de la chitinase.

De l'ensemble des faits résumés ci-dessus, on peut conclure que la chitinase de l'Escargot n'est pas une sécrétion glandulaire de l'animal, mais résulte de l'activité d'une flore microbienne intestinale. La chitinase de l'Escargot se comporte « in vivo » différemment des autres enzymes certainement d'origine hépatopancréatique. Rien, dans les variations quantitatives observées, ne permet de déceler un apport de chitinase à partir des cellules glandulaires. Tout semble se passer au contraire comme si la chitinase provenait de la lumière du tube digestif et était partiel-

lement introduite dans l'hépatopancréas en même temps que les produits de la digestion.

La flore bactérienne chitinolytique du tube digestif présente les conditions requises pour être responsable de la production de cette chitinase. C'est au moment où les bactéries sont particulièrement abondantes et tapissent toute la paroi du canal alimentaire (pendant les longues périodes de repos de l'Escargot, les jeûnes prolongés en milieu sec), que la chitinase stomacale est le plus concentrée. Les bactéries intestinales ne sont pas des formes banales et n'existent pas en quantité appréciable dans les sols ou sur des végétaux ; bon nombre de souches isolées paraissent appartenir à un type caractéristique auquel nous ne pouvons toutefois pas donner de position systématique.

Le fait que la production d'exochitinase par ces bactéries n'est pas nécessairement liée à la présence de chitine permet d'admettre que l'Escargot puisse posséder une chitinase d'origine bactérienne même s'il n'ingère pas de chitine. D'autre part, le liquide intestinal exerce une action favorable sur la croissance de ces bactéries et sur leur production de chitinase.

On conçoit très bien l'existence d'une flore symbiotique constituée de bactéries qui trouvent dans le milieu intestinal des conditions favorables à leur multiplication, et dont une des activités biochimiques est la production d'enzymes, en particulier de chitinase. L'originalité de l'Escargot ne réside donc pas dans le fait d'avoir acquis la faculté de sécréter un ferment spécifique propre, mais, conformément aux vues émises déjà par FLORKIN et LOZET (1949) en ce qui concerne la cellulase, dans celui de réaliser dans son milieu intestinal des conditions biochimiques particulières, propices à l'installation et à la prolifération d'une flore symbiotique.

RECHERCHES DE LA PRÉSENCE ET DE LA NATURE D'AUTRES MOLECULES

Les rares données que nous avons sur la teneur en chitinasés du liquide intestinal de *B. perversa* (1951) que celui de *H. pomatia* (1951) total, des extraits aqueux de chitinase du même ordre de grandeur (1951).

Nous avons entrepris de déterminer la teneur en chitinase des extraits de *B. perversa*. Afin de comparer ces résultats avec ceux de Bourgogne, nous avons cherché à préciser la localisation de la chitinase, l'abondance et la nature de la chitine. Nous détaillons, au cours de ce travail, et les premiers résultats.

A. MÉTHODE POUR LA DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN CHITINASE

1. Dosage de la chitinase

Le dosage est effectué dans des conditions de variations de trouble nulle en présence des solutions optimales décrites plus haut. Nous avons choisi le li-
quide intestinal de *B. perversa* comme élément de référence. Nous avons étudié les solutions étudiées e