

créas en même temps que

e du tube digestif présente
 onsable de la production
 ù les bactéries sont particu-
 orte la paroi du canal ali-
 des de repos de l'Escargot,
 que la chitinase stomacale
 intestinales ne sont pas des
 uantité appréciable dans les
 e de souches isolées parais-
 tique auquel nous ne pou-
 n systématique.

chitinase par ces bactéries
 présence de chitine permet
 éder une chitinase d'origine
 le chitine. D'autre part, le
 favorable sur la croissance
 on de chitinase.

ne flore symbiotique consti-
 is le milieu intestinal des
 lication, et dont une des
 on d'enzymes, en particulier
 ot ne réside donc pas dans
 réter un ferment spécifique
 s émises déjà par FLORKIN
 la cellulase, dans celui de
 es conditions biochimiques
 et à la prolifération d'une

RECHERCHE SYSTÉMATIQUE DE LA PRÉSENCE DE CHITINASE ET DE BACTÉRIES CHITINASQUES CHEZ D'AUTRES MOLLUSQUES GASTÉROPODES

Les rares données que l'on possède sur la répartition zoologique des chitinases sont surtout qualitatives : on sait seulement que le liquide intestinal de *Helix aspersa* est aussi riche en cet enzyme que celui de *H. pomatia*, et que, par rapport au poids frais total, des extraits aqueux de Lombrics ont une teneur en chitinase du même ordre de grandeur que pour *H. pomatia* (TRACEY, 1951).

Nous avons entrepris de déterminer quantitativement la teneur en chitinase des liquides intestinaux d'autres Mollusques. Afin de comparer ces résultats à ceux accumulés pour l'Escargot de Bourgogne, nous avons essayé, pour quelques espèces, de préciser la localisation de l'enzyme, ainsi que la localisation, l'abondance et la nature de la flore chitinolytique intestinale. Nous détaillons, au cours de ce chapitre, les techniques employées et les premiers résultats de ces recherches actuellement en cours.

A. MÉTHODE POUR EXPRIMER QUANTITATIVEMENT LA TENEUR EN CHITINASE DES CONTENUS INTESTINAUX.

1. Dosage de la chitinase.

Le dosage est effectué par mesures néphélométriques des variations de trouble manifestées par la chitine en suspension, en présence des solutions enzymatiques, dans les conditions optimales décrites plus haut (p. 10). Pour comparer quantitativement ces solutions de liquides intestinaux d'animaux différents, nous avons choisi le liquide intestinal de *H. pomatia* comme élément de référence. Nous exprimons donc l'activité chitinasique des solutions étudiées en Unités arbitraires de chitinase d'*Helix*

pomatia (en abrégé : Unités-chitinase H. p.), en nous référant aux courbes étalon et à la définition de l'Unité arbitraire de chitinase donnée au début de ce travail (voir p. 11).

2. Expression des Unités-chitinase.

Connaissant le nombre d'Unités-chitinase H. p. auquel correspond l'activité de 1 ml de la dilution enzymatique étudiée, il est aisé de calculer le nombre d'Unités par ml de liquide intestinal brut. Toutefois, comme on l'a vu précédemment (p. 17), la teneur en chitinase du liquide intestinal par unité de volume varie sensiblement avec l'état physiologique (jeûne ou période d'alimentation) de l'animal. On peut corriger partiellement cette erreur en calculant le nombre total d'Unités de tout le liquide intestinal, dont on a mesuré exactement le volume au moment du prélèvement.

Ce mode d'expression, s'il convient pour comparer entre eux des animaux de même âge et de même taille, entraîne une disproportion considérable des résultats lorsqu'on compare des jeunes à des adultes, ou des espèces de petite taille à des espèces de grande taille. On peut éliminer cette cause d'erreur en faisant le rapport du nombre total d'Unités du contenu intestinal au poids frais de l'animal, diminué du poids de la coquille, s'il en a une. En effet, la coquille de Mollusques de même taille peut être extrêmement variable en développement d'une espèce à l'autre ; d'autre part, chez une même espèce, des individus dont les poids frais sans coquille sont presque identiques peuvent porter des coquilles dont le poids varie du simple au double. (Exemples : Deux *Helix pomatia*, de poids frais 25.260 gr et 23.150 gr portent des coquilles dont les poids sont respectivement de 3.840 gr et de 6.250 gr. Deux autres individus pesant 15.2 gr et 14.2 gr portent des coquilles respectivement de 3.4 et 6.9 gr). Nous conviendrons d'appeler « poids de chair » le poids frais diminué du poids de la coquille.

Le tableau 11 compare les différents modes d'expression de la teneur en chitinase intestinale de 5 lots de 2 escargots (*Helix pomatia*), différents par leur âge et leur taille. C'est le rapport du nombre d'Unités au poids de chair qui fournit les valeurs les plus constantes.

Lot n°	Pds de « chair »	Vol. liqu.
1	31.5 g	1
2	35.8 g	1.
3	18.9 g	0.
4	29.4 g	0.
5	12.25 g	0.

3. Manipulations.

Les animaux étudiés sont prélevés sur plusieurs individus. On dégage le tube digestif et on le sépare du corps. On le lave dans un tube gradué et on dilue le liquide récolté dans l'eau stérilisée à l'ébullition et on centrifuge (à 1000 tours/mn, 5 minutes, froide). On peut constater que dans un lot où on en dose la teneur en chitinase, on trouve que le nombre d'Unités par ml de liquide intestinal, en tenant compte du poids de chair, est constant d'Unités, et enfin le rapport du nombre d'Unités au poids de chair est constant.

Un lot d'animaux étudiés par prélèvement aseptique a été recherché de bactéries par des méthodes successives et des inoculations successives et des inoculations successives et des inoculations successives (méthodes de prélèvement et de culture ont été décrites précédemment).

B. LA CHITINASE

Nous avons examiné les pulmons de Pulmonés terrestres et nous avons constaté que ces espèces renferment une substance de couleur rougeâtre.

d'une nette activité chitinasique. La grande espèce tropicale *Achatina fulica* fournit un liquide particulièrement abondant et actif, mais des espèces de petite taille, telles que *Succinea putris* et *Agriolimax agrestis* possèdent une chitinase intestinale à peine deux fois moins abondante, par rapport au poids de chair (tableau 12).

Il semble donc que la présence de chitinase dans le liquide intestinal est un fait commun à tous les Gastéropodes Pulmonés terrestres. La localisation et les variations quantitatives de la chitinase chez les espèces étudiées sont identiques à ce qu'elles sont chez *Helix pomatia* :

a) *Localisation dans le tube digestif*: En recueillant séparément le contenu des différents tronçons intestinaux (estomac, cæcum et première anse intestinale, intestin postérieur) de *Helix aspersa* et de *Arion rufus*, nous avons constaté que la chitinase est abondante dans l'estomac, un peu moins abondante dans l'intestin moyen, et 6 fois moins concentrée dans l'intestin postérieur.

b) *Teneur en chitinase de l'hépatopancréas*: Les hépatopancréas de *Arion rufus* et de *Achatina fulica* sont lavés, séchés sur papier filtre, puis broyés dans un mortier sur sable. Après centrifugation en glacière, on mesure le volume de liquide obtenu; après dilution adéquate, on en dose la chitinase par méthode néphélométrique. Nous comparons, dans le tableau 13, la teneur en chitinase des broyats d'hépatopancréas à celle des liquides intestinaux des mêmes individus.

Comme chez *Helix pomatia*, les extraits d'hépatopancréas de ces deux espèces contiennent une chitinase environ 10 fois moins concentrée que dans le liquide intestinal. D'autre part, chez *A. rufus*, on voit que la teneur en chitinase du liquide intestinal par unité de volume diminue lorsque le Mollusque se réalimente, tandis que la teneur en chitinase de l'hépatopancréas ne paraît pas subir de variations.

TABLEAU 12. — Teneur en chitinase de plusieurs gastéropodes.

Espèce	Nb. d'individus
<i>Achatina fulica</i> Fer.	1 } (1) 1 } (1)
<i>Helix nemoralis</i> L.	6 } (3) 5 } (3)
<i>Helix pomatia</i> L.	(no)
<i>Helix aspersa</i> O. F. Müll.	3 } (3) 3 } (3)
<i>Arion rufus</i> L.	3 } (3) 2 } (2)
<i>Limax cinereoniger</i> Wolf.	2 } (2)
<i>Agriolimax agrestis</i> L.	15 } (15) 19 } (19) 8 } (8)
<i>Succinea putris</i> L.	12 } (12)

(1) à jeun depuis 24 heures

(2) à jeun depuis 48 heures

(3) environ 4 heures après

TABLEAU 13. — Teneur en chitinase de l'hépatopancréas et du liquide intestinal.

Espèce	Nb. et conditions
<i>Arion rufus</i> L.	3, à jeun 2, nourri
<i>Achatina fulica</i> Fer.	1, à jeun 1, à jeun

c) Nous avons suivi la teneur en chitinase du liquide intestinal est rapidement diluée à la fin du jeûne. Unités/ml à 9.5 Unités/ml

grande espèce tropicale particulièrement abondant et telles que *Succinea putris* la chitinase intestinale à rapport au poids de chair

chitinase dans le liquide s Gastéropodes Pulmonés tions quantitatives de la t identiques à ce qu'elles

: En recueillant séparément intestinaux (estomac, intestin postérieur) de s avons constaté que la un peu moins abondante concentrée dans l'intestin

mnécréas: Les hépatopancreas sont lavés, séchés sur er sur sable. Après centri-lume de liquide obtenu ; la chitinase par méthode s le tableau 13, la teneur réas à celle des liquides

its d'hépatopancréas de ase environ 10 fois moins inal. D'autre part, chez nase du liquide intestinal Mollusque se réalimente, hépatopancréas ne paraît

TABLEAU 12. — Teneur en chitinase des liquides intestinaux de plusieurs gastéropodes pulmonés terrestres.

Espèce	Nb d'individus	Pds de chair	Volume tot. contenu intestinal	Nb d'Unités-chitina-se H. p. par ml.	Nb d'unités-chit. par gr. de chair.
Achatina fulica Fer.	1	48.5 g	3.4 ml	24	1.7
	1 } (1)	48.2 g	3 ml	29	1.8
Helix nemoralis L.	6 } (3)	7.44 g	0.55 ml	16	1.18
	5 } (1)	8.77 g	0.45 ml	22.5	1.15
Helix pomatia L.	(moyenne de 5 mesures : voir tableau 11)			23.2	0.93
Helix aspersa O. F. Müll.	3 } (2)	13.75 g	0.7 ml	17	0.85
	3 } (2)	9.1 g	0.6 ml	14	0.92
Arion rufus L.	3 (2)	22.65 g	1.2 ml	18	0.88
	2 (3)	22 g	2 ml	10	0.90
Limax cinereoniger Wolf.	2 (2)	35.3 g	1.4 ml	22	0.88
Agriolimax agrestis L.	15	8.72 g	0.75 ml	9	0.77
	19 } (2)	8.11 g	0.75 ml	9	0.83
	8	3.57 g	0.45 ml	5	0.63
Succinea putris L.	12 (1)	4.47 g	0.4 ml	9.2	0.81

(¹) à jeun depuis 24 heures.

(²) à jeun depuis 48 heures.

(³) environ 4 heures après alimentation.

TABLEAU 13. — Teneur en chitinase de l'hépatopancréas.

Espèce	Nb. d'individus et conditions de vie	Extrait Hépatop. Unités /ml	Liqu. Intestinal Unités /ml
Arion rufus L.	3, à jeun 48 h.	2.2	18
	2, nourris depuis 4 h.	2.1	10
Achatina fulica Fer	1, à jeun 24 h.	2.75	24
	1, à jeun 24 h.	3	29

c) Nous avons suivi les variations de la concentration en chitinase du liquide intestinal chez *H. aspersa*. Le liquide intestinal est rapidement dilué au cours des 4 premières heures qui suivent la fin du jeûne, et sa teneur en chitinase tombe de 17 Unités /ml à 9.5 Unités /ml, ce qui indique l'absence de chitinase

omme nous l'avons montré

D. CONCLUSIONS.

CHITINASIQUE INTESTINALE.

ropodes nous a permis de
semblable à celle d'*H. pom-*
le bactéries chitinolytiques
tefois chez *Helix aspersa*,
riche. Au point de vue de
presque uniquement des
correspondent aux 4 types
avons décrits au début de ce
fréquent chez *H. pomatica*,
espèces, sauf chez *Helix*
tableau 14). La flore intesti-
na putris n'a pas encore été
aines recherches.

de ces bactéries, nous avons
trois fois plus de bactéries
stin moyen) que dans les
e plus, en cet endroit, la
e de bactéries appartenant

intestinale de quelques
terrestres.

Tous les Gastéropodes Pulmonés terrestres que nous avons étudiés possèdent une chitinase intestinale. Celle-ci est surtout concentrée dans l'estomac ; les extraits d'hépatopancreas contiennent une chitinase faiblement concentrée, mais on ne peut déceler aucune augmentation de la teneur en chitinase de la glande ni du liquide intestinal au moment où cette glande sécrète. D'autre part, chez toutes les espèces où nous les avons recherchées des bactéries chitinolytiques semblables à celles de la flore intestinale d'*Helix pomatia* pullulent dans le tube digestif, principalement dans le cæcum. Devant la répétition de ces constatations, nous croyons pouvoir généraliser au groupe des Gastéropodes Pulmonés terrestres la faculté d'héberger dans leur tube digestif des bactéries caractéristiques, rares ou inexistantes dans le milieu extérieur, dont le développement est favorisé par certains éléments biochimiques du milieu intestinal communs à ces Mollusques, et dont une des conséquences de leur prolifération est la production d'une exochitinase dont l'hôte est susceptible de tirer profit.

Nous nous proposons de poursuivre ces recherches sur d'autres groupes de Mollusques et d'Invertébrés. Une première investigation chez la Limnée (Pulmoné aquatique) semble indiquer l'absence de chitinase et de bactéries chitinasiques. Si ce fait se vérifie, une comparaison biochimique des milieux intestinaux de l'Escargot et de la Limnée serait susceptible de révéler la nature de l'élément qui permet aux Pulmonés terrestres d'héberger une flore chitinasique intestinale.

Eubactériales (en % du n. total)	Actino- mycètes			
	II	III	IV	
5%	50%	5%	—	—
3%	45%	15%	—	—
5%	15%	—	30%	10%
9%	5%	25%	20%	—
9%	12%	40%	8%	—
non identifiées				
1%	20%	—	—	5%
9%	15%	—	—	—

BIBLIOGRAPHIE

- BENEKE, W., *Botan. Zeit.*, 1905, 63, 227.
BÜCHNER, P., *Tier und Pflanze in Symbiose*, Berlin, 1930.
BUCHERER, H., *Zblt. f. Bact.*, 1933, 89, 273.
—, *Cblt. f. Bact.*, 1935, 94, 12.
CLEVELAND, L. R., *Biol. Bull.*, 1925, 48, 284 et 455.
FLORKIN, M., *Ann. Rev. Biochem.*, 1952, 21, 459.
FLORKIN, M. et LOZET, F., *Arch. Internat. Physiol.*, 1949, 57, 201.
FLORKIN, M., LOZET, F. et SARLET, H., *Arch. internat. Physiol.*, 1949, 57, 71.
GRASSMAN, W., ZECHMEISTER, L., BENDER, R. et TOTH, G., *Ber. Deutsch. Chem. Gesell.*, 1934, 67 (B), 1.
HOCK, C. W. — *Biol. Bull.*, 1940, 79, 199.
JORDAN, H. J., *Arch. Neerland. Physiol.*, 1918, 2, 47.
JOHNSON, D. E., *J. Bact.*, 1932, 24, 335.
KARRER, P. et HOFMANN, A., *Helv. Chim. Acta*, 1929, 12, 616.
KRIJGSMAN, B. J., *Z. Vergl. Physiol.*, 1925, 2, 264.
—, *Z. Vergl. Physiol.*, 1928, 8, 187.
KRUEGER, P., *Ergebn. Physiol. und Exper. Pharmak.*, 1933, 35, 538.
JEUNIAUX, Ch., a) *Arch. internat. Physiol.*, 1950, 58, 350.
—, b) *Arch. internat. Physiol.*, 1950, 58, 352.
—, c) *Arch. internat. Physiol.*, 1950, 58, 354.
—, *Arch. internat. Physiol.*, 1951, 59, 242.
LAMEERE, A., *Précis de Zoologie*, Bruxelles, 1933.
MEISENHEIMER, J., *Die Weinbergschnecke*. Leipzig, 1912.
POSTMA, M., VETTER, W. L., WITMER, J. H. M., *Proc. Konink. Akad. Wetenschappen*, 1949, 52, 3.
RAMME, W., *Sitz. Ges. Naturf. Fr.* Berlin, 1920, p. 130.
ROSEN, B., *Z. Vergl. Physiol.*, 1934, 21, 176.
—, *Zool. Jhrb. Physiol.*, 1941, 60, 241.
SCHULZE, P., *Z. f. Morph. Oekol. Tiere*, 1927, 9, 333.
TRACEY, M. V., *Nature*, 1951, 167, 776.
TRACEY, M. V., Communication au 2^e Congrès internat. de Biochimie, Paris, 1952 (sous presse).
VAN WEEL, P. B., *Physiologia comparata et Oecologia*, 1950, 2, 1.

WIGGLESWORTH, V. B., *The*
1947.

YONGE, C. M., *Biol. Reviews*

ZECHMEISTER, L. et TOTH, G.

—, *Ber. Deutsch. Chem. Ge.*

—, *Fortschr. Chem. Organ.*

—, *Enzymologia*, 1939, 7,

ZECHMEISTER, L., TOTH, G.

TRAGER, W., *Biochem. J.*

HIE
e, Berlin, 1930.
84 et 455.
1, 459.
Physiol., 1949, 57, 201.
h. internat. Physiol., 1949, 57,
R. et TOTH, G., *Ber. Deutsch.*
18, 2, 47.
Acta, 1929, 12, 616.
2, 264.
r. Pharmak., 1933, 35, 538.
1950, 58, 350.
52.
4.
s, 1933.
Leipzig, 1912.
H. M., *Proc. Konink. Akad.*
920, p. 130.
7, 9, 333.
grès internat. de Biochimie,
Ecologia, 1950, 2, 1.

WIGGLESWORTH, V. B., *The principles of Insect physiology*. New-York, 1947.
YONGE, C. M., *Biol. Reviews*, 1937, 12, 87.
ZECHMEISTER, L. et TOTH, G., *Ber. Deutsch. Chem. Gesell.*, 1931, 64, 2028.
—, *Ber. Deutsch. Chem. Gesell.*, 1932, 65, 161.
—, *Fortschr. Chem. Organ. Naturst.*, 1939, 2, 212.
—, *Enzymologia*, 1939, 7, 165.
ZECHMEISTER, L., TOTH, G. et VAJDA, E., *Enzymologia*, 1939, 7, 170.
TRAGER, W., *Biochem. J.*, 1932, 26, 1762.