

107.

Polysaccharides.

CHITINE ET PHYLOGÉNIE :
APPLICATION D'UNE MÉTHODE ENZYMATIQUE DE DOSAGE
DE LA CHITINE,

par Charles JEUNIAUX.

Institut Léon Fredericq, Biochimie, Université de Liège, (Belgique).

(Mémoire reçu le 17 juillet 1965).

I. — INTRODUCTION.

C'est en 1799 que l'anglais HACHETT [1] observa pour la première fois que, après décalcification des carapaces de Crustacés, on obtient un matériel organique souple, très résistant à la dégradation chimique, et qui garde dans ses moindres détails la forme et les caractères ornementaux de la carapace. Le chimiste français ODIER [2] inventa, en 1823, le terme *chitine* (du grec $\chi\iota\tau\omicron\nu\nu$ qui signifie cotte d'armes, tunique) pour caractériser cette substance organique, identifiée plus tard comme un haut polymère linéaire d'unités de N-acétyl-D-glucosamine liées par des ponts β -glucosidiques.

Le terme *chitine*, en passant dans le langage courant des naturalistes et des entomologistes, fut malheureusement souvent mal utilisé, au point que, encore actuellement, beaucoup d'auteurs lui donnent le sens vague de « cuticule » ou de « matière durcissante ».

A cette confusion, il faut ajouter que l'on n'a jamais disposé de méthodes vraiment spécifiques permettant de déceler la chitine sans équivoque. Il n'est donc pas étonnant que la distribution de la chitine chez les êtres vivants soit restée jusqu'aujourd'hui fort mal connue.

Il est cependant incontestable que la distribution de la chitine méritait d'être élucidée définitivement, notamment en raison du fait que la nature chimique des téguments et des pièces squelettiques des animaux est volontiers invoquée par les systématiciens pour confirmer des parentés phylogéniques. C'est la raison pour laquelle nous avons cherché à identifier avec certitude la présence de chitine dans toute une série de structures squelettiques ou cuticulaires, appartenant aux animaux les plus divers.

Il n'était évidemment pas question de recourir à une quelconque des méthodes classiques qui n'avaient donné, jusqu'à présent, que des résultats incertains et parfois contradictoires. Ces méthodes sont d'ail-

leurs purement qualitatives, et ne donnent aucune idée de l'importance quantitative du polysaccharide chitine dans la constitution chimique des structures étudiées.

Le présent travail comporte la description d'une méthode enzymatique, hautement spécifique, quantitative et suffisamment sensible pour déceler de très faibles quantités de chitine. Cette méthode est basée sur l'utilisation, comme réactif spécifique de la chitine, de chitinases purifiées. Certains auteurs, comme RICHARDS [3] et TRACEY [4] avaient déjà suggéré l'utilisation de chitinases comme réactif spécifique de la chitine, mais la méthode n'avait jamais été mise au point ni utilisée, et était restée une vue théorique. En fait, une telle méthode reste aussi peu spécifique que les autres tant que les enzymes employés ne sont pas rigoureusement purifiés. La purification d'une chitinase à partir de filtrats de culture de *Streptomyces antibioticus* [5, 6, 7] nous a permis de mettre au point une méthode enzymatique de dosage de la chitine, et de l'appliquer à l'étude de la distribution de ce polysaccharide. Un tableau comparé des résultats obtenus nous permettra de discuter brièvement l'évolution de la biosynthèse de la chitine dans le règne animal.

II. — MÉTHODE ENZYMATIQUE POUR LE DOSAGE DE LA CHITINE PURIFIÉE.

Nous avons tout d'abord défini les conditions permettant de mesurer quantitativement une quantité connue de chitine pure, en hydrolysant complètement la chitine au moyen d'une préparation de chitinase purifiée, et en dosant les produits d'hydrolyse.

1. Principe.

Les chitinases que nous avons utilisées ont été purifiées à partir de filtrats de culture de *Streptomyces antibioticus* (WAKSMAN et WOODRUFF) WAKSMAN et HENRICI [8]. La purification a été réalisée selon le procédé décrit antérieurement [6]. Ces chitinases purifiées catalysent spécifiquement l'hydrolyse de la chitine, et ne dégradent aucun autre polysaccharide [7]. Au cours de la purification, la chitinase (chitine glycanohydrolase : E.C. 3.2.1.14) est isolée de la chitobiase (chitobiose acétylaminoxyglucohydrolase : E.C. 3.2.1.29) qui hydrolyse le chitobiose et le chitotriose en acétylglucosamine. L'hydrolyse de la chitine par les chitinases purifiées s'arrête donc au stade du chitobiose et du chitotriose. Comme on ne possède pas de méthode pour le dosage de ces deux oligomères de l'acétylglucosamine, on les hydrolyse à leur tour au moyen de chitobiase, et on mesure l'acétylglucosamine libérée par la méthode de REISSIG, STROMINGER et LELOIR [9]. Comme source de chitobiasés, nous utilisons soit des préparations commerciales de β -glucosidase de la Nutritional Biochemicals Corporation, soit du sérum de homard en intermue.

BULL. SOC. CHIM. BIOL., 1965, 47, n° 12.

Toutefois, l'addition de aux chitinases risquerait d'efficacité propre à la méthode difficulté en réalisant l'hydrolysées. Au cours de la par une solution de chitine soit hydrolysée. On centrifugant les produits de la seconde étape, un échantillon une solution de chitobiase (AG) libérée après hydrolyse.

2. Procédé.

a) *Première étape.* — D... comprenant entre 0 et 7... dans 1 ml de tampon acide... 1 ml de solution de chitine... unités néphélométriques/ml... On ajoute un cristal de thymol... au moyen d'un bouchon... heures. On agite de temps... pension. Après incubation... nageant.

b) *Seconde étape.* — C... liquide surnageant compri... tion de chitobiasés (β -gluc... homard dilué 10 fois par d... telle que le volume total s... n'ajoute pas de solution... pH 5,2-5,5. On incube à 37... cubation, on prélève 2 ml... enzymes et précipite les... 100°C. Après centrifugatio... 0,5 ml [9].

A partir de la quantité... valeur des blancs, on cal... valeur, multipliée par le... d'un reste d'AG dans la mo... à la quantité de chitine.

c) *Blancs.* — Un blanc... mérés ci-dessus à l'exclusi... mêmes manipulations. Le... nulles ou très faibles.

BULL. SOC. CHIM. BIOL., 1965, 47, n° 12.

Toutefois, l'addition de ces solutions de chitobiasés non purifiées aux chitinases risquerait de compromettre le caractère de haute spécificité propre à la méthode que nous proposons. Nous avons pallié cette difficulté en réalisant l'hydrolyse complète de la chitine en deux étapes séparées. Au cours de la première étape, le matériel étudié est traité par une solution de chitinases purifiées, jusqu'à ce que toute la chitine soit hydrolysée. On centrifuge et on recueille la solution surnageante contenant les produits d'hydrolyse de la chitine. Au cours de la seconde étape, un échantillon de la solution surnageante est traité par une solution de chitobiasés, et on dose l'acétylglucosamine (en abrégé AG) libérée après hydrolyse complète du chitobiose.

2. Procédé.

a) *Première étape.* — Dans un tube à centrifuger, le matériel étudié, comprenant entre 0 et 7 mg de chitine pure, est mis en suspension dans 1 ml de tampon acide citrique 0,3 M- Na_2HPO_4 0,6 M. On ajoute 1 ml de solution de chitinases purifiées (fraction SA₂-50), titrant 400 unités néphélométriques/ml (soit 0,92 mg de chitinases purifiées/ml). On ajoute un cristal de thymol comme antiseptique. Le tube est obturé au moyen d'un bouchon de caoutchouc et porté à 37°C pendant 10 heures. On agite de temps en temps pour remettre le matériel en suspension. Après incubation, on centrifuge et on décante le liquide surnageant.

b) *Seconde étape.* — On prélève très exactement un volume de liquide surnageant compris entre 0,5 et 2 ml ; on ajoute 2 ml de solution de chitobiasés (β -glucosidase N.B. Co, 0,5 g/100 ml, ou sérum de homard dilué 10 fois par de l'eau distillée), une quantité d'eau distillée telle que le volume total soit égal à 5 ml, et un cristal de thymol. On n'ajoute pas de solution tampon, le milieu étant resté tamponné à pH 5,2-5,5. On incube à 37°C en tube bouché. Après 2 et 4 heures d'incubation, on prélève 2 ml du milieu réactionnel, dont on inactive les enzymes et précipite les protéines par 10 minutes de chauffage à 100°C. Après centrifugation, on dose l'AG sur deux prises d'essai de 0,5 ml [9].

A partir de la quantité d'AG mesurée, et après avoir défalqué la valeur des blancs, on calcule la quantité d'AG totale libérée. Cette valeur, multipliée par le facteur 0,92 (rapport du poids moléculaire d'un reste d'AG dans la molécule de chitine à celui de l'AG) correspond à la quantité de chitine.

c) *Blancs.* — Un blanc, constitué par l'ensemble des réactifs énumérés ci-dessus à l'exclusion du matériel biologique étudié, subit les mêmes manipulations. Les valeurs de ce blanc sont généralement nulles ou très faibles.

Un second blanc, important pour l'interprétation correcte des résultats, est constitué par le matériel biologique étudié et par tous les autres réactifs, à l'exclusion de la solution de chitinases. Il permet de déceler la présence d'AG ou de chitobiose provenant du matériel étudié, mais ne résultant pas d'une hydrolyse de la chitine par les chitinases.

3. Sensibilité de la méthode.

Nous avons contrôlé la sensibilité de la méthode en l'appliquant au dosage d'une quantité déterminée de chitine native purifiée de sépions de Seiche (pulvérisation mécanique par meulage, décalcification par HCl 0,5 N, lavages, ébullition dans NaOH 0,5 N pendant 4 h, lavages à l'eau distillée jusqu'à pH 6, et dessiccation à poids constant). Trois lots de 7,1 mg de chitine sèche ont été soumis aux manipulations décrites ci-dessus. L'incubation en présence de chitinases purifiées a été interrompue après 6, 12 et 24 heures d'incubation à 37°C. Ensuite, dans chaque cas, 1 ml de liquide surnageant après centrifugation a été incubé à 37°C pendant 2 et 4 heures, après addition de chitobiasés. Les résultats du dosage de l'AG sont présentés dans le Tableau I.

TABLEAU I.
Application de la méthode enzymatique
au dosage de 7,1 mg de chitine purifiée d'os de Seiche.

Première étape (hydrolyse par chitinases) Durée d'incubation en h	Seconde étape (hydrolyse par chitobiasés)		AG totale libérée en mg (1)	Quantité de chitine cor- respondante, mg (2)	Chitine mesurée en p. 100 du poids sec initial
	Durée d'in- cubation en h	AG µg/ml			
6.....	2	808	7 254	6 673	94
	4	808			
12.....	2	837	7 515	6 914	97,4
	4	837			
24.....	2	770	6 912	6 359	89,5
	4	770			
Blanc sans chitine :					
12.....	4	0	—	—	—
Blanc sans chiti- nases .					
12.....	4	2,0	—	—	—

(1) La valeur précédente, diminuée de la valeur des blancs, est multipliée par 9 (deux dilutions successives au 1/3).

(2) La quantité d'AG libérée est multipliée par 0,92 (rapport du poids moléculaire d'un reste d'AG dans la molécule de chitine à celui de l'AG libre).

BULL. SOC. CHIM. BIOL., 1965, 47, n° 12.

4. Discussion.

Le Tableau I permet de ti

1. En ce qui concerne la p
à 37°C permet d'obtenir l'hy
chitineux (97,4 p. 100). L'hy
plète après 6 heures. Une in
pas ce rendement.

2. En ce qui concerne la
biasés est complète après de

3. La quantité de chitine
très voisine (97,4 p. 100) de
chitineux purifié et desséch

III. — DOSAGE DE LA CHITINE DANS DES STRUCTURES

Nous avons appliqué la m
dosage de chitine préalable
de la chitine contenue dan
(*Bombyx mori* L.) fraîchem
quides conservateurs.

1. Résultats.

Les résultats de ces essa
peuvent être interprétés de

a) La quantité de chitine
par les chitinases purifiées
tité totale (1,7 p. 100 du poi
totale en représente 30 p. 1

b) La quantité de chitine
nases purifiées n'est pas ac
fragmente mécaniquement l
d'enzyme. Par contre, cette
sable est moindre si l'on u
chées à 100°C.

c) Après un traitement p
par la soude 0,5 N à 100°C,
chitinases purifiées est nette
masquage» de la chitine.

d) Le démasquage de la ch

e) Le traitement par NaO
quantité de chitine égale à
valeur proche de celle obten

BULL. SOC. CHIM. BIOL., 1965, 47,

étation correcte des résultats étudiés et par tous les types de chitinases. Il permet l'analyse provenant du matériel analysé de la chitine par les

méthode en l'appliquant au matériel native purifiée de sépiens (séchage, décalcification par $0,5\text{ N}$ pendant 4 h, lavages à poids constant). Trois fois mis aux manipulations des chitinases purifiées a été incubation à 37°C . Ensuite, après centrifugation a été ajoutée de chitobiasés. Résultats dans le Tableau I.

enzymatique
purifiée d'os de Seiche.

Quantité de chitine correspondante, mg (2)	Chitine mesurée en p. 100 du poids sec initial
6 673	94
6 914	97,4
6 359	89,5
6 417	90,4
—	—
—	—

leur des blancs, est multipliée

par 0,92 (rapport du poids moléculaire de la chitine à celui de l'AG libre).

4. Discussion.

Le Tableau I permet de tirer les conclusions suivantes :

1. En ce qui concerne la première étape, une incubation de 12 heures à 37°C permet d'obtenir l'hydrolyse de la presque totalité du matériel chitineux (97,4 p. 100). L'hydrolyse de la chitine est déjà presque complète après 6 heures. Une incubation de plus longue durée n'augmente pas ce rendement.

2. En ce qui concerne la seconde étape, l'hydrolyse par les chitobiasés est complète après deux heures d'incubation à 37°C .

3. La quantité de chitine mesurée par la méthode enzymatique est très voisine (97,4 p. 100) de la valeur obtenue par pesée du matériel chitineux purifié et desséché.

III. — DOSAGE DE LA CHITINE « LIBRE » ET DE LA CHITINE « MASQUÉE » DANS DES STRUCTURES CUTICULAIRES OU SQUELETTIQUES.

Nous avons appliqué la méthode enzymatique, mise au point pour le dosage de chitine préalablement purifiée (voir ci-dessus), au dosage de la chitine contenue dans des cuticules de larves de vers à soie (*Bombyx mori* L.) fraîchement isolées, desséchées ou gardées en liquides conservateurs.

1. Résultats.

Les résultats de ces essais sont rassemblés dans le Tableau II, et peuvent être interprétés de la manière suivante.

a) La quantité de chitine d'une cuticule directement hydrolysable par les chitinases purifiées ne représente qu'une fraction de la quantité totale (1,7 p. 100 du poids de cuticules sèches, alors que la chitine totale en représente 30 p. 100 environ).

b) La quantité de chitine directement hydrolysable par les chitinases purifiées n'est pas accrue si l'on prolonge l'incubation, si on fragmente mécaniquement la cuticule ou si on augmente la quantité d'enzyme. Par contre, cette quantité de chitine directement hydrolysable est moindre si l'on utilise des cuticules préalablement desséchées à 100°C .

c) Après un traitement préalable des cuticules par le diaphanol ou par la soude $0,5\text{ N}$ à 100°C , la quantité de chitine hydrolysée par les chitinases purifiées est nettement plus élevée. On peut parler de « démasquage » de la chitine.

d) Le démasquage de la chitine par le diaphanol est médiocre.

e) Le traitement par $\text{NaOH } 0,5\text{ N}$ à 100°C permet de démasquer une quantité de chitine égale à 30,8 p. 100 du poids de cuticules sèches, valeur proche de celle obtenue par pesée du résidu sec après isolement

de la chitine par les procédés classiques (34,4 p. 100). Cette différence peut être partiellement due à la présence, dans ce résidu, de substances autres que la chitine, non entièrement éliminées par le procédé d'isolement utilisé.

f) Quel que soit l'état du matériel étudié, les résultats obtenus sont fort voisins, sauf si le matériel a été préalablement desséché à 100°C.

TABLEAU II.

Application de la méthode enzymatique au dosage de la chitine libre et de la chitine totale après « démasquage » par NaOH ou par le diaphanol, dans des cuticules larvaires de Bombyx mori (1) (2), fraîches, desséchées ou en liquides conservateurs.

Etat du matériel étudié	Poids sec calculé en mg (3)	Démasquage de la chitine par	AG totale libérée en mg	Chitine (4) hydrolysée, en mg	Chitine, en p. 100 du poids sec calculé
Frais	2,3	—	0,042	0,039 (5)	1,7
Frais	2,7	Diaphanol 24 h à 20°C	0,183	0,169	6,2
Frais	2,3	NaOH 0,5 N 6 h à 100°C	0,772	0,710 (6)	30,8
En eau saturée de thymol	3,7	NaOH 0,5 N 6 h à 100°C	1,209	1,133 (6)	30,5
En alcool 50°	2,4	NaOH 0,5 N 6 h à 100°C	0,770	0,708 (6)	29,5
Desséché à 100°C	3,8	—	0,015	0,014 (5)	0,36
Desséché à 100°C	3,8	NaOH 0,5 N 6 h à 100°C	0,890	0,819 (6)	21,5

(1) Portion notale des cinq premiers segments abdominaux de larves adultes (8^e jour après la 4^e mue).

(2) Poids du résidu après extraction de la chitine par les procédés classiques (HCl 0,5 N à froid, NaOH 0,5 N 100°C, 12 h, KMnO₄ 0,2 p. 100 50°C 20 mn, Na₂S₂O₃ saturé, lavages à l'eau bouillante et dessiccation à poids constant) : 34,4 p. 100 du poids de cuticule sèche.

(3) Poids du matériel frais multiplié par le rapport du poids frais au poids sec d'un échantillon identique.

(4) Valeur de l'AG totale, en mg, multipliée par 0,92.

(5) Chitine « libre ».

(6) Chitine totale (chitine « libre » + chitine « masquée »).

2. Discussion.

a) La résistance d'une proportion élevée de la chitine cuticulaire à l'hydrolyse par les chitinases purifiées paraît devoir être expliquée par l'existence de liaisons entre la chitine et d'autres substances, notamment des protéines. L'existence de tels complexes chitine-protéines a été suggérée par les observations de divers auteurs [10, 11, 12, 13]

BULL. SOC. CHIM. BIOL., 1965, 47, n° 12.

et une démonstration définie par FOSTER et HACKMAN [15]. La chitine-protéines, soit par hydrolyse alcaline ou par protéolyse aux acides aminés par le diaphanol, soit par les complexes et d'en réagir.

Afin de ne pas préjuger de la formation de ces complexes, la chitine « libre » la chitine « masquée » celle dont l'hydrolyse qu'après rupture des liaisons avec d'autres substances impliquées.

Parmi les divers procédés utilisés, le traitement par les complexes, le traitement par les méthodes classiques. Le traitement par les méthodes classiques pendant 6 heures permet un dosage plus exact que le matériel étudié (épaisseur : 1 mm). Contrairement à ce que l'on pourrait penser, le traitement n'altère pas la sensibilité aux chitinases.

L'application de la méthode enzymatique aux complexes par le diaphanol permet donc de mesurer la chitine libre et de la chitine masquée.

b) Le matériel desséché à 100°C, la chitine, tant libre que masquée. Il convient par conséquent de mesurer la chitine libre, soit du matériel étudié, soit du matériel saturée de thymol.

Pour exprimer quantitativement les résultats, les poids de matériel sec initiaux et finaux, dont l'un sera la chitine libre.

c) En plus de sa spécificité, la méthode enzymatique a l'avantage d'être particulièrement précise. Les quantités de chitine de l'ordre de 0,1 mg. Lorsque la quantité de chitine est de 0,1 mg, la marge d'erreur est de ± 4%.

IV. — APPLICATION DE LA MÉTHODE ENZYMATIQUE À L'ÉTUDE DE LA CHITINE

La méthode enzymatique a été appliquée à la recherche et le dosage de la chitine.

BULL. SOC. CHIM. BIOL., 1965, 47, n° 12.

34,4 p. 100). Cette différence dans ce résidu, de substances aminées par le procédé d'isolement, les résultats obtenus sont généralement desséché à 100°C.

du dosage de la chitine libre masquée» par NaOH ou par le procédé de Bombyx mori (1) (2), conservateurs.

G totale libérée en mg	Chitine (4) hydrolysée, en mg	Chitine, en p. 100 du poids sec calculé
0,042	0,039 (5)	1,7
0,183	0,169	6,2
0,772	0,710 (6)	30,8
1,209	1,133 (6)	30,5
0,770	0,708 (6)	29,5
0,015	0,014 (5)	0,36
0,890	0,819 (6)	21,5

ments abdominaux de larves adultes. La chitine par les procédés classiques, 12 h, KMnO₄ 0,2 p. 100 50°C brillante et dessiccation à poids sec. Le rapport du poids frais au poids sec est de 0,92.

chitine « masquée »).

de la chitine cuticulaire à paraître doit être expliquée par la présence d'autres substances, notamment des complexes chitine-protéines (voir divers auteurs [10, 11, 12, 13]).

et une démonstration définitive en a été apportée par HACKMAN [14] et FOSTER et HACKMAN [15]. La destruction des protéines des complexes chitine-protéines, soit par rupture des liaisons peptidiques par hydrolyse alcaline ou par protéolyse enzymatique, soit par destruction des acides aminés par le diaphanol, permet d'isoler la chitine à partir de ses complexes et d'en réaliser l'hydrolyse enzymatique.

Afin de ne pas préjuger du ou des types de liaisons intervenant dans la formation de ces complexes, nous proposons de considérer comme « chitine libre » la chitine directement sensible aux chitinases, sans traitement préalable du matériel biologique étudié, et comme « chitine masquée » celle dont l'hydrolyse enzymatique ne peut être réalisée qu'après rupture des liaisons ou destruction des protéines ou des autres substances impliquées dans la formation de ces complexes.

Parmi les divers procédés permettant d'isoler la chitine de ses complexes, le traitement par le diaphanol ne nous a pas donné de résultats constants. Le traitement ménagé par la soude 0,5 N à 100°C pendant 6 heures permet un démasquage complet de la chitine, pour autant que le matériel étudié ne soit pas trop compact (épaisseur maximum : 1 mm). Contrairement à l'opinion de TRACEY [4], ce traitement n'altère pas la sensibilité de la chitine à l'hydrolyse par les chitinases.

L'application de la méthode enzymatique après dissociation préalable des complexes par traitement au moyen de soude 0,5 N à 100°C permet donc de mesurer la chitine totale, somme de la chitine libre et de la chitine masquée que contient le matériel étudié.

b) Le matériel desséché à 100°C ne permet pas une mesure correcte de la chitine, tant libre que masquée, par la méthode enzymatique. Il convient par conséquent d'employer systématiquement soit du matériel frais, soit du matériel conservé en alcool 50° ou en eau distillée saturée de thymol.

Pour exprimer quantitativement les résultats obtenus par rapport au poids de matériel sec initial, le matériel étudié sera divisé en deux lots identiques, dont l'un sera utilisé pour la détermination du poids sec.

c) En plus de sa spécificité, la méthode enzymatique présente l'avantage d'être particulièrement sensible. Elle permet de mesurer des quantités de chitine de l'ordre de 20 µg avec une précision de ± 10 p. 100. Lorsque la quantité de chitine mesurée est supérieure à 100 µg, la marge d'erreur est de ± 4 p. 100.

IV. — APPLICATION DE LA MÉTHODE ENZYMATIQUE A L'ÉTUDE DE LA DISTRIBUTION ZOOLOGIQUE DE LA CHITINE.

La méthode enzymatique décrite ci-dessus a été utilisée pour la recherche et le dosage de la chitine, sous forme libre et sous forme

TABLEAU V.
Distribution de la chitine chez les Coelomates Deutérostomiens.

Classification	Structures	Présence (+) ou manque (0) de chitine	Chitine totale en p. 100 du poids de matériel (non calcifié ou décalcifié)	Chitine libre en p. 100 de la chitine totale
Chaetognathes	crochets	+	—	—
Pogonophores	tubes	+	32,9	37
Echinodermes	tests	0	—	—
Entéropeustes	corps entier	0	—	—
Ptérobranches	coenecium (tubes)	0	—	—
Graptolithes (fossiles)	test	0	—	—
Chordés				
Tuniciers	corps entier	0	—	—
Acraniens	corps entier	0	—	—
Vertébrés	corps entier	0	—	—

6) La chitine existe rarement à l'état libre. Elle se présente le plus souvent sous forme « masquée » (probablement sous forme de complexes glycoprotéiques). Il est significatif que les groupes les plus primitifs se caractérisent par de très faibles proportions de chitine libre, tandis que les Mollusques se singularisent par une haute proportion de chitine libre au niveau des coquilles.

V. — DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

La méthode enzymatique pour le dosage de la chitine nous a permis de démontrer de manière irrécusable la présence ou le manque de chitine au niveau des structures squelettiques ou cuticulaires de toute une série d'espèces animales, appartenant aux principaux clades de la série zoologique, et de préciser la part quantitative prise par la chitine, sous forme libre ou masquée, à l'édification des structures étudiées.

Les différentes chitines mises en évidence par la méthode enzymatique présentent entre elles un haut degré d'isologie, puisqu'elles possèdent en commun la propriété d'être hydrolysées en chitobiose par la même préparation purifiée de chitinase, ce qui, étant donné la haute spécificité de cet enzyme, implique l'existence de liaisons β -glycosidiques entre unités d'acétylglucosamine.

On sait, par ailleurs, que la biosynthèse de la chitine est réalisée à partir d'uridine-diphosphate-acétylglucosamine (UDPAG) comme donneur, et que le transfert des unités d'acétylglucosamine sur une chaîne de chitodextrine est catalysée par une chitine-synthétase [17]. Alors

BULL. SOC. CHIM. BIOL., 1965, 47, n° 12.

que l'UDPAG est abondant ou non d'une synthèse n'ont été observées que chez la chenille d'un Lépidoptère. Les propriétés de synthèse de Crustacés et de Mollusques au niveau de la biosynthèse chimie comparée de cet enzyme que l'on puisse admettre, justifie l'étude des synthétases qui président à la biosynthèse de ces enzymes homologues. Les résultats obtenus par des gènes homologues. Les résultats obtenus par la distribution de l'évolution d'un même groupe phylogénique.

La distribution de la chitine libre et la synthèse de ce polysaccharide au niveau de la cellule animale, déjà étudiée chez les Métazoaires, et conservée chez les Cnidaires et des organismes

L'évolution des Coelomates a entraîné la perte de cette propriété, c'est-à-dire la chitine (processus d'« enzymatique ») et la chitine, comme le fait notent les Pogonophores se sont perdus dans la lignée déuterostomienne, la perte de la chitine libre à la base même de la bifurcation de l'arbre phylogénique.

A l'inverse des Deutérostomiens, la chitine caractérise d'abord par la présence de chitine secondairement perdue par les Chaetognathes et les Némertiens, et en l'absence de l'utilisation de ce polysaccharide, la proportion maximum de cette

Une méthode enzymatique quantitative de la chitine a permis de préciser la spécificité des chitinasés par l'étude de la chitine libre et masquée en outre les proportions de chitine libre « masquée » au sein de la chitine totale. Cette méthode a été utilisée pour la recherche de la chitine dans les animaux. Les résultats obtenus par la biosynthèse de la chitine

BULL. SOC. CHIM. BIOL., 1965, 47,

mates Deutérostomiens.

de chitine	Chitine totale en p. 100 du poids de matériel (non calcifié ou décalcifié)	Chitine libre en p. 100 de la chitine totale
	32,9	37
	—	—
	—	—
	—	—
	—	—
	—	—

re. Elle se présente le plus
ment sous forme de com-
que les groupes les plus
les proportions de chitine
risent par une haute pro-
portions.

CONCLUSIONS.

de la chitine nous a permis
présence ou le manque de
des ou cuticulaires de toute
aux principaux clades de
quantitative prise par la chi-
tine des structures étu-

ce par la méthode enzyma-
d'isologie, puisqu'elles pos-
sèdent en chitobiose par
ce qui, étant donné la haute
teneur de liaisons β -glycosi-

de la chitine est réalisée à
l'aide de l'UDPAG) comme don-
neur de glucosamine sur une chaîne
de chitine-synthétase [17]. Alors

que l'UDPAG est abondante dans divers tissus animaux qui sont le siège ou non d'une synthèse de chitine [18, 19], les chitine-synthétases n'ont été observées que chez un champignon (*Neurospora crassa* [17]), chez la chenille d'un Lépidoptère (*Prodenia eridania* [20]) et dans les tissus épidermiques de Crustacés [21]. Le contrôle génétique de la propriété de synthétiser la chitine s'exerce donc, en dernière analyse, au niveau de la biosynthèse de la chitine-synthétase. Bien que la biochimie comparée de cet enzyme soit à peine ébauchée [20], il semble que l'on puisse admettre, jusqu'à preuve du contraire, que les chitine-synthétases qui président à la synthèse de chitines isologues sont des enzymes homologues en ce sens que leur biosynthèse est contrôlée par des gènes homologues. Nous pouvons donc, sur la base des éléments fournis par la distribution zoologique de la chitine, discuter de l'évolution d'un même système biosynthétique le long du buisson phylogénique.

La distribution de la chitine chez les animaux suggère que la biosynthèse de ce polysaccharide est un caractère biochimique primitif de la cellule animale, déjà présent au niveau de la souche unicellulaire des Métazoaires, et conservée au niveau de la souche des Porifères, des Cnidaires et des organismes triblastiques.

L'évolution des Coelomates Deutérostomiens se caractérise par la perte de cette propriété, c'est-à-dire par la perte de la chitine synthétase (processus d'« enzymaphérèse », selon FLORKIN [22]). Si on considère, comme le fait notamment MARCUS [23], que les Chaetognathes et les Pogonophores se sont isolés précocement de la ligne deutérostomienne, la perte de la chitine-synthétase pourrait être localisée à la base même de la bifurcation en Protostomiens et Deutérostomiens de l'arbre phylogénique.

A l'inverse des Deutérostomiens, l'évolution des Protostomiens se caractérise d'abord par la conservation de la biosynthèse de la chitine, secondairement perdue par quelques clades tels que les Platyhelminthes et les Némertiens, et ensuite par une intensification progressive de l'utilisation de ce polysaccharide, les Arthropodes réalisant le développement maximum de cette tendance.

RÉSUMÉ.

Une méthode enzymatique pour la mise en évidence et la mesure quantitative de la chitine a été mise au point, mettant à profit la haute spécificité des chitinases purifiées. Cette méthode permet de déterminer en outre les proportions relatives de chitine libre et de chitine « masquée » au sein de complexes glyco-protéiques. Cette méthode a été utilisée pour la recherche de la distribution de la chitine chez les animaux. Les résultats obtenus permettent de discuter l'évolution de la biosynthèse de la chitine dans le cadre de la phylogénie animale.

SUMMARY.

Using a purified preparation of chitinases, an enzymatic method for the specific detection and the quantitative measurement of chitin is described. This method allows the determination of the free chitin and of the chitin bound to other substances, as in glycoproteic complexes.

This method has been applied to the study of chitin distribution in the animal kingdom. On the basis of this survey, the evolution of chitin biosynthesis is discussed from the point of view of animal phylogeny.

ZUSAMMENFASSUNG.

Eine enzymatische Methode für den Nachweis und die quantitative Bestimmung des Chitins wurde ausgearbeitet; es wird dabei die Spezifität der gereinigten Chitinasen verwendet. Diese Methode erlaubt auch, die relativen Verhältnisse des freien und des maskierten Chitins innerhalb der Glycoproteinkomplexe zu bestimmen. Sie wurde zur Untersuchung der Chitinverteilung im Tierreich benutzt. Die erhaltenen Ergebnisse gestatten die Besprechung der Entwicklung der Chitinbiosynthese im Rahmen der Tierphylogenie.

BIBLIOGRAPHIE.

1. HACHETT, A. — *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, 1799, 315.
2. ODIER, A. — *Mém. Soc. Hist. Nat. Paris*, 1823, 1, 29.
3. RICHARDS, A. G. — *The integument of Arthropods*. Univ. of Minnesota Press, Minneapolis, 1951.
4. TRACEY, M. V. — *Chitin in modern methods of plant analysis*, Paech et Tracey Ed., Springer-Verlag, Berlin, 1955.
5. JEUNIAUX, Ch. — *Biochem. J.*, 1957, 66, 29 P.
6. JEUNIAUX, Ch. — *Arch. internat. Physiol. Biochim.*, 1959, 67, 597.
7. JEUNIAUX, Ch. — *Chitine et chitinolyse, un chapitre de la biologie moléculaire*. Paris, Masson Ed., 1963, 181 P.
8. JEUNIAUX, Ch. — *Arch. internat. Physiol. Biochim.*, 1958, 66, 408.
9. REISSIG, J. L., STROMINGER, J. L. et LOLOIR, L. F. — *J. Biol. Chem.*, 1955, 217, 959.
10. FRAENKEL, G. et RUDALL, K. M. — *Proc. Roy. Soc. (London) B*, 1947, 134, 111.
11. RICHARDS, A. G. et KORDA, F. H. — *Biol. Bull.*, 1948, 94, 212.
12. JEUNIAUX, Ch. — *Arch. internat. Physiol. Biochim.*, 1959, 67, 115.
13. RUNHAM, N. W. — *J. Histochem. Cytochem.*, 1961, 9, 87.
14. HACKMAN, R. H. — *Austr. J. Biol. Sci.*, 1960, 13, 568.
15. FOSTER, A. B. et HACKMAN, R. H. — *Nature*, 1957, 180, 40.
16. WAINWRIGHT, S. A. — *Experientia*, 1962, 18, 18.
17. GLASER, L. et BROWN, D. H. — *J. Biol. Chem.*, 1957, 228, 729.
18. LUNT, M. R. et KENT, P. W. — *Biochem. J.*, 1961, 78, 128.
19. CANDY, D. L. et KILBY, B. A. — *J. Exper. Biol.*, 1962, 39, 129.
20. JAWORSKI, E., WANG, L. et MARCO, G. — *Nature*, 1963, 198, 790.
21. CAREY, F. G. — *Comp. Biochem. Physiol.*, 1965, 12 (sous presse).
22. FLOORKIN, M. — *L'Evolution biochimique*. Desoer et Masson, 1944.
23. MARCUS, E. — *Quart. Rev. Biol.*, 1958, 33, 24.

BULL. SOC. CHIM. BIOL., 1965, 47, n° 12.

Properties

Stability. After 3 m enzyme was repeatedly proximately 10%; after

pH Optimum. Algin the pH range of 7.0-8.0

Salt Activation. The upon salt concentration were K₂SO₄, K₂HPO₄, M

Specificity. Hyaluro polygalacturonate were nuronate and L-guluronate reaction occurred.

Nature of the Products

The crude extract c alginic acid to the m DEAE-cellulose fraction to the monosaccharide. oligosaccharides ranging chaide. These oligosac at the nonreducing end.

Definition and Nomenclature

The complete enzym glucosamine is performe hydrolases, the action of (2-acetamido-2-deoxy)-D-glucosyl hydrolases drolyses the polymers and, to a lesser extent, t glucohydrolase: EN¹ 3.2 acetyl-D-glucosamine) an

¹ Enzyme Nomenclature (I dam, 1965.

² L. R. Berger and D. M. Ro