

## SÉCRÉTION DE CHITINASE PAR LA MUQUEUSE GASTRIQUE ISOLÉE

G. DANDRIFOSSE, E. SCHOFFENIELS ET CH. JEUNIAUX

*Laboratoire de Biochimie, Université de Liège, Liège (Belgique)*

(Reçu le 12 mai, 1964)

### SUMMARY

#### *Secretion of chitinase from isolated gastric mucosa*

A new experimental method is proposed to study the secretion of chitinolytic enzymes. An isolated gastric mucosa, stripped from the adjacent muscle layers separates two pools of physiological saline. The spontaneous electrical potential difference existing between the two solutions is measured together with the secretion of chitinase (chitin glycanohydrolase, EC 3.2.1.14). Our results show that chitinase is secreted in the solution bathing the mucosal side of the epithelium during at least 6 h incubation *in vitro*. The glandular origin of this enzyme is thus demonstrated for the following species: *Anguilla vulgaris* CUV., *Salmo irrideus* L., *Lacerta viridis* LAUR., *Clemmys leprosa* L., *Emys orbicularis* L. and *Rana temporaria* L.

The curves relating the amount of enzyme secreted to time are generally hyperbolic, thus indicating a decrease with time in the enzyme secretion. A partial inactivation of the enzyme secreted has been observed in our experimental conditions. This process is, however, inadequate to explain the general shape of the secretion curves.

A quantitative treatment of the experimental data is proposed by considering the case of a modification of the transfer rate of the enzyme across the membrane.

### INTRODUCTION

L'étude des phénomènes de perméabilité des membranes vivantes porte généralement sur des substances de poids moléculaire peu élevé. Au cours des dernières années, il a ainsi été possible de formuler un certain nombre de critères permettant de définir le mode de passage d'une substance à travers une membrane vivante<sup>1</sup>. Toutefois, en ce qui concerne les substances de poids moléculaire élevé, on connaît généralement peu de choses. C'est pourquoi, nous nous sommes proposés d'aborder l'étude de la sécrétion d'un enzyme en utilisant les concepts et les méthodes définies pour les ions inorganiques et les petites molécules organiques (acides aminés, sucres, etc.).

La muqueuse gastrique des Vertébrés, qui est le siège d'une activité sécrétrice élevée, et qu'on peut isoler facilement, a été utilisée pour cette étude.

Parmi les enzymes sécrétés par la muqueuse gastrique, on relève jusqu'à présent des pepsines (EC 3.4.4.1), des présures (EC 3.4.4.3), des lipases (EC 3.1.1.3) et des chitinases (chitin glycanohydrolases, EC 3.2.1.14). L'étude de ces trois premiers

enzymes présente cependant un certain nombre de difficultés. Le système des pepsines se compose d'enzymes dont les courbes d'activité en fonction du pH sont différentes les unes des autres: une variation dans la proportion relative de ces isozymes suffit à modifier l'activité protéolytique des solutions physiologiques à un pH donné et fausserait la mesure de la quantité apparente d'enzyme<sup>2,3</sup>. D'autre part, il n'est pas aisé de mesurer l'activité des pepsines, qu'on risque de confondre avec l'activité protéolytique de la présure ou des cathepsines intracellulaires.

La présure montre des variations considérables de sécrétion suivant l'âge des sujets et sa distribution zoologique est encore mal connue.

Les lipases sont sécrétées en quantité trop faible<sup>4</sup>. Par contre les chitinases semblent beaucoup plus propices à l'étude que nous nous proposons d'entreprendre.

En effet, on possède pour le dosage de ces enzymes, des méthodes très sensibles et rigoureusement spécifiques. Leur distribution zoologique est maintenant relativement bien connue<sup>5-8</sup>. De plus, les chitinases élaborées par une même muqueuse gastrique présentent un seul pH optimum<sup>8</sup>. Enfin, ces enzymes sont peu sensibles aux inhibiteurs classiques et ne sont pas synthétisés sous forme de zymogènes<sup>8</sup>.

Dans ce travail, nous montrons qu'il est possible de mettre en évidence *in vitro* une sécrétion de chitinase en utilisant les techniques mises au point pour étudier le mouvement des substances de poids moléculaire peu élevé à travers les membranes vivantes.

Au cours de nos recherches, il est apparu non seulement que la vitesse de sécrétion de la chitinase par la muqueuse gastrique isolée varie au cours du temps, mais aussi que cet enzyme, après sécrétion dans la solution physiologique, est soumis à un processus d'inactivation. C'est pourquoi, nous avons été amenés à analyser quantitativement ces phénomènes. Nous présentons donc également un traitement mathématique de la cinétique de la sécrétion de chitinase.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

##### *Isolement de la portion glandulaire de l'estomac*

Nous avons isolé par dissection la portion glandulaire de l'estomac de diverses espèces de Vertébrés, chez lesquelles une sécrétion gastrique de chitinase a été mise en évidence<sup>5,7</sup>: la truite (*Salmo irrideus* L.), l'anguille (*Anguilla vulgaris* CUV.), la grenouille (*Rana temporaria* L.), les tortues aquatiques (*Emys orbicularis* L. et *Clemmys leprosa* L.) et le lézard vert (*Lacerta viridis* LAUR.). La facilité avec laquelle on sépare l'épithélium glandulaire de l'estomac des couches musculaires sous-jacentes varie notablement d'une espèce à l'autre. Cette opération est relativement facile chez l'anguille, la grenouille, et les différents Reptiles que nous avons considérés. Nous avons vérifié sur coupes histologiques l'intégrité de l'épithélium digestif après dissection des couches musculaires.

La muqueuse gastrique est alors montée entre deux cadres de plexiglass dans un système de chambres analogue à celui utilisé pour étudier les potentiels bioélectriques de l'électroplaque isolée du Gymnote<sup>9,10</sup> et le transport actif d'acides aminés au niveau de l'épithélium intestinal isolé de la tortue grecque<sup>11</sup>. Les solutions en contact avec les deux faces de la muqueuse sont en relation avec des électrodes au calomel par l'intermédiaire de deux ponts d'Agar. Ces électrodes permettent de mesurer la différence de potentiel existant entre les deux solutions. Cette différence

de potentiel est enregistrée à l'aide d'un autre système de points d'Agar, pour la préparation et ainsi évalue-t-on l'efficacité d'une force électromotrice ext

##### *Solutions physiologiques utilisées*

Pour les Téléostéens et les Reptiles, la solution suivante: Pour 1 l de solution: 0.45 mmoles de CaCl<sub>2</sub>; 25 ml de tampon phosphate de SØRENSEN. Pour les Reptiles: Pour 1 l de solution: 113.5 mmol de tampon phosphate de

##### *Dosage des chitinases*

Le manque de chitobiasis dans les muqueuses gastriques isolées nous a conduits à utiliser la méthode de

A 1 ml de chitine native (*Chitinon*), on ajoute 1 ml de tampon phosphate de la solution de chitobiasis (pH 6.5) et la solution enzymatique étudiée.

On prélève 1 ml du milieu réactionnel. Après inactivation par chauffage à 100°C, l'acétylglucosamine du liquide est dosée par la méthode de *al.*<sup>12</sup>. Des témoins sans enzyme sont

Dans les conditions de dosage, la vitesse de libération par unité de temps correspond à l'activité chitinolytique des muqueuses. L'acétylglucosamine libérée par

#### RÉSULTATS

##### *Mise en évidence d'une sécrétion*

Les muqueuses gastriques isolées de diverses espèces de Vertébrés ont été étudiées par dissection, chez les espèces *Salmo irrideus* L., *Anguilla vulgaris* CUV., *Emys orbicularis* L., *Uromastix* a. Les résultats de la première série d'expériences sont présentés dans la figure 1. La muqueuse baignant la face externe de l'épithélium présente une activité chitinolytique et on observe une libération d'acétylglucosamine fraîche (Figs. 1-3).

Dans une seconde série d'expériences, la solution physiologique baignant la face interne de l'épithélium est soumise à cette prise d'essai par 1.5 ml de solution de chitobiasis.

Comme le montrent r

\* Les préparations commerciales de chitobiasis manifestent une activité élevée

icultés. Le système des pepsines fonction du pH sont différentes relative de ces isozymes suffit physiologiques à un pH donné et me<sup>2,3</sup>. D'autre part, il n'est pas de confondre avec l'activité cellulaires.

s de sécrétion suivant l'âge des nue.

ible<sup>4</sup>. Par contre les chitinases nous proposons d'entreprendre. mes, des méthodes très sensibles ologique est maintenant relative orées par une même muqueuse ces enzymes sont peu sensibles sous forme de zymogènes<sup>8</sup>.

de mettre en évidence *in vitro* s mises au point pour étudier le élevé à travers les membranes

seulement que la vitesse de sé- ée varie au cours du temps, mais n physiologique, est soumis à un té amenés à analyser quantitativement un traitement mathéma-

ndulaire de l'estomac de diverses gastrique de chitinase a été mise ille (*Anguilla vulgaris* CUV.), la tiques (*Emys orbicularis* L. et LAUR.). La facilité avec laquelle ouches musculaires sous-jacentes ation est relativement facile chez ne nous avons considérés. Nous e l'épithélium digestif après dis-

e deux cadres de plexiglass dans ur étudier les potentiels bioélec- e transport actif d'acides aminés rtue grecque<sup>11</sup>. Les solutions en n relation avec des électrodes au t. Ces électrodes permettent de e deux solutions. Cette différence

de potentiel est enregistrée à l'aide d'un pH mètre Radiometer du type 3 ou 4. Un autre système de points d'Agar permet de faire passer un courant électrique à travers la préparation et ainsi éventuellement d'abolir la différence de potentiel à l'aide d'une force électromotrice externe.

#### *Solutions physiologiques utilisées*

Pour les Téléostéens et les Amphibiens, la solution physiologique a la composition suivante: Pour 1 l de solution: 113.5 mmoles de NaCl; 1.9 mmoles de KCl; 0.45 mmoles de CaCl<sub>2</sub>; 25 ml de tampon phosphate 0.067 M (pH 7.8) préparé suivant SÖRENSEN. Pour les Reptiles, la solution physiologique a la composition suivante: Par l de solution: 113.5 mmoles de NaCl; 1.9 mmoles de KCl; 0.45 mmoles de CaCl<sub>2</sub>; 25 ml de tampon phosphate 0.067 M (pH 7).

#### *Dosage des chitinases*

Le manque de chitobiase (EC 3.2.1.29) dans les solutions physiologiques baignant les muqueuses gastriques isolées et leur activité chitinolytique peu élevée, nous ont conduits à utiliser la méthode suivante décrite par JEUNIAUX<sup>6-8</sup>.

A 1 ml de chitine native (4 mg/ml) préparée à partir de sépiens de *Sepia officinalis*, on ajoute 1 ml de tampon pH 5.0 (acide citrique 0.6 M-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2 M), 1 ml de la solution de chitobiase ( $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21) NBCo 0.25%)\* et 1 ml de la solution enzymatique étudiée.

On prélève 1 ml du milieu réactionnel après 0, 90 et 180 min d'incubation à 37°. Après inactivation par chauffage à 100° pendant 10 min et centrifugation, on dose l'acétylglucosamine du liquide surnageant par la méthode colorimétrique de REISSIG *et al.*<sup>12</sup>. Des témoins sans enzyme sont menés parallèlement à chaque test enzymatique.

Dans les conditions de nos expériences, la quantité d'acétylglucosamine libérée par unité de temps correspond pratiquement à la quantité de chitine hydrolysée; l'activité chitinolytique des solutions physiologiques est calculée et exprimée en  $\mu$ g d'acétylglucosamine libérée par h d'incubation par ml de solution.

#### RÉSULTATS

##### *Mise en évidence d'une sécrétion de chitinase in vitro*

Les muqueuses gastriques des animaux suivants, débarrassées de leurs couches musculaires par dissection, sont montées dans l'appareil décrit plus haut: *Salmo irrideus* L., *Anguilla vulgaris* CUV., *Rana temporaria* L., *Lacerta viridis* LAUR., *Emys orbicularis* L., *Uromastix acanthinurus* BELL et *Clemmys leprosa* L. Dans une première série d'expériences, on prélève d'heure en heure toute la solution physiologique baignant la face externe de la muqueuse gastrique en vue du dosage de son activité chitinolytique et on la remplace par un même volume de solution physiologique fraîche (Figs. 1-3).

Dans une seconde série d'expériences, on prélève d'heure en heure 1.5 ml de la solution physiologique baignant la face externe de la muqueuse et on remplace cette prise d'essai par 1.5 ml de solution physiologique fraîche (Fig. 4).

Comme le montrent nos résultats, la sécrétion *in vitro* en fonction du temps,

\* Les préparations commerciales de  $\beta$ -glucosidase de la Nutritional Biochemicals Corporation manifestent une activité élevée vis-à-vis du chitobiose, dimère de l'acétylglucosamine.

se présente généralement sous la forme d'une courbe hyperbolique, quelle que soit l'espèce animale considérée. La sécrétion au cours de la première heure est donc la plus considérable.

La différence de potentiel enregistrée entre les solutions baignant les deux faces de la muqueuse gastrique reste généralement constante pendant une période d'au moins 4 h, indiquant un état fonctionnel satisfaisant de la muqueuse. Cette différence de potentiel est généralement comprise entre 2 et 12 mV pour les Téléostéens et entre

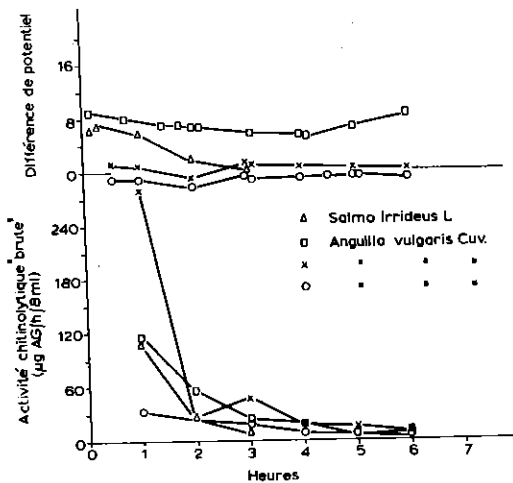


Fig. 1. Étude comparée de la sécrétion de chitinase par la muqueuse gastrique isolée de deux poissons Téléostéens. Graphique supérieur: différence de potentiel électrique (mV) en fonction du temps. Graphique inférieur: activité chitinolytique en fonction du temps. AG, acétylglucosamine.

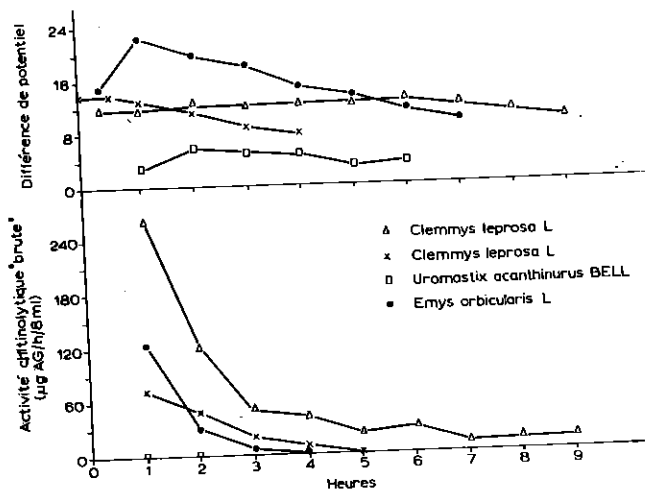


Fig. 2. Étude comparée de la sécrétion de chitinase par l'épithélium gastrique isolé chez quatre espèces de Reptiles. Graphique supérieur: différence de potentiel électrique (mV) en fonction du temps. Graphique inférieur: activité chitinolytique en fonction du temps. AG, acétylglucosamine.

*Biochim. Biophys. Acta*, 94 (1965) 153-164

4 et 40 mV pour les Amphibi négative par rapport à la face

La méthode employée n...  
sieurs heures une muqueuse g...  
dans un bon état métaboliqu...  
chitinase et d'en suivre l'évol...

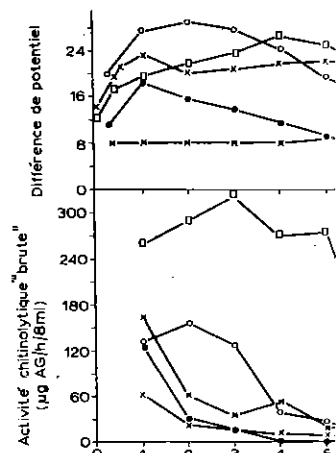


Fig. 3. Étude de la sécrétion de chitinase par la muqueuse gastrique isolée de *Anguilla vulgaris* L. Graphique supérieur: différence de potentiel électrique (mV) en fonction du temps. Graphique inférieur: activité chitinolytique brute en fonction du temps. AG, acétylglucosamine.

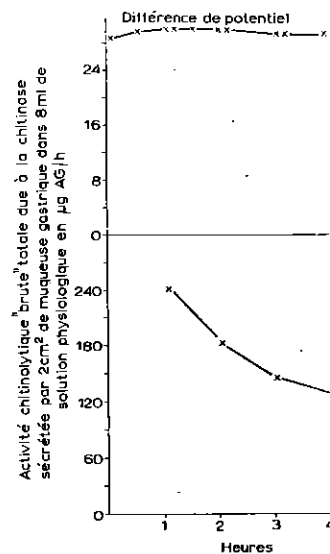


Fig. 4. Sécrétion de chitinase (courbe supérieure) en fonction du temps. Graphique inférieur: activité chitinolytique brute totale due à la chitinase sécrétée par 2cm<sup>2</sup> de muqueuse gastrique dans 8ml de solution physiologique en µg AG/h.

hyperbolique, quelle que soit la première heure est donc  
 uctions baignant les deux faces  
 te pendant une période d'au  
 la muqueuse. Cette différence  
 V pour les Téléostéens et entre

4 et 40 mV pour les Amphibiens et les Reptiles. La lumière de l'estomac est toujours négative par rapport à la face séreuse.  
 La méthode employée nous permet donc, d'une part, de conserver pendant plusieurs heures une muqueuse gastrique isolée et débarrassée de ses couches musculaires dans un bon état métabolique, d'autre part, de mettre en évidence une sécrétion de chitinase et d'en suivre l'évolution au cours du temps.

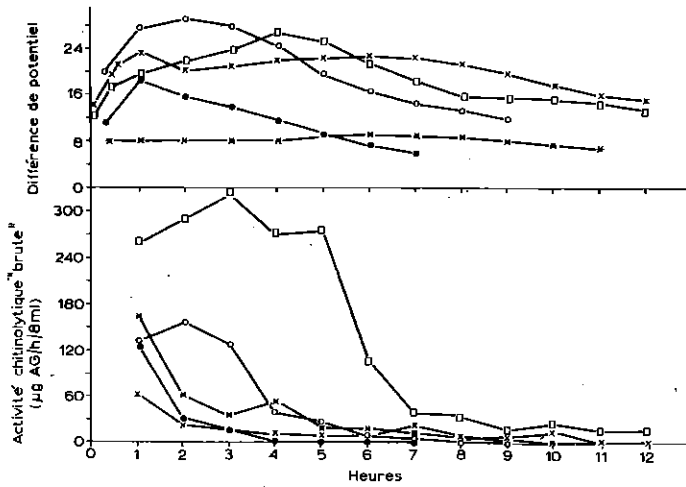


Fig. 3. Étude de la sécrétion de chitinase au niveau de la muqueuse gastrique isolée d'*Emys orbicularis* L. Graphique supérieur: différence de potentiel électrique (mV) en fonction du temps. Graphique inférieur: activité chitolytique en fonction du temps. AG, acétylglucosamine.

muqueuse gastrique isolée de deux  
 potentiel électrique (mV) en fonction  
 du temps. AG, acétylglucos-

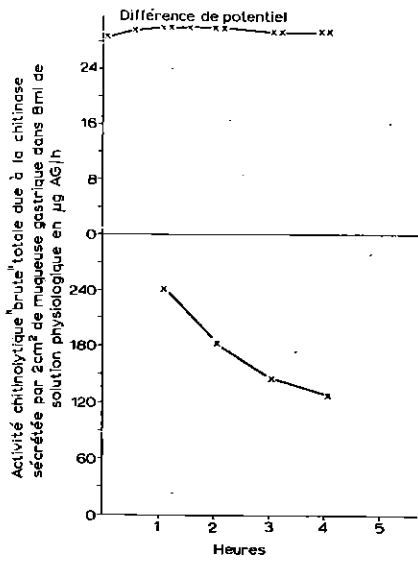


Fig. 4. Sécrétion de chitinase (courbe inférieure) et différence de potentiel électrique (en mV; courbe supérieure) en fonction du temps de l'épithélium gastrique isolé d'*Emys orbicularis* L. AG, acétylglucosamine.

épithélium gastrique isolé chez quatre  
 potentiel électrique (mV) en fonction du  
 on du temps. AG, acétylglucosamine.



lytique des solutions physiologiques isolés correspond à la chitine. En d'autres termes, la muqueuse gastrique externe soumise?

un certain volume de solution de conditions analogues à celles mesuré l'activité enzymatique que l'activité décroît avec le temps. La discussion détaillée des résultats est dans une autre publication<sup>19</sup>. Il nous est en coordonnées semilogarithmiques, on obtient une droite ce qui correspond à une fonction exponentielle simple

(1)

activité enzymatique au temps zéro,

déterminée expérimentalement est

muqueuses et isolées sécrètent *in vitro* pendant la première heure d'incubation une activité prolongée. Cette expérience, admise précédemment par l'origine microbienne des chitinasés

la sécrétion de chitinase, elles appartiennent généralement hyperboliques, l'absence de l'inactivation de l'enzyme ne peut expliquer l'existence d'une sécrétion prolongée: (a) On peut penser que la mort des cellules. Cette expérience peut montrer que la différence de conditions physiologiques baignant les muqueuses isolées reste pratiquement stable pendant une différence de potentiel stable électrique général normal des cellules. Les coupes en coupes histologiques au microscope nous avons pu constater aucune altération pendant une consommation continue

et régulière de O<sub>2</sub> par la muqueuse isolée et débarrassée de ses couches musculaires. La diminution de sécrétion constatée ne résulte donc pas d'une altération du métabolisme général de la cellule. (b) On sait que les processus opératoires peuvent induire une hypersécrétion. Ces effets sont cependant moins marqués dans le cas de dénervation complète de l'estomac, ce qui est évidemment notre cas. Cette hypersécrétion diminue normalement au bout de quelques heures<sup>14,15</sup>. Ce phénomène pourrait être dû à la libération de substances déclenchant la sécrétion ou encore au traumatisme du système parasympathique. (c) On pourrait également penser que la diminution d'activité sécrétrice correspond à une diminution lente de l'activité fonctionnelle des cellules épithéliales qui se manifesterait en tout premier lieu sur le mécanisme impliqué dans le transfert de l'enzyme.

(3) Nous pouvons représenter par  $J$  la quantité de chitinase sécrétée par unité de surface gastrique et par unité de temps et écrire que:

$$J = K_1 C_1 \quad (2)$$

où  $K_1$  est le coefficient de perméabilité ( $L^2 T^{-1}$ ) de la membrane cellulaire et  $C_1$  la concentration intracellulaire en enzyme ( $ML^{-3}$ ). La variation négative de  $J$  au cours du temps peut être interprétée comme étant le résultat d'une variation de  $C_1$ , de  $K_1$  ou encore de ces deux facteurs simultanément. Dans le premier cas, on peut imaginer que l'isolement de la muqueuse empêche cette dernière de continuer la synthèse de l'enzyme considéré. Les cellules disposeraient donc au début de l'expérience d'une réserve limitée de molécules d'enzyme; la sécrétion de chitinase au cours des premières heures d'incubation épuiserait cette réserve intracellulaire  $C_1$ . Dans le second cas, la perméabilité de la membrane cellulaire  $K_1$  vis-à-vis de la chitinase diminuerait au cours du temps, tandis que la concentration en chitinase intracellulaire resterait constante. La première des deux hypothèses peut être abandonnée. En effet, nous avons recherché dans quelle mesure la sécrétion de chitinase par la muqueuse gastrique isolée entraîne une déplétion de la réserve intracellulaire en enzyme. Dans ce but, nous avons délimité une portion de muqueuse gastrique de porc (*Sus domesticus* L.) dont les deux moitiés sont homogènes en ce qui concerne la distribution de la chitinase intracellulaire. Les deux moitiés de territoires ont été isolées et préparées de la même façon. L'une a été homogénéisée et on a déterminé l'activité chitinolytique de l'extrait aqueux. L'autre a été montée entre chambres pendant une période de plusieurs heures. Au terme de cette expérience, la muqueuse a été homogénéisée de la même façon que la portion témoin, et on a mesuré l'activité chitinolytique. Dans tous les cas où cette expérience a été réalisée, les résultats ont montré que l'activité chitinolytique des extraits aqueux de muqueuse gastrique n'est pas moins élevée après une période de sécrétion *in vitro*. La concentration intracellulaire en chitinase n'a donc pas diminué au cours de l'expérience. Il est donc raisonnable de postuler que la variation de la sécrétion de chitinase ( $J$ ) au cours du temps est le résultat d'une variation de la perméabilité de la membrane cellulaire. Nous n'étudierons donc que ce dernier cas.

(4) Pour analyser de façon générale le mécanisme de transfert de l'enzyme à travers la membrane cellulaire, nous envisageons ici un type de modèle basé sur le couplage de deux mécanismes physicochimiques classiques: la diffusion et la cinétique (modèles dits de diffusion-cinétique). Macroscopiquement, les lois de la diffusion et de la cinétique font appel à la concentration des espèces en présence. Nous supposons aussi que les volumes ne changent pas durant les expériences. Nous admettons dans

tous les cas un modèle mécanique simplifié (Fig. 5) travaillant à température constante: une cellule (compartiment 1) sécrète au travers d'une membrane dans le milieu extérieur (compartiment 2). Comme le montrent les résultats expérimentaux, il n'y a pas de sécrétion d'enzyme de la cellule (compartiment 1) vers la solution en contact avec la face séreuse (compartiment 4)<sup>16</sup>. Par suite de la dénaturation de l'enzyme dans le compartiment 2, nous supposons l'existence d'une fuite virtuelle d'enzyme vers le compartiment 3. Nous supposons aussi que le passage au travers de la

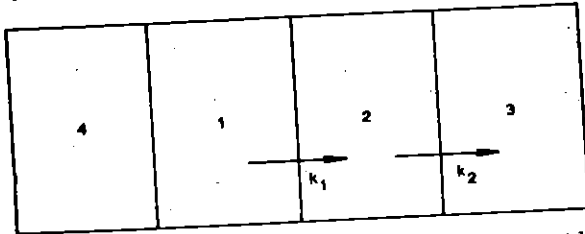


Fig. 5. Système de 4 compartiments en série schématisant le dispositif expérimental utilisé. Explications dans le texte.

membrane s'effectue suivant la première loi de diffusion de Fick. D'autre part, dans le compartiment 2, la dénaturation de l'enzyme s'effectue suivant un processus d'ordre 1 par rapport au temps comme le montrent nos résultats expérimentaux<sup>13</sup>. A priori, nous pouvons écrire que la variation de concentration en chitinase dans le compartiment 2 au cours du temps est donnée par une relation du type:

$$\frac{dC_2(t)}{dt} = K_1(t)C_1 - k_2C_2(t) \quad (3)$$

où  $C_2(t)$  est la concentration en chitinase du compartiment 2 au temps  $t$ ; où  $dC_2(t)/dt$  est la variation de concentration en chitinase du compartiment 2 pendant le temps  $dt$ ; où  $K_1(t)$  est le coefficient de perméabilité de la membrane séparant le compartiment 1 du compartiment 2 au temps  $t$ ; où  $k_2$  est la constante d'inactivation des chitinasés<sup>13</sup>; où  $C_1$  est la concentration intracellulaire en chitinase. De cette équation, on peut isoler  $K_1(t)$ :

$$K_1(t) = \frac{1}{C_1} \left[ \frac{dC_2(t)}{dt} + k_2C_2(t) \right] \quad (4)$$

Il est dès lors facile pour une expérience donnée de rechercher l'équation de la fonction  $K_1(t)$ . En effet, nous connaissons  $k_2$  et nous pouvons rechercher expérimentalement les valeurs de  $C_1$  et de  $C_2(t)$ . On peut calculer  $dC_2(t)/dt$  à partir de  $C_2(t)$ .

#### Exemples:

(1) Prenons le cas d'une expérience au cours de laquelle toute la solution physiologique (8 ml) est retirée après 1 h d'incubation et remplacée par une solution fraîche. L'activité chitinolytique totale des 8 ml de cette solution, mesurée en  $\mu\text{g}$  d'acétylglucosamine libérée par h, est reportée dans la deuxième colonne du Tableau I. On mesure ensuite l'activité chitinolytique de la solution physiologique qui a été en contact avec la muqueuse gastrique entre la première et la seconde heure d'incubation (Tableau I, 2 h), et ainsi de suite (valeurs en caractères gras). Pour obtenir la courbe cumulative de la sécrétion de chitinase dans nos conditions expérimentales, nous devons tenir compte du fait que si l'enzyme sécrété au cours de la première heure

TABLEAU I

*Lacerta viridis* LAUR.—SÉCRÉTION DE  
Explications dans le texte.

Durée d'incubation (h)	C	b
1		
2		
3		
4		
5		

Concentration totale en chitinase du compartiment 2

Concentration en chitinase par ml de solution physiologique ( $C_2(t)$ )

d'incubation n'avait pas été prélevée, la perte d'activité peut être calculée. Par exemple, après 1 h d'incubation, le compartiment 2 correspond à 251. L'enzyme était resté dans notre dispositif expérimental. En effectuant le même raisonnement pour 3 et 4 h, etc. il est ainsi possible d'

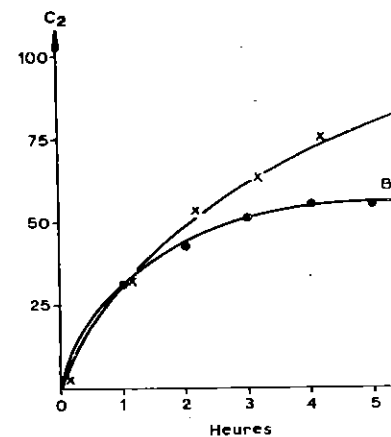


Fig. 6. Variation de la concentration  $C_2$  en fonction du temps (voir explications dans le texte).

Fig. 7. Variations du coefficient de perméabilité  $K_1(t)$  en fonction du temps (voir explications dans le texte).



travaillant à température con-  
vers d'une membrane dans le  
nt les résultats expérimentaux,  
partiment 1) vers la solution en  
suite de la dénaturation de l'en-  
tence d'une fuite virtuelle d'en-  
que le passage au travers de la

dispositif expérimental utilisé. Expli-

sion de Fick. D'autre part, dans  
s'effectue suivant un processus  
nos résultats expérimentaux<sup>12</sup>.  
concentration en chitinase dans le  
une relation du type:

(3)

partiment 2 au temps  $t$ ; où  $dC_2(t)/dt$   
partiment 2 pendant le temps  $dt$ ;  
brane séparant le compartiment  
te d'inactivation des chitinases<sup>13</sup>;  
ase. De cette équation, on peut

(4)

chercher l'équation de la fonction  
ns rechercher expérimentalement  
 $dC_2(t)/dt$  à partir de  $C_2(t)$ .

laquelle toute la solution physio-  
emplacée par une solution fraîche.  
solution, mesurée en  $\mu\text{g}$  d'acétyl-  
xième colonne du Tableau I. On  
tion physiologique qui a été en  
re et la seconde heure d'incubation  
ères gras). Pour obtenir la courbe  
conditions expérimentales, nous  
té au cours de la première heure

TABLEAU I

*Lacerta viridis* LAUR.—SÉCRÉTION DE CHITINASE PAR LA MUQUEUSE GASTRIQUE ISOLÉE  
Explications dans le texte.

Durée d'incubation (h)	Concentration en chitinase (8 ml de solution physiologique baignant la face muqueuse)				
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
1	251.2	(220)	(190)	(163)	(140)
2	—	120	(105)	(90)	(78)
3	—	—	113.6	(98)	(84)
4	—	—	—	90.4	(78)
5	—	—	—	—	59.2
Concentration totale en chitinase du compartiment 2					
	251.2	340	408.6	441.4	439.2
Concentration en chitinase par ml de solution physiologique ( $\bar{C}_2(t)$ )					
	31.4	42.5	51.1	55.2	54.9

d'incubation n'avait pas été prélevé, il aurait subi une inactivation partielle. Cette perte d'activité peut être calculée à l'aide de la constante d'inactivation  $k_2$  (réf. 13). Par exemple, après 1 h d'incubation, l'activité enzymatique totale trouvée dans le compartiment 2 correspond à 251.2  $\mu\text{g}$  d'acétylglucosamine libérée par h. Si l'enzyme était resté dans notre dispositif expérimental, son activité après 2 h aurait été, selon l'Eqn. 1, de 220  $\mu\text{g}$  d'acétylglucosamine, de 190  $\mu\text{g}$  d'acétylglucosamine après 3 h, etc. En effectuant le même raisonnement pour les quantités d'enzyme sécrété entre 2 et 3 h, 3 et 4 h, etc. il est ainsi possible d'obtenir la courbe cumulative de sécrétion au cours

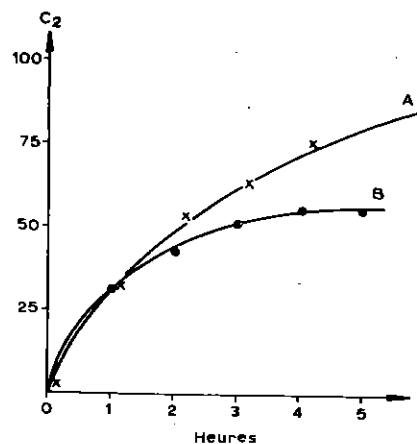


Fig. 6. Variation de la concentration en chitinase du compartiment 2 ( $C_2$ ) en fonction du temps (voir explications dans le texte).

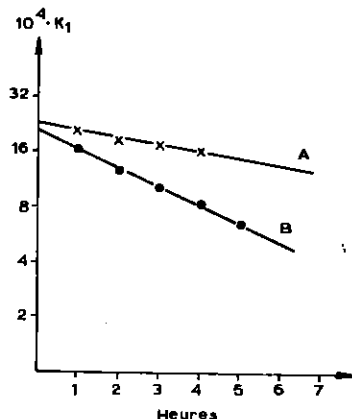


Fig. 7. Variations du coefficient de perméabilité  $K_1$  de la membrane sécrétrice de chitinase en fonction du temps (voir explications dans le texte).

du temps. Les valeurs obtenues sont données dans les deux dernières rangées horizontales du Tableau I. Les valeurs de  $C_2(t)$  (dernière rangée Tableau I) sont reportées dans la Fig. 6, courbe B.

Dans le Tableau II, nous donnons la valeur de  $C_1$  ( $ML^{-3}$ ) ou concentration en chitinase du compartiment 1 (colonne A), les valeurs de  $dC_2(t)/dt$  calculées graphiquement pour les temps indiqués (colonne B) et les valeurs de  $K_1(t)$  (colonne C) pour ces mêmes temps, calculées à partir de l'Eqn. 4. Celles-ci sont reportées dans un graphique en coordonnées semilogarithmiques (Fig. 7, courbe A).

TABLEAU II

*Lacerta viridis* LAUR.—SÉCRÉTION DE CHITINASE PAR LA MUQUEUSE GASTRIQUE ISOLÉE

Explications dans le texte.

Temps (h)	$C_1$ (A)	$dC_2(t)/dt$ (B)	$K_1(t)$ (C)
1	12 500	16.4	0.001 68
2	12 500	9.6	0.001 29
3	12 500	5.3	0.001 02
4	12 500	2.6	0.000 85
5	12 500	0.1	0.000 65

(2) Dans une seconde série d'expériences, nous avons mesuré l'activité chitino-lytique du compartiment 2 au cours du temps, en ne prélevant qu'une partie aliquote de la solution physiologique (1.5 ml), au lieu de toute la solution comme dans le cas précédent. Les 1.5 ml de solution sont remplacés par 1.5 ml de solution fraîche et on tient compte pour le calcul des concentrations totales après différents laps de temps, non seulement du degré d'inactivation qu'aurait subi l'enzyme dans le prélèvement de 1.5 ml, mais aussi de la dilution apportée par l'introduction de 1.5 ml de solution physiologique fraîche. Les valeurs de  $C_2(t)$  calculées de cette façon sont reportées dans le Tableau III, colonne B et dans la Fig. 6, courbe A. Les autres valeurs indiquées dans ce tableau sont calculées de la même façon que pour le premier exemple. Les valeurs de  $K_1(t)$  sont alors reportées dans un graphique en coordonnées semilogarithmiques (Fig. 7, courbe A).

TABLEAU III

*Lacerta viridis* LAUR.—SÉCRÉTION DE CHITINASE PAR LA MUQUEUSE GASTRIQUE ISOLÉE

Explications dans le texte.

Temps (h)	$C_1$ (A)	$C_2(t)$ (B)	$dC_2(t)/dt$ (C)	$K_1(t)$ (D)
1	12 500	31.4	22.5	0.002 15
2	12 500	49.3	16.5	0.001 89
3	12 500	62	13.1	0.001 77
4	12 500	72.5	10.1	0.001 65

#### Analyse des résultats:

La Fig. 7 montre que dans le cas du premier exemple (courbe B), comme dans le cas du second exemple (courbe A); la fonction  $K_1(t)$  est une fonction exponentielle

du temps, puisque ses valeurs coordonnées semilogarithmiques de  $J$ , c'est-à-dire la variation et par unité de temps, dépendent de la perméabilité de la membrane se représenter mathématiquement du temps.

#### Différence de potentiel gastrique

En ce qui concerne la différence de potentiel et des Amphibiens, elle est de l'ordre de 12 mV. Cette différence de potentiel est due à la différence de potentiel entre les auteurs pour les Amphibiens.

Généralement cette différence de potentiel est de l'ordre de quelques heures, ce qui indique que le métabolisme normal. La différence de potentiel des Téléostéens d'eau douce est de l'ordre de 10 mV. Les Téléostéens marins qu'il a été étudié ont une différence de potentiel gastrique plus élevée (15 mV) qui peut-être en relation avec l'osmolarité.

#### Corrélation entre sécrétion et différence de potentiel

Si l'on examine les courbes de la différence de potentiel (Fig. 7) on voit que la différence de potentiel diminue avant que la différence de potentiel que la différence de potentiel diminue. La signification de ce paramètre est tout comme la sécrétion de chitinase. Dès que l'intégrité métabolique est compromise, les différences de potentiel sont d'autres sont d'autres. La différence de potentiel diminue.

#### CONCLUSION ET RÉSUMÉ

Une nouvelle méthode est proposée dans le but de mesurer l'activité chitino-lytique des membranes cellulaires. Cette méthode est basée sur des solutions physiologiques et une solution baignant la face externe de la membrane. Il a été possible de mettre en évidence une différence de potentiel de 12 mV dans de bonnes conditions. Nous avons montré l'évidence d'une inactivation de l'enzyme. Nous avons montré l'existence d'une différence de potentiel (15 mV) chez *Anguilla vulgaris* CUV. et *Emys orbicularis* L., qui est en relation avec l'osmolarité.

deux dernières rangées horizontales (Tableau I) sont reportées

$C_1$  ( $ML^{-3}$ ) ou concentration en ions de  $dC_2(t)/dt$  calculées graphiquement à partir des valeurs de  $K_1(t)$  (colonne C) pour lesquelles-ci sont reportées dans un graphique (courbe A).

#### MUQUEUSE GASTRIQUE ISOLÉE

Nous avons mesuré l'activité chitino-lytique en prélevant qu'une partie aliquote de toute la solution comme dans les expériences précédentes par 1.5 ml de solution fraîche. Les quantités totales après différents laps de temps n'ont pas subi l'enzyme dans le prélèvement. Les valeurs de  $dC_2(t)/dt$  calculées de cette façon sont reportées dans le Fig. 6, courbe A. Les autres valeurs de  $K_1(t)$  calculées de cette façon sont reportées dans le graphique en coordonnées semilogarithmiques.

#### MUQUEUSE GASTRIQUE ISOLÉE

15  
89  
77  
65

par exemple (courbe B), comme dans le Fig. 6, courbe B.  $K_1(t)$  est une fonction exponentielle

du temps, puisque ses valeurs, en fonction du temps, se placent sur une droite en coordonnées semilogarithmiques. Par conséquent, dans l'Eqn. 2 ci-dessus, la variation de  $J$ , c'est-à-dire la variation de la quantité de chitinase sécrétée par unité de surface et par unité de temps, dépend essentiellement des variations de  $K_1$ , le coefficient de perméabilité de la membrane cellulaire vis-à-vis de la chitinase. Cette variation peut se représenter mathématiquement par l'équation d'une fonction exponentielle simple du temps.

#### Différence de potentiel gastrique

En ce qui concerne la différence de potentiel au niveau de l'estomac des Reptiles et des Amphibiens, elle est généralement au début de l'expérience égale ou supérieure à 12 mV. Cette différence de potentiel est semblable à celle observée par d'autres auteurs pour les Amphibiens et les Mammifères<sup>17-19</sup>.

Généralement cette différence de potentiel se maintient pendant plusieurs heures, ce qui indique que, pendant ce temps, l'épithélium gastrique entretient un métabolisme normal. La différence de potentiel présentée par la muqueuse gastrique des Téléostéens d'eau douce étudiés est assez faible. HOGBEN<sup>20</sup>, signale que les Téléostéens marins qu'il a étudiés montrent habituellement une différence de potentiel gastrique plus élevée (15 mV). Il est donc intéressant de noter cette différence qui est peut-être en relation avec l'habitat des espèces étudiées.

#### Corrélation entre sécrétion de chitinase et différence de potentiel

Si l'on examine les différentes courbes de sécrétion de chitinase et celles de la différence de potentiel (Figs. 1-4), on constate qu'en général, la sécrétion de chitinase diminue avant que la différence de potentiel ne soit affectée. D'autre part, chaque fois que la différence de potentiel diminue, il y a diminution de la sécrétion de chitinase. La signification de ce parallélisme pourrait être la suivante. La différence de potentiel tout comme la sécrétion de chitinase est le reflet de l'état fonctionnel de la cellule. Dès que l'intégrité métabolique de celle-ci est affectée, certaines fonctions plus sensibles que d'autres sont d'abord atteintes: ce serait le cas de la sécrétion de chitinase. La différence de potentiel ne serait atteinte que plus tard.

#### CONCLUSION ET RÉSUMÉ

Une nouvelle méthode d'étude des sécrétions d'enzymes chitinolytiques *in vitro* est proposée dans le but d'aborder l'étude du passage des enzymes à travers les membranes cellulaires. Cette méthode consiste à placer une muqueuse gastrique entre deux solutions physiologiques et à mesurer l'activité enzymatique apparaissant dans la solution baignant la face externe de la muqueuse. Au moyen de cette technique, il a été possible de mettre en évidence une sécrétion de chitinase pendant plusieurs heures dans de bonnes conditions de survie de l'épithélium, ainsi que l'indique une différence de potentiel pratiquement stable. Nous avons pu également mettre en évidence une inactivation partielle de l'enzyme dans nos conditions expérimentales. Nous avons montré l'origine glandulaire de cet enzyme chez quelques Vertébrés (*Anguilla vulgaris* CUV., *Salmo irrideus* L., *Lacerta viridis* LAUR., *Clemmys leprosa* L., *Emys orbicularis* L., *Rana temporaria* L.). Les courbes de sécrétion de chitinase en fonction du temps présentent dans la plupart des cas une forme hyperbolique, la

sécrétion de la première heure étant la plus importante. Cette variation de sécrétion ne résulte pas d'une déplétion de la concentration intracellulaire en enzyme mais d'une variation du coefficient de perméabilité de la membrane vis-à-vis de la chitinase. Nous avons analysé mathématiquement ce phénomène et nous avons montré que la variation de ce coefficient pouvait se représenter par une fonction exponentielle simple du temps.

#### REMERCIEMENTS

E. S. et Ch. J. sont Bénéficiaires d'un "crédit aux chercheurs" du Fonds National de la Recherche Scientifique.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 H. H. USSING ET K. ZERAHN, *Acta Physiol. Scand.*, 23 (1951) 110.
- 2 W. H. TAYLOR, *Biochem. J.*, 71 (1959) 384.
- 3 A. P. RYLE ET R. R. PORTER, *Biochem. J.*, 73 (1959) 75.
- 4 R. WILLSTÄTTER ET F. MEMMEN, *Z. Physiol. Chem.*, 129 (1923) 1.
- 5 CH. JEUNIAUX, *Proc. 5th, Intern. Congr. Biochem., Moscow, 1961*, Academic Press, New York, Section 6; 6.16.1526, p. 143.
- 6 CH. JEUNIAUX, *Nature*, 192 (1961) 135.
- 7 CH. JEUNIAUX, *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.*, 92 (1962) 27.
- 8 CH. JEUNIAUX, *Chitine et Chitinolyse, un Chapitre de la Biologie Moléculaire*, Masson, Paris, 1963, p. 30-32.
- 9 E. SCHOFFENIELS ET D. NACHMANSOHN, *Biochim. Biophys. Acta*, 26 (1957) 1.
- 10 E. SCHOFFENIELS, *Arch. Intern. Physiol. Biochem.*, 68 (1960) 1.
- 11 M. BAILLIEN ET E. SCHOFFENIELS, *Biochim. Biophys. Acta*, 53 (1961) 537.
- 12 J. L. REISSIG, J. L. STROMIGER ET L. F. LELOIR, *J. Biol. Chem.*, 217 (1955) 959.
- 13 G. DANDRIFOSSE ET E. SCHOFFENIELS, *Arch. Intern. Physiol. Biochem.*, 71 (1963) 788.
- 14 B. P. BABKIN, *Handb. Norm. Path. Physiol. Berlin*, 3 (1927) 689.
- 15 B. P. BABKIN, *Secretory Mechanism of the Digestive Glands*, Hoeber, New York, 1950, p. 188.
- 16 G. DANDRIFOSSE, *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.*, 92 (1962) 199.
- 17 C. A. M. HOGGEN, *Am. J. Physiol.*, 180 (1955) 641.
- 18 E. E. CRANE, R. E. DAVIES ET N. M. LONGMUIR, *Biochem. J.*, 43 (1948) 321.
- 19 N. C. HIGHTOWER, *Federation Proc.*, 16 (1957) 58.
- 20 C. A. M. HOGGEN, *Science*, 129 (1959) 1224.

*Biochim. Biophys. Acta*, 94 (1965) 153-164