

Reçu le 2 mars 1955.

**PROPRIÉTÉS CHITINOLYTIQUES
DES EXTRAITS AQUEUX D'EXUVIES LARVAIRES,
PRENYMPHALES ET NYMPHALES
DE « TENEBRIO MOLITOR L. »**

PAR

Ch. JEUNIAUX ⁽¹⁾

(Université de Liège, Institut Léon Fredericq, Chimie Physiologique)

(2 figures)

HAMAMURA et KANEHARA (1940, 1954) ont signalé la présence d'une chitinase dans un extrait aqueux d'exuvies larvaires de *Bombyx mori* L. Ces auteurs ont admis que cet enzyme provient du liquide exuvial, adhérant à l'exuvie après la mue. Cette hypothèse a été confirmée par JEUNIAUX et AMANIEU (1955) qui ont étudié les propriétés chitinolytiques du liquide exuvial accumulé entre la cuticule larvaire et la cuticule nymphale, après ligaturage de la larve.

Outre le Ver-à-soie, les chenilles de *Platysamia cecropia* L. sécrètent également, au moment de la mue, un liquide exuvial doué de propriétés chitinolytiques (PASSONNEAU et WILLIAMS, 1953). L'intervention d'une chitinase au cours du phénomène de la mue peut vraisemblablement être généralisée à tous les Lépidoptères. Nous nous proposons d'en démontrer l'existence chez un Insecte Coléoptère : *Tenebrio molitor* L. et de préciser quelques aspects de la cinétique de cette chitinase.

Techniques

Un ligaturage des larves ou des prénymphe de *Tenebrio molitor* ne permet pas l'accumulation de liquide exuvial, contrairement à ce que nous avons obtenu avec *Bombyx mori*. Quels que soient le moment et l'endroit choisis pour ligaturer les larves, la cuticule larvaire finit par se déchirer dorsalement ; elle adhère seulement à l'endroit même de la ligature. D'autre part, le liquide exuvial n'est

⁽¹⁾ Aspirant du Fonds National de la Recherche Scientifique.

pas dégluti, comme chez la larve, et adhère à la peau, comme chez la nymphale.

Nous avons pris, en présence de l'enzyme, du liquide exuvial, u... *Tenebrio molitor* d'âge... et leurs exuvies transp... recueilli et conservé s... phales. Ces exuvies, 15 jours, sont broyées ; lavé. Après addition à grande vitesse en c... 20 minutes. Le liqui... incolore, dans le cas... broyat d'exuvies ny... liquide brun clair et l... néphélométrique (JEU...

Ré

1. — MISE EN

L'activité chitinoly... fraîches (26 exuvies, p... est aisément mise en e... et à pH 6, le trouble c... Un extrait aqueux de... ne provoque aucune... provient donc bien de... farine pouvant adhér...

2. — PR

A TOUS
ET

Les exuvies rejetées... et les nymphes sont... en lots de poids frais... 10 ml. d'eau. Après c...

⁽¹⁾ La nymphose eut...

⁽²⁾ Préparation de la s... de la chitinase : voir J...

Reçu le 2 mars 1955.

**CHITINOLYTIQUES
EXUVIES LARVAIRES,
NYMPHALES
DE *TENEBRIO MOLIATOR* L.»**

(¹)
Chimie Physiologique)

54) ont signalé la présence
de liquides d'exuvies larvaires de
Tenebrio molitor, mais ils ont
pensé que cet enzyme provient
de la mue. Cette
question a été étudiée par
JEUNIAUX et AMANIEU (1955) qui
ont montré que le liquide exuvial accumulé
par les nymphes, après ligaturage

de *Platysamia cecropia* L.
après la mue, un liquide exuvial
est obtenu (JEUNIAUX et WILLIAMS, 1953).
L'existence de ce phénomène de la mue
est connue à tous les Lépidoptères.
L'existence chez un Insecte
permet de préciser quelques aspects de

nymphe de *Tenebrio molitor*
après la mue exuviale, contrairement à
Bombyx mori. Quels que soient
les traitements des larves, la cuticule
ne se détache pas ; elle adhère seulement à
partir, le liquide exuvial n'est

Recherche Scientifique.

pas dégluti, comme chez *Bombyx mori*, mais résorbé directement par
la peau, comme chez la plupart des Insectes (WIGGLESWORTH, 1948).

Nous avons pris, en guise de témoin des propriétés enzymatiques
du liquide exuvial, un extrait aqueux d'exuvies. 700 larves de
Tenebrio molitor d'âge avancé (¹) ont été surveillées quotidiennement,
et leurs exuvies transportées aussitôt en glacière. Nous avons ensuite
recueilli et conservé séparément les exuvies prénympales et nym-
phales. Ces exuvies, dont le séjour en glacière n'a pas excédé
15 jours, sont broyées au pilon dans un mortier en présence de sable
lavé. Après addition d'un volume d'eau déterminé, on centrifuge
à grande vitesse en chambre froide (13.000 tours/minute) pendant
20 minutes. Le liquide surnageant est parfaitement limpide et
incolore, dans le cas des exuvies larvaires et prénympales. Le
broyat d'exuvies nymphales fournit, après centrifugation, un
liquide brun clair et limpide. On dose la chitinase par la méthode
néphélométrique (JEUNIAUX, 1951) (²).

Résultats expérimentaux

1. — MISE EN ÉVIDENCE D'UNE CHITINASE EXUVIALE

L'activité chitinolytique d'un extrait aqueux d'exuvies larvaires
fraîches (26 exuvies, poids frais 71 mg., dans 5 ml. d'eau bidistillée)
est aisément mise en évidence. Après 17 heures d'incubation à 36° C
et à pH 6, le trouble dû à la chitine en suspension diminue de 20 %.
Un extrait aqueux de farine de froment (200 mg. dans 15 ml. d'eau)
ne provoque aucune variation de trouble. L'activité chitinolytique
provient donc bien des exuvies, et non des particules de son ou de
farine pouvant adhérer aux exuvies.

2. — PRÉSENCE DE CHITINASE EXUVIALE A TOUTES LES STADES DU DÉVELOPPEMENT ET COMPARAISON QUANTITATIVE

Les exuvies rejetées respectivement par les larves, les prénympes
et les nymphes sont conservées séparément en glacière. Réparties
en lots de poids frais identiques (300 mg.), elles sont broyées dans
10 ml. d'eau. Après centrifugation, on teste l'activité chitinolytique

(¹) La nymphose eut lieu 1 mois plus tard.

(²) Préparation de la suspension de chitine pulvérisée utilisée pour le dosage
de la chitinase : voir JEUNIAUX et AMANIEU, 1955.

des liquides surnageants, dans les mêmes conditions de pH et de température (Tableau 1).

TABLEAU I
Activité chitinolytique d'extraits aqueux d'exuvies larvaires, prénympheales et nympheales

Extrait d'exuvies	Nombre d'exuvies	Poids frais	Poids sec correspondant	Variation du trouble de chitine en suspension (en % du trouble initial). Durée d'incubation :		
				2 h.	3 h.	7 h.
Larvaires.....	120	300 mg.	277.3 mg.	14.5 %	18 %	35 %
Prénympheales.	115	300 mg.	271.3 mg.	15 %	21 %	37.5 %
Nympheales .	235	300 mg.	258.8 mg.	77 %	90 %	solubilisation complète
Témoin (eau) .	—	—	—	0 %	1.2%	0 %

Conditions expérimentales :

4 ml. d'extrait aqueux d'exuvies (300 mg. dans 10 ml. d'eau).

1 ml. de suspension de chitine pulvérisée (soit 2 mg. de chitine).

1 ml. de Tampon Citrate-NaOH 0.6 M, pH 5.2 (pH final des solutions : 5.45).

1 grain de thymol.

En tubes scellés et couchés, à 37° C.

Les différents extraits aqueux d'exuvies sont doués de propriétés chitinolytiques manifestes. Les activités chitinolytiques des exuvies larvaires et prénympheales sont quantitativement identiques, par rapport au poids ou au nombre d'exuvies. Celle des exuvies nympheales est, par contre, beaucoup plus intense (77 % de variation de trouble en 2 heures, au lieu de 14.5 et 15 %, soit une activité au moins 5 fois plus grande que celle des deux autres extraits).

3. — EFFET DU PH SUR L'ACTIVITÉ CHITINOLYTIQUE DES EXTRAITS D'EXUVIES LARVAIRES ET NYMPHEALES

a) *Chitinase exuviale des larves.* — Pour que la durée de conservation des exuvies larvaires en glacière n'excède pas 15 jours, deux lots différents d'exuvies ont été utilisés pour cette expérience, à 15 jours d'intervalle.

Lot n° 1 : 187 exuvies (soit poids sec 386 mg.), 4 ml. d'extrait centrifugé (2 mg./ml.), 1 grain de thymol, 1 ml. de tampon Citrate-NaOH 0.6 M, de pH 4.85 et 5.45. Les pH des solutions après équilibration, 4.55 et 4.95.

Lot n° 2 : 236 exuvies (soit poids sec 552 mg.), 4 ml. d'extrait centrifugé, 1 grain de thymol et 1 ml. de tampon Citrate-NaOH 0.6 M, de pH 4.85 et 4.95. Les pH des solutions après équilibration, 4.55, 4.95 et 5.45.

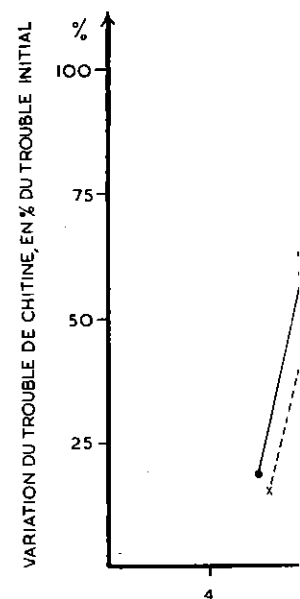


Fig. 1 : Influence de l'activité chitinolytique des extraits d'exuvies

○ — lot n° 1
● — lot n° 2
x — extrait d'exuvies

FIG. 1. — Conditions expérimentales

nes conditions de pH et de

eux d'exuvies larvaires,
nymphales

Variation du trouble de chitine en suspension (en % du trouble initial). Durée d'incubation :	Durée d'incubation :		
	2 h.	3 h.	7 h.
mg.	14.5 %	18 %	35 %
mg.	15 %	21 %	37.5 %
mg.	77 %	90 %	solubi- lisation complète
	0 %	1.2%	0 %

ans 10 ml. d'eau).
it 2 mg. de chitine).
2 (pH final des solutions : 5.45).

ies sont doués de propriétés
chitinolytiques des exuvies
tativement identiques, par
Celle des exuvies nymphales
77 % de variation de trouble
soit une activité au moins
autres extraits).

IVITÉ CHITINOLYTIQUE
IRES ET NYMPHALES

our que la durée de conser-
n'excède pas 15 jours, deux
s pour cette expérience, à

Lot n° 1 : 187 exuvies larvaires fraîches (poids frais 426.5 mg., soit poids sec 386 mg.), broyées dans 15 ml. d'eau bidistillée. A 4 ml. d'extrait centrifugé, on ajoute 1 ml. de suspension de chitine (2 mg./ml.), 1 grain de thymol et 1 ml. de tampons Citrate-NaOH 0.6 M, de pH 4.85 et 5.2, ou de tampon Borate-HCl 0.6 M de pH 8.1. Les pH des solutions enzymatiques deviennent respectivement, après équilibration, 4.95, 5.5 et 8.2.

Lot n° 2 : 236 exuvies larvaires fraîches (poids frais 610 mg., soit poids sec 552 mg.), broyées dans 20 ml. d'eau. A 4 ml. d'extrait centrifugé, on ajoute 1 ml. de chitine en suspension (2 mg./ml.), 1 grain de thymol et 1 ml. de tampon Citrate-HCl 0.6 M de pH 4.35, ou de tampons Citrate-NaOH 0.6 M de pH 4.85 et 5.2. Les pH des solutions enzymatiques deviennent respectivement, après équilibration, 4.55, 4.95 et 5.55.

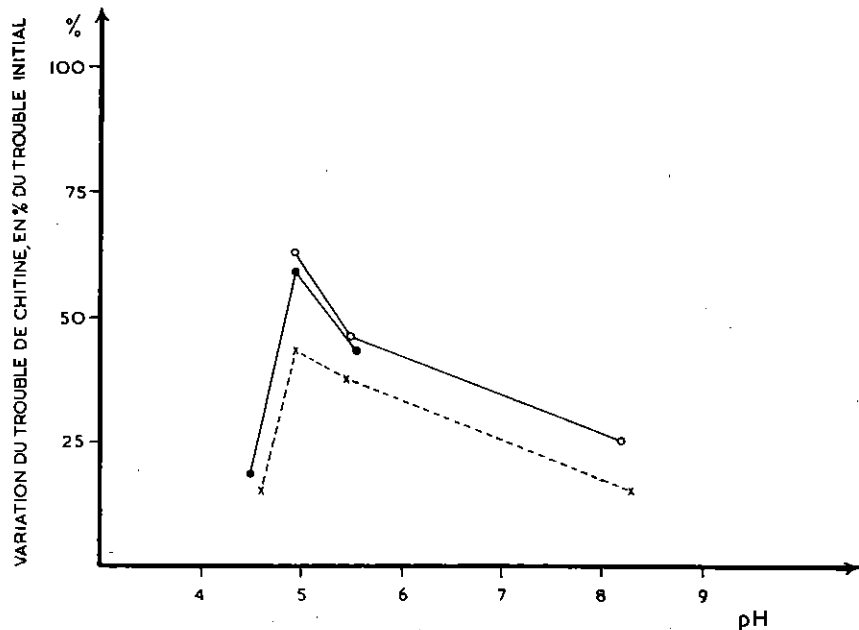


Fig. 1. Influence du pH sur l'activité chitinolytique d'extraits aqueux d'exuvies

○—○ : lot n° 1 } extraits d'exuvies larvaires, après 8h. d'incubation à 37° C.
●—● : lot n° 2 }
x—x : extrait d'exuvies pré-nymphales, après 7h. d'incubation à 37° C.

FIG. 1. — Conditions expérimentales et préparation des extraits : dans le texte.

On mesure la variation de trouble après 8 heures d'incubation à 37° C. La courbe d'activité en fonction du pH est présentée dans la figure 1.

b) *Chitinase exuviale des prénymphe*s. — 280 exuvies prénympheales (poids frais 750 mg., soit poids sec 678 mg.), sont broyées dans 25 ml. d'eau bidistillée. A 4 ml. d'extrait centrifugé, on ajoute 1 ml. de suspension de chitine (2 mg./ml.), 1 grain de thymol et 1 ml. des solutions tampons 0.6 M suivantes : Citrate-HCl de pH 4.4 ; Citrate-NaOH de pH 4.85 et 5.2 ; Borate-HCl de pH 8.1. Après équilibration, le pH des solutions enzymatiques est respectivement de 4.6, 4.95, 5.45 et 8.3. On dose la chitinase par mesure de la variation de trouble, après 7 heures d'incubation à 37° C (fig. 1).

On obtient, pour les deux types d'extraits, les mêmes courbes d'activité. Le pH optimum est situé aux environs de 4.95. L'activité de l'enzyme est considérablement réduite aux pH inférieurs à 4.6 et supérieurs à 7.

4. — EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA CHITINASE EXUVIALE DE PRÉNYMPHES

224 exuvies prénympheales, poids frais 600 mg. (soit poids sec 542.5 mg.) sont broyées dans 20 ml. d'eau bidistillée. A 4 ml. de l'extrait centrifugé, on ajoute 1 ml. de suspension de chitine pulvérisée (2 mg./ml.), 1 ml. de tampon Citrate-NaOH 0.6 M de pH 4.85 (pH final de la solution enzymatique : 4.95) et 1 grain de thymol. On dose l'activité chitinolytique par mesure de la variation de trouble, à 4 températures d'incubation différentes : 28, 37, 45 et 50° C ($\pm 1^\circ$ C) (fig. 2).

La température optimale est située aux environs de 37° C. A 45° C, l'activité est relativement élevée pendant les premières heures d'incubation, mais elle est ensuite rapidement détruite. Elle est pratiquement nulle à 50° C.

Discussion et conclusions

Les extraits aqueux des exuvies larvaires, prénympheales et nymphales de *Tenebrio molitor* L. manifestent une nette activité chitinolytique, témoin de l'existence d'une chitinase dans le liquide exuvial.

Pour des poids identiques d'exuvies fraîches, la teneur des exuvies nymphales en chitinase est 5 fois plus élevée que celle des exuvies larvaires et prénympheales. Nous croyons pouvoir expliquer, au

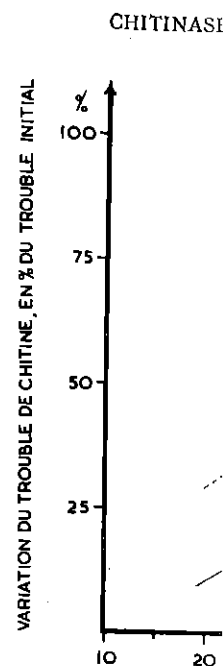


Fig. 2: Eff. exu

FIG. 2. — Con

moins partiellement, cette la chitinase exuviale a exuvies ; dans ce cas, el exuvies plutôt que de leu mativement deux fois n totale est indubitableme Il n'est donc pas étonn exuviale nettement plus é

La chitinase exuviale fonction du pH que cell semblable à celle des au du liquide exuvial de *Bom* Toutes ces chitinases, en et 5.4 ; leur activité est et supérieurs à 7.

après 8 heures d'incubation à
 du pH est présentée dans la

— 280 exuvies prény-
 sec 678 mg.), sont broyées
 extrait centrifugé, on ajoute
 ml.), 1 grain de thymol et
 tes : Citrate-HCl de pH 4.4 ;
 ate-HCl de pH 8.1. Après
 natiques est respectivement
 chitinase par mesure de la
 incubation à 37° C (fig. 1).
 its, les mêmes courbes d'acti-
 irons de 4.95. L'activité de
 aux pH inférieurs à 4.6 et

R LA CHITINASE EXUVIALE
 ES

is 600 mg. (soit poids sec
 eau bidistillée. A 4 ml. de
 suspension de chitine pulvé-
 ate-NaOH 0.6 M de pH 4.85
 4.95) et 1 grain de thymol.
 mesure de la variation de
 différentes : 28, 37, 45 et

aux environs de 37° C. A
 vée pendant les premières
 te rapidement détruite. Elle

Conclusions

aires, prénympales et nym-
 nt une nette activité chitino-
 inase dans le liquide exuvial.
 raîches, la teneur des exuvies
 élevée que celle des exuvies
 yons pouvoir expliquer, au

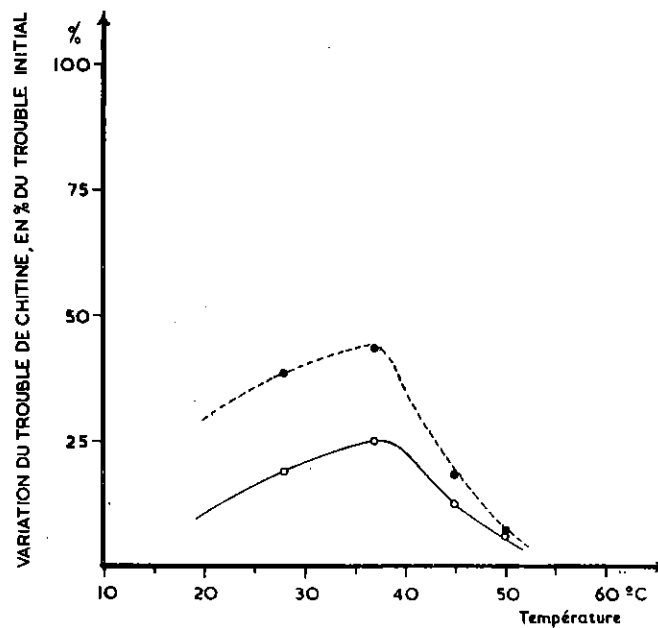


Fig. 2: Effet de la température sur la chitinase exuviale de prénympes.

○ — ○ après 3h. d'incubation } à pH 4,95
 ● — ● après 7h. d'incubation }

FIG. 2. — Conditions expérimentales dans le texte.

moins partiellement, cette différence quantitative en considérant que la chitinase exuviale adhère seulement à la surface interne des exuvies ; dans ce cas, elle dépend du nombre et de la surface des exuvies plutôt que de leur poids. Une exuvie nymphale pèse approximativement deux fois moins qu'une autre exuvie, et sa surface totale est indubitablement plus étendue (appendices, replis, etc.). Il n'est donc pas étonnant d'enregistrer une teneur en chitinase exuviale nettement plus élevée dans les extraits d'exuvies nymphales.

La chitinase exuviale des larves présente la même cinétique en fonction du pH que celle des prénympes. Cette cinétique est fort semblable à celle des autres chitinases connues, notamment à celle du liquide exuvial de *Bombyx mori* L. (JEUNIAUX et AMANIEU, 1955). Toutes ces chitinases, en effet, ont un pH optimum situé entre 4.8 et 5.4 ; leur activité est nettement réduite aux pH inférieurs à 4.5 et supérieurs à 7.

L'activité de la chitinase exuviale en fonction de la température est également semblable à celle des autres chitinases, caractérisées par un optimum situé entre 37 et 40° C, et une destruction rapide à des températures légèrement supérieures.

Ces deux aspects de la cinétique de la chitinase exuviale sont toutefois totalement différents de ceux décrits par HAMAMURA et KANEHARA (1940, 1954) pour un extrait aqueux d'exuvies larvaires de *Bombyx mori* L. (pH optimum : 8.3 ; température optimale : 50° C).

Résumé

Des extraits aqueux d'exuvies larvaires, prénympales et nympales de *Tenebrio molitor* L. (Coléoptère) sont doués de propriétés chitinolytiques analogues à celles du liquide exuvial de *Bombyx mori* L. (Lépidoptère). Proportionnellement au poids d'exuvies fraîches, les extraits d'exuvies nympales sont 5 fois plus riches en chitinase que ceux des autres exuvies. Le pH optimum de cette chitinase exuviale est situé aux environs de 4.95 et la température optimale est voisine de 37° C.

BIBLIOGRAPHIE

- HAMAMURA, Y. et KANEHARA, Y. — *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 1940, **16**, 907.
 HAMARUMA, Y., IIDA, S., OTSUKA, M., KANEHARA, Y. et ITO, S. — *Bull. Faculty Textile Fibers, Kyoto Univ. Industr. Arts Text. Fibers*, 1954, **1**, 127.
 JEUNIAUX, Ch. — *Arch. internat. Physiol.*, 1951, **59**, 242.
 JEUNIAUX, Ch. et AMANIEU, M. — *Arch. internat. Physiol. et Bioch.*, 1955, **63**, 94.
 PASSONNEAU, J. V. et WILLIAMS, C. M. — *J. Exper. Biol.*, 1953, **30**, 545.
 WIGGLESWORTH, V. B. — *Biol. Rev.*, 1948, **23**, 408.

EXCERP

lit tous les périodiques médicaux

Sect. I	Anatomy, A
Sect. II	Physiology,
Sect. III	Endocrinolo
Sect. IV	Hygiene an
Sect. V	General Pat
Sect. VI	Internal Me
Sect. VII	Pediatrics
Sect. VIII	Neurology a
Sect. IX	Surgery ...
Sect. X	Obstetrics a
Sect. XI	Oto-, Rhino
Sect. XII	Ophthalmolo
Sect. XIII	Dermatology
Sect. XIV	Radiology
Sect. XV	Tuberculosis

Prospectus détaillé et dépo

Les

226