

Caractères et Évolution des Enzymes Chitinolytiques chez les Vertébrés Inférieurs

CH. JEUNIAUX, G. DANDRIFOSSE and J. C. MICHA

Université de Liège, Institut de Zoologie, Laboratoires de Morphologie, Systématique et Ecologie animales et Institut L. Fredericq, Laboratoire de Biochimie Générale et Comparée, 17 Place Delcour, B 4020 Liège, Belgium

Key Word Index - Fish; Amphibia; Reptilia; chitinases; digestive systems; evolution.

Abstract - The activity of chitinases extracted from various organs of different fish, amphibians and reptiles was estimated as a function of pH by using "native" chitin as substrate. Three types of chitinase activity were recorded, suggesting the existence of three different chitinase types: Type I: (optimum pH: 4.5, no activity at pH 1.0) was found in various organs, such as intestine, pyloric caeca, pancreas, liver, spleen, etc.); Type IIa: (optimum pH: 3.0, weak activity at pH 1.0) was obtained from the gastric mucosa of fish and one species of urodele; Type IIb: (optimum pH: 3.0, strong activity at pH 1.0) was found in the gastric mucosa of reptiles and batrachian anura. Chitinase activity appears to be adapted to the pH of the digestive fluids. A tentative scheme is presented of chitinase evolution among lower vertebrates.

Introduction

Beaucoup de Vertébrés sont capables de sécréter des chitinases (poly- β -1,4-(2-acétamido-2-déoxy)-D-glucoside glycanohydrolase: E.N. 3.2.1.14) au niveau du tube digestif [1]. Cette propriété s'observe chez la plupart des Poissons et des Batraciens [2, 3] ainsi que chez les espèces de Reptiles, d'Oiseaux et de Mammifères dont le régime alimentaire contient de la chitine, tandis que les espèces à régime rigoureusement phytophage ou carnivore semblent incapables d'accomplir la synthèse de chitinases [4, 5]. L'addition de chitine à la nourriture n'induit pas la synthèse de chitinases chez les espèces à régime phytophage; un régime sans chitine ne diminue pas la concentration intratissulaire de chitinases chez les espèces à régime habituellement insectivore ou mycophage [5, 6]. Ces observations ont conduit à interpréter la corrélation entre le régime alimentaire et la sécrétion de chitinases comme le résultat d'une évolution par "enzymaphérèse", c'est-à-dire par perte de la biosynthèse de la chitinase à la suite de l'adaptation à des régimes spécialisés dépourvus de chitine [7].

Chez les Vertébrés, divers tissus ou organes élaborent des enzymes chitinolytiques. Le siège principal de la synthèse des chitinases est situé au

niveau de la muqueuse gastrique, du pancréas et, chez certains poissons, au niveau de la muqueuse intestinale ou des caeca pyloriques [1, 3-5, 8].

Les chitinases d'origine bactérienne et les chitinases des invertébrés présentent les mêmes caractéristiques en ce qui concerne l'activité en fonction du pH, c'est-à-dire un pH optimum voisin de 5,2 et une activité très réduite en-dessous du pH optimum (voir [5]) lorsque le substrat utilisé pour mesurer l'activité chitinolytique est la chitine. Au contraire, les chitinases gastriques des Vertébrés inférieurs se distinguent par un pH optimum voisin de 3,0 (chez les Reptiles [9] ou de 4,0-4,5 chez 4 espèces de Poissons Téléostéens [10-14]). L'activité de la chitinase gastrique des Reptiles reste élevée en milieu acide, jusque pH 1 [9]. Lorsque le substrat utilisé pour mesurer l'activité des chitinases est la glycolchitine, les résultats obtenus peuvent être différents [5, 8]. La chitinase gastrique du Poisson Téléostéen *Coryphaenoides rupestris* possède une activité maximale à pH 1,25 tandis que celle de Sélacien *Squalus acanthias* présente deux optima d'activité situés l'un à pH 1,6 et l'autre à pH 3,6 [8]. La chitinase pancréatique de *Chimaera monstrosa* montrerait également deux optima d'activité, l'un à pH 3,0 et l'autre à pH 9.

Il semble donc qu'il existe plusieurs types de chitinases, différents par leur activité en fonction du pH. A part la chitinase du foie d'un poisson

(Received 24 April 1982)

(pH optimum = 4,0 [15]), les chitinases pancréatiques des Reptiles et des Batraciens et celles de l'intestin, des caeca pyloriques, de la rate et des reins des Poissons n'ont jamais été étudiées à ce point de vue.

Le présent travail a pour but de caractériser les chitinases élaborées par ces divers tissus ou organes d'après leur activité en fonction du pH. Les résultats obtenus permettent de proposer un schéma d'évolution des enzymes chitinolytiques chez les Vertébrés.

Résultats

Chitinases Gastriques et Pancréatiques de Reptiles

Chez les deux espèces étudiées, le Lézard *Lacerta viridis* et la Tortue aquatique *Clemmys caspica*, la courbe d'activité des chitinases en fonction du pH varie sensiblement suivant l'origine tissulaire des enzymes (Fig. 1). Les chitinases gastriques présentent un pH optimum voisin de 3,0; la pente de la courbe d'activité est peu accusée du côté des pH inférieurs au pH optimum, ce qui traduit une inhibition peu marquée en milieu acide (à pH 1,5, l'activité est encore égale à 75% environ de l'activité au pH optimum).

Les chitinases pancréatiques ont un pH optimum voisin de 4,5; la pente de la courbe d'activité est aussi accusée du côté des pH inférieurs au pH optimum que du côté des pH supérieurs (à pH 2,0, l'activité est pratiquement nulle).

Chitinases Gastriques et Pancréatiques de Batraciens

Trois espèces de Batraciens ont été étudiées: deux Anoures (*Rana temporaria* L. et *Bufo marinus* L.) et un Urodèle (*Triturus alpestris* Laur.). Le pH optimum voisin de 3,0 et la courbe d'activité des chitinases gastriques des deux Anoures (Fig. 2) sont très semblables aux caractères des chitinases gastriques de Reptiles. De même, les chitinases pancréatiques ont les mêmes propriétés vis-à-vis du pH que les chitinases pancréatiques de Reptiles (pH optimum voisin de 4,5; activité fortement réduite en-dessous du pH optimum) (Fig. 3).

Dans le cas du Triton (Fig. 2), la chitinase gastrique présente un pH optimum voisin de 3,0, comme celles des autres Reptiles et Batraciens, mais la pente de la courbe d'activité est très accusée du côté des pH acides, de sorte que

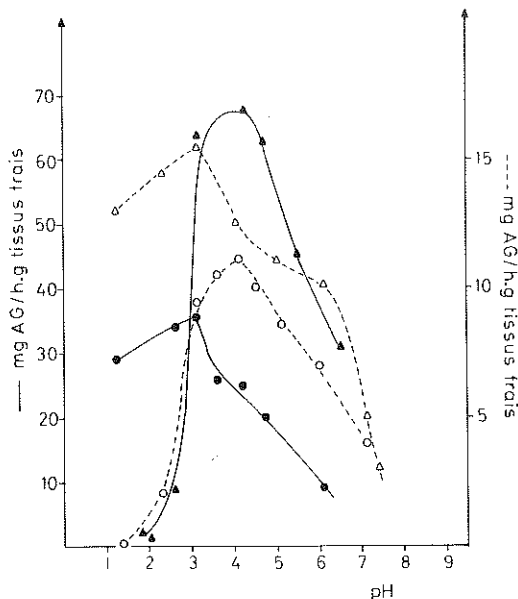


FIG. 1. ACTIVITE DES CHITINASES GASTRIQUE ET PANCREATIQUE DE DEUX REPTILES EN FONCTION DU pH (CONDITIONS EXPERIMENTALES DANS LE TEXTE). O—O: Chitinase pancréatique (*Lacerta viridis*); ▲—▲: chitinase pancréatique (*Clemmys caspica*); Δ—Δ: chitinase gastrique (*Lacerta viridis*); O—O: chitinase gastrique (*Clemmys caspica*).

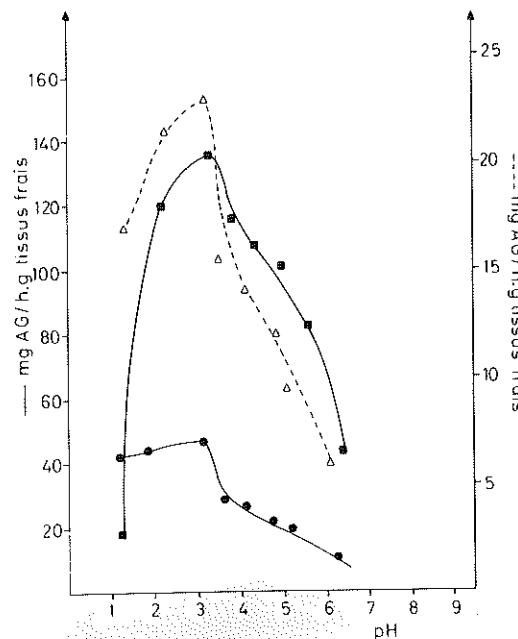


FIG. 2. ACTIVITE DES CHITINASES GASTRIQUES D'UN BATRACIEN URODELE ET DE DEUX BATRACIENS ANOURES EN FONCTION DU pH (CONDITIONS EXPERIMENTALES DANS LE TEXTE). Δ—Δ: *Rana temporaria*; ●—●: *Bufo marinus*; ■—■: *Triturus alpestris*.

mg AG/h.g. tissu. frais

FIG. 3. A. BATRACIEN EXPERIM

l'activit
l'activit
pancré

Chitina
Chez l
(*Scyllio*
chitina
voisin
pente
est rel
encore
Ces pr
chitina
sembl
chitina
(*Brach*
Téléos
avons
irideus
lucinus
fluviati

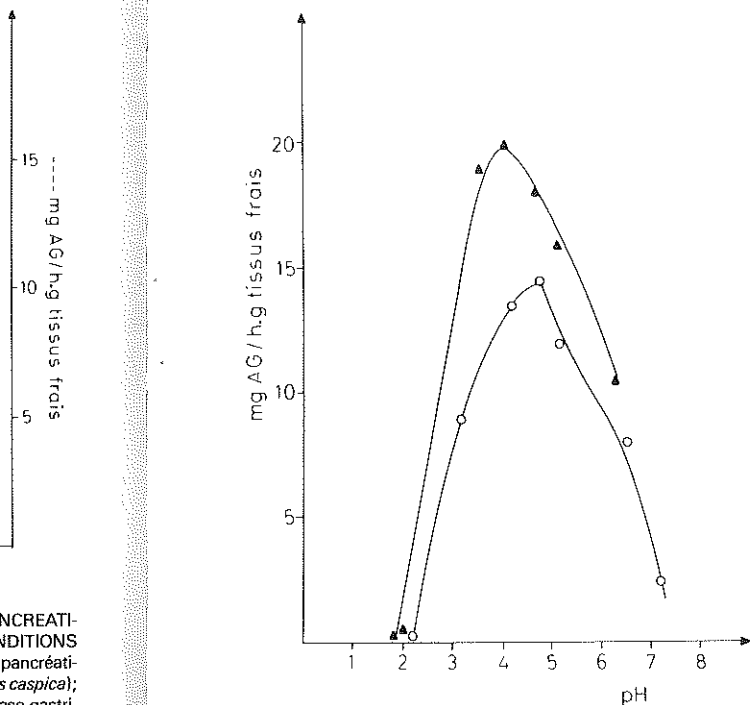


FIG. 3. ACTIVITE DES CHITINASES PANCREATIQUES DE DEUX BATRACIENS ANOURES EN FONCTION DU pH (CONDITIONS EXPERIMENTALES DANS LE TEXTE). ○-○: *Rana temporaria*; ▲-▲: *Bufo marinus*.

l'activité est très réduite à pH 1,25 (10% de l'activité maximum). Les propriétés de la chitinase pancréatique de Triton n'ont pas été étudiées.

Chitinases Gastriques de Poissons

Chez les deux espèces de Sélaciens étudiées (*Scylliorhinus canicula* et *Raja montagui*), les chitinases gastriques montrent un pH optimum voisin de 3,0 et une courbe d'activité dont la pente du côté des pH inférieurs au pH optimum est relativement accusée (Fig. 4). L'activité est encore élevée à pH 2, mais très réduite à pH 1. Ces propriétés sont comparables à celles de la chitinase gastrique du Triton. Des observations semblables ont été effectuées dans le cas des chitinases gastriques de *Polypterus ornatipinnis* (Brachyoptérygien) (Fig. 5) et de tous les Téléostéens à estomac différencié que nous avons étudiées: *Platichthys flesus* (Fig. 5), *Salmo irideus*, *Esox lucius*, *Anguilla anguilla*, *Gadus lucinus*, *Pterois volitans*, *Trigla lucerna* et *Perca fluviatilis*.

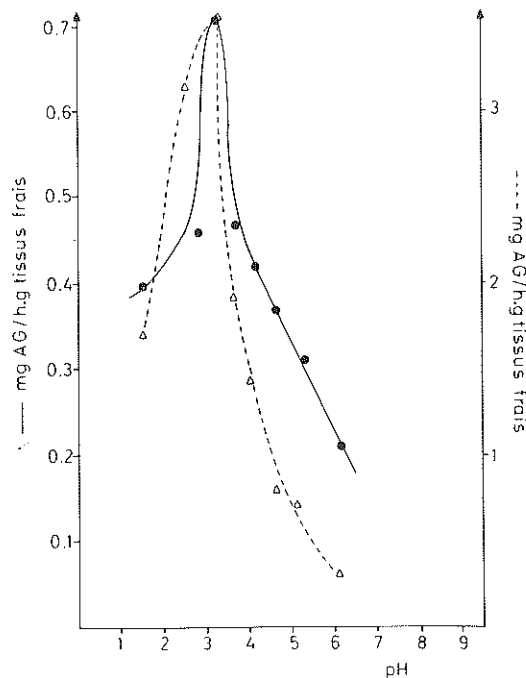


FIG. 4. ACTIVITE DES CHITINASES GASTRIQUES DE DEUX SELACIENS EN FONCTION DU pH (CONDITIONS EXPERIMENTALES DANS LE TEXTE). ●-●: *Raja montagui*; △-△: *Scylliorhinus canicula*.

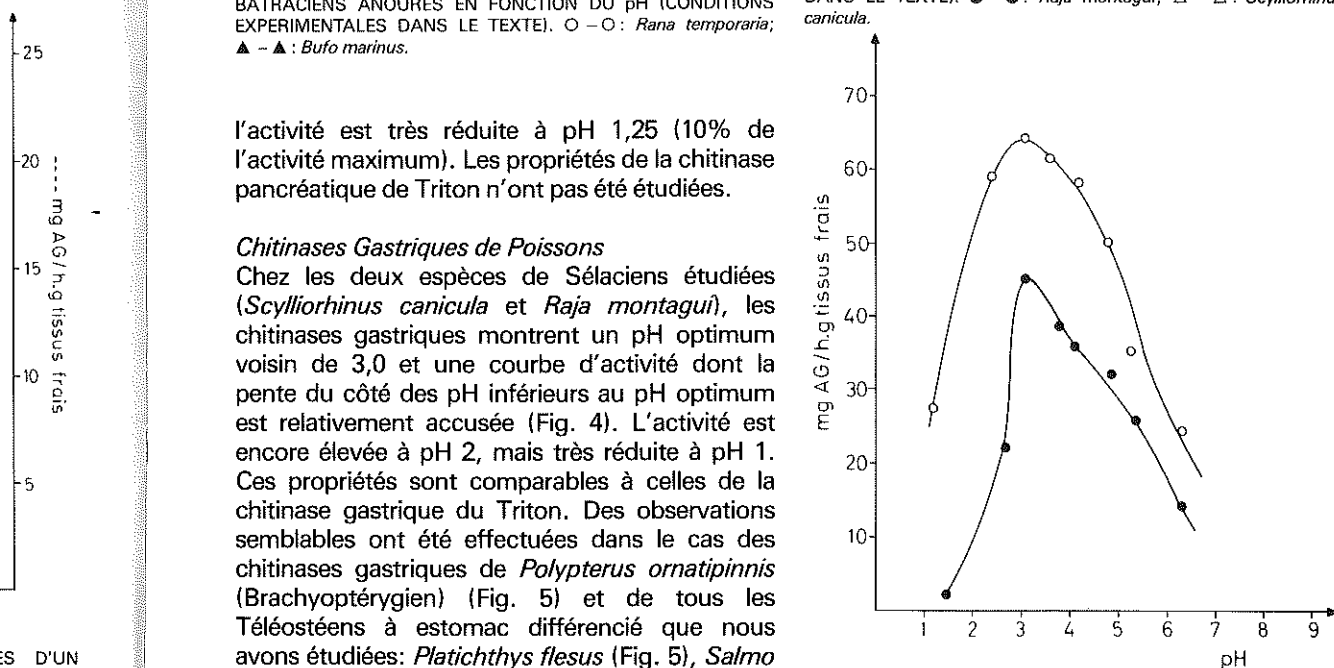


FIG. 5. ACTIVITE DES CHITINASES GASTRIQUES DE *POLYPTERUS ORNATIPINNIS*, BRACHYOPTERIGIEN (○-○) ET DE *PLATICTHYS FLEUS*, TELEOSTEEN (●-●) EN FONCTION DU pH (CONDITIONS EXPERIMENTALES DANS LE TEXTE).

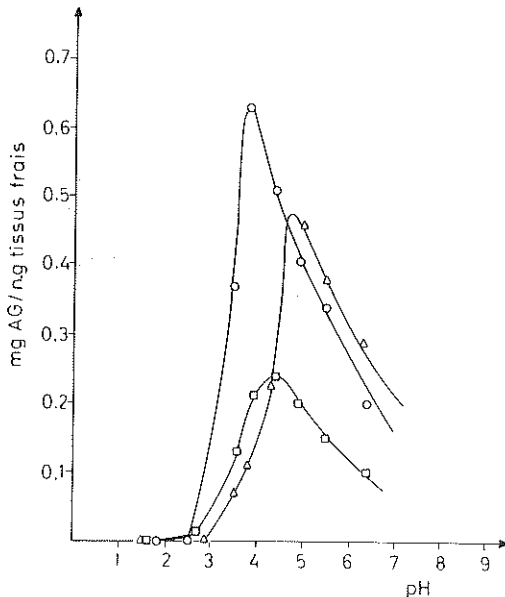


FIG. 6. ACTIVITE DES CHITINASES DE L'INTESTIN DE *SOLEA SOLEA*, DU BULBE INTESTINAL DE *CYPRINUS CARPIO* ET DE *GARDONUS RUTILUS* EN FONCTION DU pH (CONDITIONS EXPERIMENTALES DANS LE TEXTE). Δ - Δ : *Solea solea*; \square - \square : *Cyprinus carpio*; \circ - \circ : *Gardonus rutilus*.

Chitinases de l'Intestin, du Bulbe Intestinal et des Caeca Pyloriques des Poissons

La muqueuse intestinale de la Sole, *Solea solea*, synthétise une chitinase dont l'activité en fonction du pH se caractérise par un pH optimum voisin de 4,5, et une inhibition très marquée du côté des pH inférieurs en-dessous du pH optimum, l'activité étant nulle à pH 3,0 (Fig. 6). Dans le cas des poissons sans estomac, la partie antérieure du tube digestif est élargie en bulbe intestinal. Les chitinases de la muqueuse du bulbe intestinal de la Carpe, *Cyprinus carpio*, et du Gardon, *Gardonus rutilus*, montrent un pH optimum voisin de 4,5 et une courbe d'activité en fonction du pH semblables à ceux de la muqueuse intestinale de la Sole (Fig. 6). Il en est de même des chitinases des caeca pyloriques de *Gadus luscus* et d'*Onos mustelus*.

Les chitinases synthétisées par les muqueuses de l'intestin, du bulbe intestinal et des caeca pyloriques présentent donc les mêmes caractéristiques que celles des chitinases pancréatiques des Batraciens et des Reptiles.

Chitinases d'autres Organes

La Fig. 7 montre que les extraits de foie et

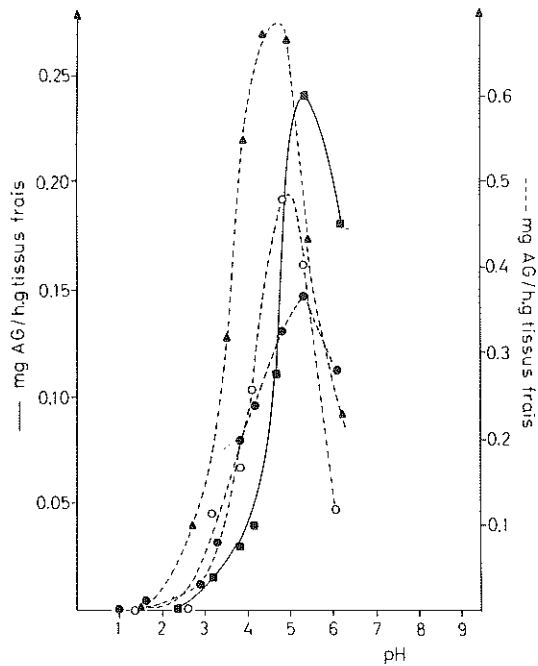


FIG. 7. ACTIVITES DE CHITINASES DE RATE, DE FOIE ET DE REINS DE POISSONS EN FONCTION DU pH (CONDITIONS EXPERIMENTALES DANS LE TEXTE). \blacksquare - \blacksquare : Chitinase de foie (*Cottus bubalis*); \bullet - \bullet : chitinase de rate (*Scylliorhinus canicula*); \circ - \circ : chitinase de reins (*Squalus acanthias*); \blacktriangle - \blacktriangle : chitinase de reins (*Cyprinus carpio*).

de reins de plusieurs espèces de poissons, tant Téléostéens que Sélaciens, présentent une activité chitinolytique. Ces enzymes ont un pH optimum compris entre 4,5 et 5,0; la courbe d'activité en fonction du pH se caractérise par une pente très accusée du côté des pH inférieurs au pH optimum, de sorte que l'activité à pH 2 est pratiquement nulle. Ces chitinases présentent donc les mêmes propriétés que celles du pancréas des Batraciens et des Reptiles.

Spécificité d'Action des Chitinases Gastriques et Pancréatiques

Nous nous sommes demandé si les observations rapportées ci-dessus démontrent l'existence de plusieurs types de chitinases. On peut en effet imaginer que les extraits contiennent des substances modifiant l'activité de ces enzymes en fonction du pH. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé, à pH acides, l'activité chitinolytique d'une quantité déterminée d'extrait de muqueuse gastrique de *Clemmys caspica* additionnée ou non d'une quantité

CARAC

connu
même
Le
chitin
pas r
les di
les lin
dém
gastri
de chi

TABLEA
PANCR

Incubat
présenc
Extraits
Extraits
extrai
Extraits
Extraits
extrai

Discu

La mé
des ch
interfé
avons
l'actio
princip
Après
derniè
acétyl
incuba
l'acéty
mesur
des pr
résulta
la chiti

A
gastriq
organe
rein, ra
activité
acides
de Oku
de Lat
par All
muque
Elles s
Fänge
créatiq
ont m

connue d'extrait enzymatique de pancréas de la même espèce.

Le Tableau 1 montre que l'activité des chitinases gastriques, mesurée à pH acides, n'est pas modifiée en présence d'extrait pancréatique, les différences observées étant comprises dans les limites d'erreur de la méthode. Ces résultats démontrent que le pancréas et la muqueuse gastrique contiennent bien deux types différents de chitinases.

TABLEAU 1. SPECIFICITE DES CHITINASES GASTRIQUE ET PANCREATIQUE DE *CLEMMYS CASPICA*

Incubation de chitine en présence de:	pH	Activité en mg d'AG libérée/h.g. de tissus frais
Extraits gastriques	1,4	21,4
Extraits gastriques + extraits pancréatiques	1,4	22,0
Extraits gastriques	2,05	23,8
Extraits gastriques + extraits pancréatiques	2,05	24,0

Discussion

La méthode utilisée permet de mesurer l'activité des chitinases en fonction du pH en évitant toute interférence avec l'activité des chitobiasés. Nous avons dosé les produits d'hydrolyse libérés par l'action de la chitinase sur la chitine, à savoir principalement le chitobiose et le chitotriose. Après arrêt de la réaction de chitinolyse, ces deux dernières substances ont été hydrolysées en acétylglucosamine après addition de chitobiasé et incubation à pH 5,3; le dosage colorimétrique de l'acétylglucosamine ainsi libérée [16] donne une mesure exacte (exprimée en acétylglucosamine) des produits d'hydrolyse à faible poids moléculaire résultant de l'action spécifique de la chitinase sur la chitine.

A l'exception des chitinases d'origine gastrique, les chitinases extraites d'autres organes (pancréas, intestin, caeca pyloriques, foie, rein, rate), ont un pH optimum voisin de 4,5 et leur activité est rapidement inhibée du côté des pH acides. Ces observations sont identiques à celles de Okutani et Kimata [15] pour la chitinase du foie de *Lateolabrax japonicus* et à celles rapportées par Alliot et Bocquet [14] pour la chitinase de la muqueuse intestinale de *Scylliorhinus canicula*. Elles sont différentes de celles rapportées par Fänge *et al.* [8] dans le cas de la chitinase pancréatique de *Chimaera monstrosa*. Ces auteurs ont montré que cet enzyme possède deux pH

optima, l'un situé à 3 et l'autre aux environs de 9. Il peut s'agir d'une différence d'ordre taxonomique; mais, il est plus probable que celle-ci résulte des techniques expérimentales employées pour estimer l'activité des chitinases. En effet, les substrats et les tampons utilisés, notamment, ne sont pas les mêmes. Nous avons choisi la chitine native (une préparation voisine de celle que digère l'animal) tandis que Fänge *et al.* [8] employent de la glycolchitine. Ces derniers auteurs rappellent d'ailleurs qu'il a été démontré [17] que les résultats sont différents suivant le type de substrat choisi. Dès lors, il n'est pas étonnant que les observations que nous avons effectuées dans le cas de la chitinase gastrique de différents Poissons ne correspondent pas non plus à celles rapportées par Fänge *et al.* [8]. Ceux-ci ont montré que la chitinase gastrique de *Coryphaenoides rupestris* possède une activité maximale à pH 1,25 tandis que celle de *Squalus acanthias* présente deux optima d'activité situés l'un à pH 1,6 et l'autre à pH 3,6. Par contre, pour les douze espèces de Poissons que nous avons étudiées, nous avons toujours observé un pH optimum voisin de 3,0.

Cette dernière valeur est proche de celle rapportée par Okutani et ses collaborateurs [10-12] dans le cas de quatre autres espèces de Téléostéens et par Alliot et Bocquet [14] dans le cas d'un Sélacien. Pour ces auteurs, pourtant, le pH optimum des chitinases gastriques, défini en utilisant de la chitine comme substrat, serait voisin de 4. La différence observée peut évidemment être d'ordre taxonomique, il nous semble plutôt qu'elle soit due aux longues durées d'incubation employées par les auteurs cités (6 à 48 h, au lieu de 2 h dans le présent travail). En effet, la stabilité des chitinases gastriques de *Salmo irideus* [12] et de *Lateolabrax japonicus* [17] est moindre à pH 3,0 qu'à pH 4,0 ou 5,0; ce facteur est susceptible de modifier l'allure de la courbe d'activité dans la zone des pH inférieurs à 4,0, lorsque la durée d'incubation dépasse 2 h. D'autre part, Alliot et Bocquet [14] ont mesuré directement la quantité d'acétylglucosamine libérée à partir de la chitine par des extraits enzymatiques contenant vraisemblablement peu de chitobiasés. Ce fait explique la longueur des temps d'incubation (24 h). Il signifie également que les activités mesurées par la quantité d'acétylglucosamine libérée

dépendent à la fois de la vitesse d'hydrolyse de la chitine par la chitinase et de la vitesse d'hydrolyse des produits de cette première réaction (principalement chitobiose et chitotriose) par la chitobiase, alors que ces deux enzymes n'ont pas la même courbe d'activité en fonction du pH. Nos résultats et ceux d'Okutani et collaborateurs sont à l'abri de cette source d'erreur (cfr. ci-dessus).

Les chitinases que nous avons étudiées, extraites de 31 tissus ou organes différents, peuvent être réparties en 3 groupes, sur la base de leur activité en fonction du pH, mesurée à la température optimum de 37° après 2 h d'incubation.

Un premier type de chitinases ("Type I") est caractérisé par un pH optimum voisin de 4,0-4,5, et par une courbe d'activité dont la pente est plus accusée du côté des pH inférieurs au pH optimum; l'activité est pratiquement nulle à pH 2,0, alors qu'elle est encore élevée à pH 6,0. Les chitinases extraites du foie, des reins, de la rate, de la muqueuse de l'intestin, de la muqueuse du bulbe intestinal et des caeca pyloriques de poissons, de même que celles extraites du pancréas des batraciens et des reptiles, appartiennent au Type I.

Les chitinases élaborées par les muqueuses gastriques diffèrent toutes des chitinases du Type I par leur pH optimum voisin de 3,0. Parmi les chitinases gastriques, deux types peuvent être distingués. Les chitinases du "Type IIa" présentent, comme celles du Type I, une courbe d'activité dont la pente est plus forte du côté des pH inférieurs à 3,0, de sorte que l'activité est presque nulle à pH 1,0, et inférieure à celle mesurée à pH 6,0. Les chitinases du Type IIa ont été observées chez tous les Poissons Téléostéens à estomac différencié, chez les Sélaciens, chez un Brachyoptérogien et chez le Batracien Urodèle *Triturus vulgaris*. Au contraire, les chitinases du "Type IIb" montrent une courbe d'activité dont la pente est faible du côté des pH inférieurs à 3,0, de sorte que l'activité reste élevée à pH 2,0 et même à pH 1,0, où elle est encore nettement supérieure à l'activité mesurée à pH 6,0. Les chitinases du Type IIb sont les chitinases gastriques des Batraciens Anoures et des Reptiles.

On peut se demander si les propriétés des chitinases du Type I et du Type II, que nous venons de décrire, résultent de deux types d'enzymes différents ou si les différences

observées sont dues à la présence de substances contrôlant l'activité des enzymes en fonction du pH, présentes dans les extraits enzymatique étudiés. Nous avons constaté toutefois que l'addition d'un extrait pancréatique à un extrait de muqueuse gastrique ne modifie pas l'activité des chitinases de cet extrait, à pH acide. Il semble donc que les chitinases de Type I soient bien des substances différentes des chitinases de Type II. Il ne nous est pas possible actuellement de définir ce qui distingue ces deux types de chitinases du point de vue moléculaire.

L'existence de ces trois types de chitinases chez les Vertébrés inférieurs peut être considérée comme le résultat d'une évolution moléculaire à tendance adaptative. La distribution très large des chitinases du Type I dans les tissus et organes d'origine endodermique et mésodermique des Poissons suggère que celles-ci représentent un type primitif. Au cours de l'évolution, l'acquisition d'un estomac délimitant un milieu gastrique acide aurait été accompagnée d'une modification des propriétés des chitinases élaborées et sécrétées par la muqueuse de cet organe. Les chitinases du Type IIa constitueraient la première étape d'une adaptation à un milieu gastrique acide caractérisé par l'abaissement du pH optimum. Ce niveau d'évolution s'observe pour les chitinases gastriques de tous les Poissons (Téléostéens, Sélaciens, Brachyoptérygiens) et au moins d'un Batracien Urodèle, le Triton.

Les chitinases du Type IIb constitueraient une étape ultérieure de l'adaptation au milieu acide de l'estomac, caractérisée par l'étalement de la courbe d'activité du côté des pH acides, et par conséquent le maintien d'une activité relativement élevée à pH 1,0. Ce niveau d'évolution ne s'observe qu'à partir des Batraciens Anoures, et est conservé chez les Reptiles.

Les chitinases pancréatiques des Batraciens et des Reptiles ont par contre conservé les caractères des chitinases du Type "primitif" I, dont l'activité en fonction du pH est compatible avec les conditions de pH du milieu intestinal où ces chitinases pancréatiques exercent leur action. Cette hypothèse est résumée et schématisée dans la Fig. 8.

Matériel et méthodes

Les Reptiles et les Batraciens ont été soit capturés dans les Ardennes belges, soit achetés dans le commerce; les

FIG. 8. S
QUI CON

poisson
Belgiqu
pêchés
Biologi
Wimere

Les e
la mét
chitinas
permett
chitotri
préparé
incubat
de l'ext
100°. I
incubés
midodés
dilué 10
résultan
mesuré
dont la
eurement
en chiti
ce qui a

substances
onction du
zymatique
que l'addi-
extrait de
activité des
Il semble
nt bien des
e Type II. Il
t de définir
itinasas du

chitinases
considérée
oléculaire à
os large des
et organes
mique des
sentent un
acquisition
rique acide
lication des
t sécrétées
itinasas du
tape d'une
ue acide
optimum.
pour les
Poissons
rygiens) et
iton.

eraient une
eu acide de
ent de la
des, et par
lativement
es'observe
est conservé

atraciens et
servés les
primitif" I,
compatible
ntestinal où
leur action.
chématisée

urés dans les
ommerce; les

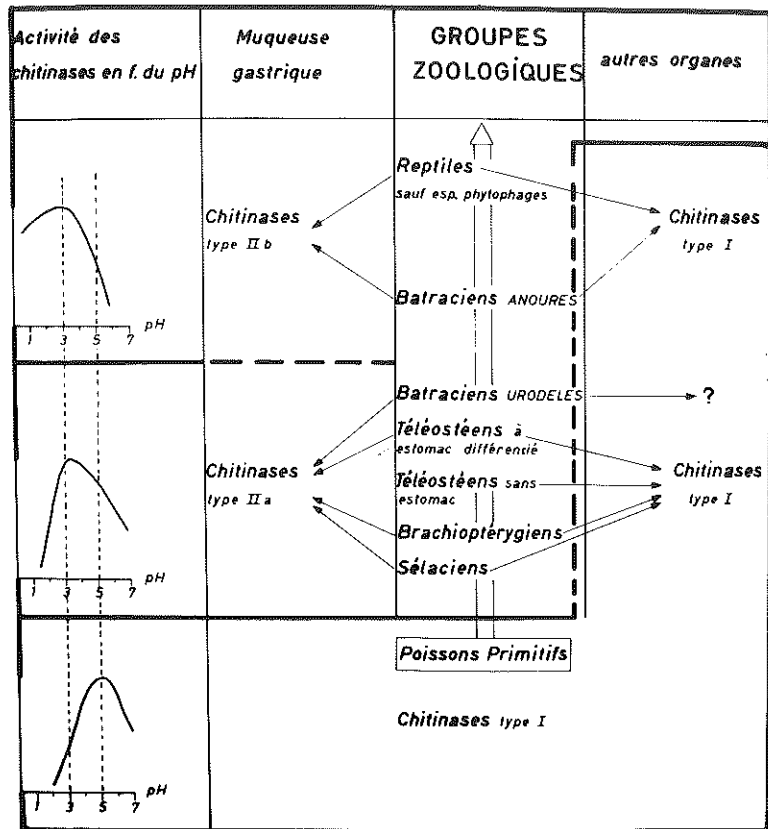


FIG. 8. SCHEMA HYPOTHETIQUE DE L'EVOLUTION DES CHITINASES DU SYSTEME DIGESTIF DES VERTEBRES INFERIEURS, EN CE QUI CONCERNE LEUR ACTIVITE EN FONCTION DU pH.

poissons d'eau douce ont été pêchés dans deux rivières de Belgique (Ourthe et Semois); les poissons marins ont été pêchés au large de Boulogne ou fournis par la Station de Biologie maritime et régionale de l'Université de Lille à Wimereux (France).

Les extraits d'organes et de tissus ont été préparés suivant la méthode décrite antérieurement [3]. L'activité des chitinases a été estimée au moyen d'une méthode permettant de mesurer la quantité de chitobiose et de chitotriose libérée par l'hydrolyse de chitine "native" préparée à partir de sépiens de *Sepia officinalis* [9]. Après incubation de la chitine à 37° et à différents pH en présence de l'extrait enzymatique étudié et inactivation des enzymes à 100°, les liquides surnageants sont amenés à pH 5,3 et incubés à 37° en présence de chitobiasse (chitobiose acétamidodéoxyglucohydrolase: E.N.3.2.1.29) (Sérum de homard, dilué 10 fois). La concentration de l'acétylglucosamine (AG) résultant de l'hydrolyse du chitobiose et du chitotriose est mesurée par la méthode de Reissig *et al.* [16]. Cette méthode, dont la spécificité et la précision ont été démontrées antérieurement [9] est applicable à des extraits enzymatiques riches en chitinase mais ne contenant que peu ou pas de chitobiasse, ce qui est le cas de la majorité des extraits de tissus de Verté-

brés [5]. Les solutions tampons suivantes ont été utilisées: pH 1-3,5: HCl 0,6 M-citrate de Na 0,4 M; pH 3,8-7: acide citrique 0,4 M-Na₂HPO₄ 0,8 M; pH 7-10: acide citrique 0,4 M-NaOH 0,6 M. Le pH du milieu réactionnel a été vérifié à la fin de l'incubation. L'activité enzymatique est exprimée en µmole d'AG libérée/h.g. de tissus frais.

Références

1. Jeuniaux, Ch. (1961) *Nature* **192**, 135.
2. Okutani, K. et Kimata, M. (1964) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **30**, 574.
3. Micha, J. C., Dandrifosse, G. et Jeuniaux, Ch. (1973) *Arch. Int. Physiol. Biochem.* **81**, 439.
4. Jeuniaux, Ch. (1962) *Ann. Soc. R. Zool. Belg.* **92**, 27.
5. Jeuniaux, Ch. (1963) *Chitine et Chitinolyse*. Un chapitre de la biologie moléculaire. Masson, Paris.
6. Frankignoul, M. et Jeuniaux, Ch. (1965) *Life Sci.* **4**, 1669.
7. Jeuniaux, Ch. (1971) in *Biochemical Evolution and the Origin of Life* (Schoffeniels, E., ed.), pp. 304-313. North Holland, Amsterdam.

8. Fänge, R., Lundblad, G., Lind, J. et Slettengren, K. (1979) *Mar. Biol.* **53**, 317.
9. Micha, J. C., Dandrifosse, G. et Jeuniaux, Ch. (1973) *Arch. Int. Physiol. Biochem.* **81**, 629.
10. Okutani, K. et Kimata, M. (1965) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **31**, 232.
11. Okutani, K., Kawada, I. et Kimata, M. (1967) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **33**, 848.
12. Okutani, K., Sawada, T. et Kimata, M. (1967) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **33**, 952.
13. Sera, H. et Okutani, K. (1968) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **34**, 920.
14. Alliot, E. et Bocquet, J. (1967) *C.R. Soc. Biol.* **161**, 840.
15. Okutani, K. et Kimata, M. (1964) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **30**, 490.
16. Reissig, J. L., Strominger, J. L. et Leloir, L. F. (1955) *J. Biol. Chem.* **217**, 959.
17. Lundblad, G., Hederstedt, B., Lind, J. and Steby, M. (1974) *Eur. J. Biochem.* **46**, 367.
18. Okutani, K. (1966) *Bull. Misaki Mar. Biol. Inst.* **10**, 1.

Pier

RÉSUME
de la t
thopté
probab
ment a

SUMM
ously
probab
seizing

L

ment
(comp
Mais
(1968)
L'osté
B. gat
l'aliza
iconog
musclé
fiels q
avec d
cantho
positio

MATER

Ne

(1) Ch
Labora
(2) M

Cybiu