

RYTHMICITÉ ENZYMATIQUE SAISONNIÈRE CHEZ UN GASTÉROPODE D'EAU DOUCE

par R. VAN COILLIE¹, A. ROUSSEAU¹ et G. VAN COILLIE-BARON².

Chaque semaine durant une année complète, nous avons dosé les quantités d'enzymes chitinolytiques hépatopancréatiques des gastéropodes *Pila leopoldvillensis* Putz. L'étude des doses ainsi acquises a permis de vérifier que la quantité élaborée de chitinase, avec laquelle la quantité de chitobiase est en relation suit, au niveau du métabolisme basal, une rythmicité concomitante avec la rythmicité climatique saisonnière du régime des eaux et des possibilités d'alimentation chitinique.

Seasonal enzymatic rhythm of a freshwater snail.

Determinations of the quantities of chitinolytic hepatopancreatic enzymes in the gasteropod *Pila leopoldvillensis* Putz. were performed weekly during a complete year. It was established that the quantity of chitinase produced is related to the concentration of chitobiase and follows, within the basal metabolism, a seasonal rhythm coinciding with the climatic changes in the water regime and in the dietary chitin content.

Divers êtres vivants, dont les gastéropodes, élaborent au niveau de leur système digestif, des enzymes capables de digérer la chitine (Jeuniaux 1963, Richards 1970). L'importance de la chitinolyse semble surtout dépendre de la quantité de chitine dans l'alimentation mais cette dépendance est controversée (Jeuniaux 1963). En rapport avec cette question, nous avons constaté que la vitesse avec laquelle un morceau de cuticule décalcifiée et déprotéinisée de crabe était dégradé par du suc hépatopancreatique de *Pila leopoldvillensis* Putz. variait, à égales quantités de cuticule et de suc, avec les saisons. Cette observation préliminaire nous amena à envisager, vérifier et constater que des changements quantitatifs importants du complexe chitinolytique avaient lieu avec les saisons dans l'hépatopancréas de ces gastropodes.

1. Centre Québécois des Sciences de l'Eau, INRS, Université du Québec, 555, boulevard Henri-IV, Québec 10, Canada.

2. Secrétariat général de l'Université du Québec, 2875, boulevard Laurier, Québec 10, Canada.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Chaque semaine durant une année complète, des dosages de la chitinase et de la chitobiase disponibles dans l'hépatopancreas ont été effectués chez *Pila leopoldvillensis* Putz.³ vivant le long des rives du Congo à Kinshasa et à Boma (Zaïre) (Pilsbry et Bequaert 1927). Au préalable, pour réaliser de tels dosages, un substrat chitinique assez pur s'imposait.

1) **Préparation du substrat chitinique.** — La chitine constituant un des principaux composés de la cuticule des arthropodes (Richards 1970), on choisissait des fragments cuticulaires frais d'un décapode, *Potamon faradjensis*, pour en extraire ce polysaccharide. A cette fin, leur décalcification, leur déprotéinisation et leur épuration étaient réalisées selon les méthodes de Jeuniaux (Jeuniaux 1963).

Pour s'assurer de la validité du substrat chitinique ainsi préparé, on se servait de la coloration histochimique appropriée de Schulze (Gabe 1968); elle se révéla toujours positive.

2) **Préparation des enzymes chitinolytiques.** — Après leur capture, les *Pila* séjournèrent deux semaines à l'obscurité dans un fond d'eau filtrée. Dans ce milieu énergétiquement minimal, ce délai devait suffire à faire passer leur métabolisme d'un stade actif au stade basal.

Ensuite, en veillant à ne pas blesser l'animal enfermé dans sa coquille, on découpait celle-ci. Rapidement sectionné, pesé et homogénéisé, son hépatopancreas restait pendant 48 heures à 4 °C dans 10 ml d'eau distillée additionnée de thymol antiseptique. Une double centrifugation séparait le culot tissulaire du jus hépatopancreatique où, entre autres, les enzymes chitinolytiques avaient pu diffuser.

On extrayait la chitinase du suc hépatopancreatique, à 4 °C (excepté les hydrolyses), dans des conditions antiseptiques (Jeuniaux 1959, 1963) :

- acidification du suc, dont on a noté le volume initial, jusqu'à pH 5.0, pH optimal pour la chitinase des gastéropodes;
- adsorption en masse de la chitinase sur un peu de chitine ajoutée au suc et recueil du culot comprenant le substrat et l'enzyme;
- hydrolyse du culot par sa chitinase à 37 °C pendant 24 heures dans le tampon acide critique 0.6 M et Na_2HPO_4 1.2 M à pH 5.0 complexant les ions Cu^{++} et Hg^{++} inhibiteurs de l'enzyme;

3. Synonymes : *Ampullaria leopoldvillensis* et *Ampullaria speciosa globosa*.

— double fractionnement de la solution avec $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0 à 55 % d'abord et de 30 à 50 % par la suite de façon à soutirer 10 ml de chitinase.

Jeuniaux (1963) a constaté que cette méthode garantit 95 % de pureté dans le produit terminal conservable à 4 °C.

La présence de chitobiase dans l'hépatopancréas des gastéropodes ne fait pas de doute (Jeuniaux 1963) mais, pour isoler cette hydrolase du suc de cet organe, nous n'avons toutefois point trouvé de méthodes adéquates.

3) **Dosage de la chitinase.** — Pour doser la chitinase, la mesure de la quantité de substrat chitinique hydrolysé par cette enzyme extraite du suc hépatopancréatique était adoptée (Jeuniaux 1963). Dans ce but, aux 10 ml de chitinase, on ajoutait 5 g de chitine, 10 ml du tampon pH 5.0 précité (voir 2) et un cristal de thymol; l'hydrolyse de la chitine en ses oligomères avait lieu pendant 10 heures à 37 °C.

Afin d'hydrolyser ensuite ces oligomères en monomères N-acétyl-D- β -glucosamine⁴, on additionnait 10 ml de β -glucosidase⁵ à 2 % au milieu d'incubation antérieur pour une nouvelle durée de 10 heures à 37 °C. Après une rapide ébullition pour dégrader les enzymes et une double centrifugation pour précipiter le reste de chitine, la concentration d'AG était déterminée par la technique spectrophotocolorimétrique⁶ de Reissig et coll. (Reissig et al. 1953). On transformait le nombre de μ g d'AG libéré/heure/ml en nombre de μ g de chitine hydrolysée/heure/gramme d'hépatopancréas (Jeuniaux 1963).

4) **Dosage de la chitobiase.** — L'hydrolyse de la chitine par la chitinase procurait une solution de chitotriose et de chitobiose (voir 3). Ce substrat était dirigé par le suc hépatopancréatique tel quel contenant la chitobiase. Après 10 heures d'incubation à 37 °C et à pH tamponné 5.0, on mesurait par spectrophotocolorimétrie la quantité d'AG libéré/heure/gramme d'hépatopancréas (voir 3) afin d'exprimer ainsi les doses de chitobiase (Jeuniaux 1963).

Tant pour les dosages de la chitobiase que pour ceux de la chitinase, des témoins étaient effectués soit sans enzyme soit sans substrat.

5) **Acquisition et traitement des données.** — Pour chacun des 4 à 9 *Pila* sacrifiés mensuellement, le suc hépatopancréatique était divisé en 2 parts égales, l'une pour la purification et le dosage de

4. AG : abréviation utilisée pour N-acétyl-D- β -glucosamine.

5. Produit fourni par Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey, U.S.A.

6. Spectrophotomètre utilisé : Beckman DU Standard.

sa chitinase, l'autre pour le dosage de sa chitobiase, afin d'avoir la même origine biologique pour les deux dosages.

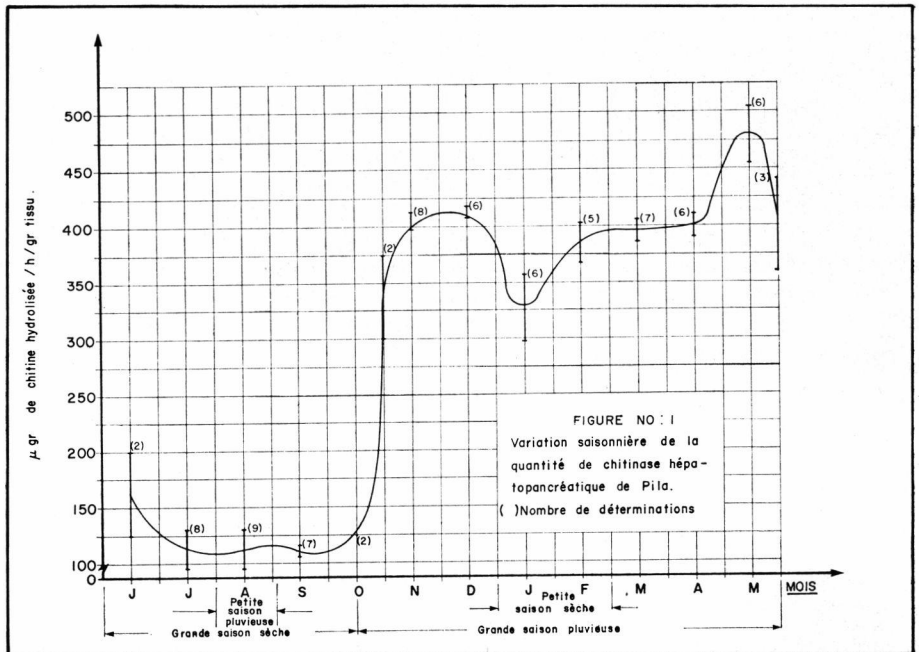
Au début de chaque dosage, on répartissait le substrat chitinique et la solution de chitinase en 4 échantillons identiques; la moyenne des 4 résultats de dosage était seule retenue.

Pour la chitinase comme pour la chitobiase, on calculait les doses moyennes mensuelles (ou bimensuelles pendant les changements de saison) tout en considérant pour chaque moyenne l'écart-type.

RÉSULTATS

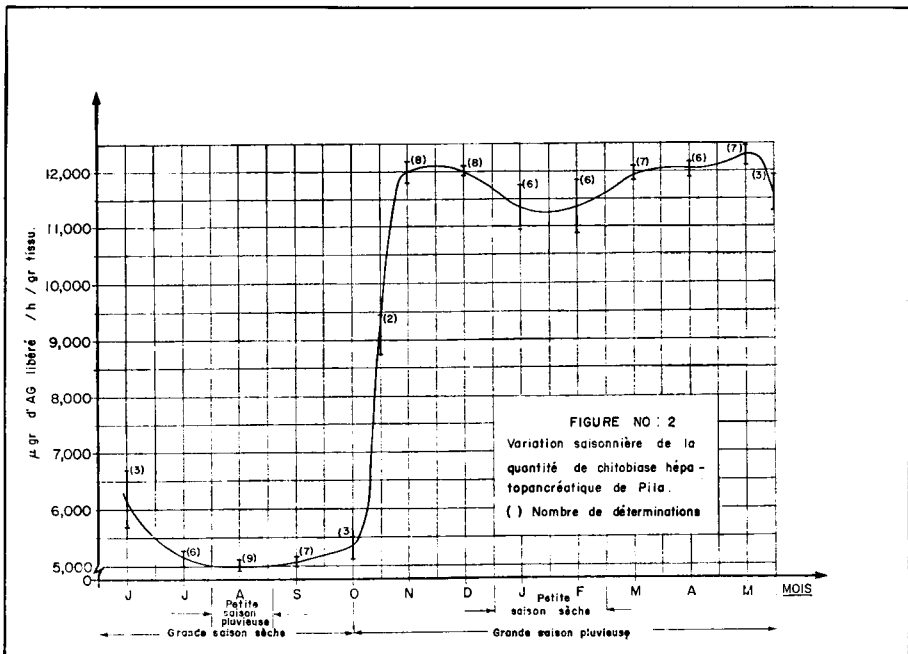
1) **Distribution saisonnière de la chitinase.** — Les doses mensuelles de chitinase sont représentées sur la figure 1. Celle-ci montre les caractéristiques suivantes à leur sujet :

— de mi-juin à mi-octobre, elles s'avèrent faibles pendant que durent la grande saison sèche dans le climat subéquatorial du Bas-Congo ainsi que le régime conséquent des basses eaux dans le fleuve Congo à cet endroit;



- de mi-octobre à mi-juin, elles s'élèvent à un niveau moyen 3.26 fois plus grand que celui du reste de l'année tandis que se déroule la longue saison des pluies et des hautes eaux fluviales;
- au cours de cette dernière saison, toutefois, on remarque une chute des valeurs qui correspond temporellement avec la petite saison sèche et une baisse passagère des eaux en janvier; par contre, durant la courte saison pluvieuse, située au milieu de la longue saison sèche et à peine perceptible dans le climat local, les valeurs de chitinase ne présentent pas de variation quantitative décelable;
- notons enfin une augmentation sensible de ces valeurs en mai à la fin de la grande saison pluvieuse.

2) **Distribution saisonnière de la chitobiase.** — La figure 2 indique les quantités mensuelles de chitobiase. Les variations décrites pour les valeurs de la chitinase (voir 1) se retrouvent pour celles de la chitobiase avec néanmoins les trois nuances ci-après : (a) il n'y a en moyenne que 2.21 fois plus de chitobiase lors de la grande saison pluvieuse par rapport à la longue saison sèche; (b) la réduction des doses de chitobiase apparaît moins évidente que celle des doses de chitinase à l'occasion de la courte saison sèche; (c) la hausse de chitinase en mai ne s'observe presque pas pour la chitobiase.



DISCUSSION

1) **Propriétés biochimiques des chitinase et chitobiase.** — La chitinase comporte plusieurs principes actifs repérables par électrophorèse (Jeuniaux 1959, 1963). Grâce probablement à cette polyvalence fonctionnelle, elle hydrolyse la chitine non seulement en chitotriose et en chitobiose mais aussi en AG. Les AG directement libérés de la chitine à l'aide de cette enzyme viennent augmenter, lors des dosages de la chitobiase, la quantité d'AG fournie par l'hydrolyse des chitotriose et chitobiose : ceci provoque une surestimation des valeurs de la chitobiase. Cette surestimation s'avère toutefois minime car la proportion d'AG libéré au moyen de la chitinase à partir de la chitine épurée ne dépasse pas 0.9 % (Jeuniaux 1963).

On peut se demander jusqu'à quel point l'action des chitinase et chitobiase est influencée par divers produits du suc hépatopancréatique. Des balayages spectrophotométriques de ce suc ont montré sa nature essentiellement holoprotéique par son absorption à 280 m μ (Yon 1969). La présence d'holoprotéines autres que les enzymes chitinolytiques dans ce suc n'a pas d'action défavorable car elles protègent ces dernières contre l'inactivation après quelques heures d'incubation à 37 °C (Jeuniaux 1963); de plus, la cellulase et l'alginate hépatopancréatique des *Pila* (Franssen et al. 1971) n'ont pas d'effet sur les enzymes chitinolytiques (Jeuniaux 1963). Néanmoins, s'il y en a dans le suc, le lysozyme et les N-acétyl-D- β -glucosaminidases constituent les compétiteurs de la chitinase et de la chitobiase respectivement; mais ces dernières ayant vis-à-vis de leur substrat spécifique des activités 2 000 et 5 000 fois supérieures à celles de leurs compétiteurs, les effets de ceux-ci deviennent négligeables (Jeuniaux 1963). Quant aux ions, Jeuniaux constata qu'ils n'influencent pas significativement l'action des enzymes chitinolytiques, excepté les ions Cu⁺⁺ et Hg⁺⁺ dont l'effet inhibiteur fut annulé (voir Méthodes).

2) **Rapport chitobiase/chitinase.** — En analysant les valeurs qui ont servi à établir nos quatre graphiques, les évolutions suivantes apparaissent : (i) les doses de chitinase et de chitobiase augmentent ou diminuent ensemble mais à des degrés différents (*fig. 1* et *2*); (ii) la quantité de chitinase, en effet, varie beaucoup en peu de temps tandis que celle de chitobiase change moins et plus lentement (*fig. 1* et *2*); (iii) conséquemment, le rapport chitobiase/chitinase s'élève lorsque les valeurs de ces deux enzymes diminuent et vice versa (*fig. 3*). Il en ressort finalement (*fig. 4*) que la dose de chitobiase est en relation, entre certains seuils, avec la dose de chitinase. Cette dépendance quantitative de la chitobiase vis-à-vis de la chitinase nous amène à formuler une hypothèse explicative :

la synthèse de la chitobiase serait réglée par celle de la chitinase au moyen des mécanismes de la régulation biomoléculaire (Watson 1970) dirigeant les synthèses enzymatiques.

3) Rythmicité saisonnière d'activité des enzymes chitinolytiques.

— Dans l'hépatopancréas des *Pila*, les quantités de chitinase (fig. 1) et de chitobiase (fig. 2) varient en concordance de phase avec les rythmicités saisonnières du climat, du régime des eaux fluviales et des possibilités alimentaires chitiniques. Pour ces gastéropodes au moins, il nous semble évident que la quantité des enzymes chitinolytiques hépatopancréatiques dépend de la quantité de chitine dans le milieu de vie et que celle-ci règle probablement l'élaboration de celles-là. Dans ces conditions, dans leur milieu expérimental sans chitine (voir Méthodes), les *Pila* auraient dû avoir peu d'enzymes chitinolytiques hépatopancréatiques. Or, c'est le contraire qu'on observa pendant la longue saison pluvieuse. Expliquer ce fait par un séjour trop court de ces invertébrés dans le milieu privé de chitine ne tient pas : en effet, lors des passages entre une saison riche en alimentation chitinique et une saison pauvre en celle-ci, deux semaines suffisaient à faire tomber les doses enzymatiques (fig. 1 et 2). Il faut plutôt s'orienter vers l'explication suivante : la rythmicité saisonnière climatique du régime des eaux, agissant via les possibilités de nutrition chitinique, a engendré une rythmicité saisonnière d'activité chitinolytique dans le métabolisme basal des *Pila*. Bien que nous n'ayons pas encore vérifié si cette rythmicité s'avère endogène, elle répond néanmoins aux caractéristiques des rythmes biologiques saisonniers inscrits dans le comportement animal (Sollberger 1965). Dans le même ordre d'idée, on pourrait associer la hausse de chitinase en mai avec le besoin d'un surcroît d'énergie alimentaire lié à l'élaboration de réserves en vue de la longue saison sèche.

CONCLUSION

Dans le complexe chitinolytique hépatopancréatique des *Pila leopoldvillensis* Putz., la quantité élaborée de chitobiase est en relation avec celle de la chitinase.

Ces quantités d'enzymes chitinolytiques élaborées suivent une rythmicité saisonnière concomitante avec celle du climat local, du régime des eaux de l'habitat de ces gastéropodes et de ses possibilités en alimentation chitinique.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le professeur F. ELLIOTT, de l'Université Nationale du Zaïre qui, par ses observations préliminaires sur l'activité chitinolytique des *Pila leopoldvillensis* Putz., a débuté cette recherche, qui s'est poursuivie à Kinshasa et à Boma, ainsi que M. André PARENT qui a tracé nos graphiques.