

DIGESTION DE L'ACIDE ALGINIQUE CHEZ LES INVERTÉBRÉS

par

J. Franssen (1) et Ch. Jeuniaux (2)

Institut Léon Fredericq, Biochimie, Université de Liège.

Résumé

L'alginase, polysaccharidase catalysant spécifiquement l'hydrolyse de l'acide alginique, a été recherchée dans les organes du système digestif de toute une série d'Invertébrés, par viscosimétrie et par dosage des produits d'hydrolyse. Elle a été décelée chez l'Annélide *Arenicola marina* L., chez certains Echinodermes (*Psammechinus miliaris* Gm. et *Holothuria forskali* della Chiaje), dans le style cristallin du Lamellibranche *Tapes decussatus* L., et chez tous les Mollusques Gastéropodes (13 espèces) examinés à ce point de vue.

L'alginase semble un constituant permanent de l'arsenal enzymatique digestif des Mollusques Gastéropodes, car elle est sécrétée non seulement par des Gastéropodes marins phytophages, qui se nourrissent d'algues brunes riches en acide alginique, mais également par des espèces marines carnivores et par des espèces phytophages dulcicoles ou terrestres. Toutefois, il semble exister une corrélation entre la nature de l'alimentation et la quantité d'alginase sécrétée.

Le pH optimum des alginases étudiées est généralement compris entre 7,2 et 7,8.

L'acide alginique est un haut polymère d'acides uroniques, principalement mannuroniques et guluroniques (Fischer et Dörfel, 1955). Il remplace la cellulose en tant que polysaccharide de structure chez les algues brunes (Phaeophycées). Cette substance constitue donc, en fait, une partie importante de la nourriture de nombreux animaux marins phytophages. La présence d'une alginase dans l'arsenal enzymatique digestif n'a cependant été démontrée que chez quelques espèces d'Invertébrés ; d'autre part, cet enzyme est élaboré par diverses espèces de bactéries, notamment d'origine marine.

Chez les Invertébrés, la présence d'alginase n'a été signalée jusqu'à présent que chez des Mollusques et des Echinodermes. Hashimoto et Onoma (1949) en signalent la présence dans la glande digestive d'un Lamellibranche, *Teredo* sp. Chez un Amphineure, *Cryptochiton stelleri*, l'existence d'une alginase a été établie par Meeuse et Fluegel (1958), bien que Huang et Giese (1949) n'aient pu déceler cet enzyme chez cette même espèce. Parmi les Gastéropodes, quatre espèces seraient capables de digérer l'acide alginique : il s'agit d'*Haliothis giganteus* (Oshima, 1931), de *Tegula funeralis* (Galli et Giese, 1959), d'*Aplysia* sp. (Miwa, 1940) et de *Dolabella scapula*

(1) Adresse actuelle : Laboratoire de Zoologie, Université de Lovanium, République du Congo.

(2) Bénéficiaire d'un Crédit aux Chercheurs du Fonds National Belge de la Recherche Scientifique.

(Hashimoto et Onoma, 1949 ; Hashimoto, Matsumoto et Hibya, 1950). Deux oursins seraient également capables de sécréter cet enzyme : *Strongylocentrotus purpuratus* (Eppley et Lasker, 1959 ; Lasker et Boolotian, 1960) et *Sphaerechinus pulcherrimus* (Oshima, 1931).

Il apparaît donc que les seuls animaux chez lesquels on a décelé de l'alginate sont des mangeurs d'algues brunes et on pourrait être tenté de considérer que la biosynthèse de cet enzyme constitue un caractère biochimique adaptatif, en corrélation avec la nature de l'alimentation. Toutefois, l'absence d'informations relatives à la digestion de l'acide alginique chez certains animaux, ne signifie pas nécessairement que l'alginate manque dans l'équipement enzymatique digestif de ceux-ci. Exception faite du cas d'un requin et du crabe *Puggetia producta* (Kooiman, 1954 ; Huang et Giese, 1948) où le manque d'alginate dans les sucs digestifs a été démontré, on ne possède en effet pas de preuves de ce que la sécrétion d'alginate est une propriété exclusive des Mollusques et des Echinodermes brouteurs d'algues brunes.

Le but du présent travail est de déterminer dans quelle mesure la présence d'alginate dans l'équipement enzymatique digestif des animaux est liée à la nature de leur alimentation. Il est consacré à la recherche de l'alginate par différentes méthodes dans les sucs digestifs et les extraits des glandes annexes du tube digestif, chez toute une série d'Invertébrés marins, dulcicoles ou terrestres, phytophages ou non.

I^o MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Préparation des extraits enzymatiques.

Le matériel biologique a été récolté à la Station Biologique de Roscoff (Finistère) et à celle de Wimereux (Pas-de-Calais).

Les organes, prélevés sur des animaux anesthésiés par le froid, ont été lavés dans du liquide physiologique, essorés, pesés (poids frais) puis broyés au mortier en présence de sable lavé, ou homogénéisés au Potter. Par addition d'eau bidistillée, les homogénats ont été amenés à un volume tel que la proportion de tissus frais soit comprise entre 50 et 150 mg par ml de suspension. Une station de 24 heures en glacière (+ 1° C) a permis l'extraction et la diffusion des enzymes. Après centrifugation, les liquides surnageants sont utilisés comme solution enzymatique. Les extraits ont été conservés dans le compartiment Freezer d'un frigidaire jusqu'au moment de leur utilisation. Les délais avant les dosages n'ont pas excédé 6 mois.

B. Dosage des alginases.

Dans une publication précédente (Franssen et Jeuniaux, 1964), nous avons défini les conditions d'utilisation d'une méthode viscosimétrique dans le cas particulier de l'étude d'une alginase d'origine microbienne. Cette même méthode a été systématiquement utilisée au cours du présent travail. Elle consiste à mesurer, au moyen d'un viscosimètre de Hoeppeler, la diminution de viscosité d'une solution d'alginate sodique au cours d'une incubation à 30° C. Les résultats sont exprimés en unités alginolytiques par ml de solution enzymatique ou par g de tissus, l'unité alginolytique étant définie comme corres-

pondant à la quantité d'enzyme nécessaire pour provoquer une diminution de viscosité qui, exprimée par la variation de fluidité spécifique en fonction de la durée d'incubation, pendant les 30 premières minutes d'incubation à 30° C et au pH optimum, est représentée par une fonction linéaire $y = ax + b$ dont le coefficient angulaire a une valeur de 0.1. Le milieu réactionnel contient de l'alginate de soude (conc. finale : 0.1 p. 100), un tampon de phosphates ou tris - HCl (conc. finale 0.1 M) au pH optimum de l'enzyme et la solution enzymatique étudiée (volume total du milieu réactionnel : 40 ml). C'est également au moyen de cette méthode, que nous avons établi, dans le présent travail, les courbes d'activité des alginases en fonction du pH.

D'autre part, l'acide alginique étant constitué d'acides uroniques (mannuronique et guluronique) possédant une fonction réductrice et une fonction acide, nous avons également mesuré quantitativement la libération de ces acides uroniques après incubation d'acide alginique ou d'alginate de soude en présence des extraits enzymatiques.

Nous avons utilisé la méthode de Somogyi (1952) pour le dosage du pouvoir réducteur, et la méthode de Maughan *et al.* (1938) pour la mesure des acides uroniques libérés. Ces deux méthodes présentent l'avantage de doser les substances libérées par les différents enzymes intervenant au cours de l'hydrolyse enzymatique. D'autre part, elles peuvent servir à confirmer les résultats obtenus par la méthode viscosimétrique. Cependant, elles présentent le désavantage de nécessiter des activités enzymatiques élevées, de même que des durées d'incubation relativement longues.

1^o Dosage du pouvoir réducteur par la méthode de Somogyi.

Le réactif de Somogyi (1952) est moins alcalin que celui de Fehling du fait qu'il contient du bicarbonate de soude à la place de la soude caustique. Il contient en outre du sulfate de soude en solution presque saturée ; celui-ci empêche la réoxydation du cuivre réduit. Le cuivre réduit est employé pour réduire à son tour le réactif arsénomolybdique. On lit la densité optique à la longueur d'onde de 530 m μ (spectrophotomètre de Beckman ou de Zeiss). La coloration bleue obtenue est stable durant 60 minutes environ. Pour des concentrations en glucuronate sodique comprises entre 0 et 200 μ g/ml, la densité optique obéit à la loi de Beer-Lambert.

2^o Dosage des acides uroniques par la méthode de Maughan, Kenneth et Browne (1938).

Les acides uroniques traités par l'acide chlorhydrique concentré (6 N) à chaud, donnent du furfural et du gaz carbonique. Ce furfural donne une réaction de coloration caractéristique avec le naphtorésorcinol. Cette réaction n'est cependant pas spécifique des acides hexuroniques (Maughan *et al.*, 1938).

A 1 ml de la solution contenant l'échantillon à doser, on ajoute 1 ml de HCl 6 N et 1 ml de naphtorésorcinol à 0,2 p. 100 dissous dans de l'eau bidistillée. Les tubes sont portés au bain-marie à 100° C pendant 30 minutes puis refroidis dans de l'eau glacée. A chaque tube,

1 ml d'alcool éthylique absolu et 6 ml d'éther éthylique chimiquement pur sont ajoutés afin d'extraire les produits de la réaction colorée. Les tubes sont alors agités vigoureusement pendant 30 secondes. Les lectures se font au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 565 m μ .

La réaction colorimétrique obéit à la loi de Beer-Lambert pour des concentrations en acides hexuroniques n'excédant pas 150 μ g/ml.

3° Dosage de l'activité alginolytique par mesure des sucres uroniques libérés.

Employant de l'alginate sodique à 0,1 p. 100 pour les mesures de l'activité alginolytique par viscosimétrie, nous avons conservé ce substrat pour les dosages chimiques.

Le milieu réactionnel se compose de : 10 ml de solution d'alginate sodique à 0,4 p. 100, de 1 à 4 ml de solution enzymatique, de 4 ml de tampon « tris » ou KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 M ; et d'eau bidistillée (volume total : 40 ml).

Le dosage du pouvoir réducteur des uronides peut être effectué en présence du substrat. Par contre, le dosage, par la méthode de Maughan *et al.*, des acides uroniques libérés lors de l'hydrolyse enzymatique n'est possible qu'après précipitation du substrat. Celle-ci peut être obtenue de façon complète par addition d'un volume égal de chlorure de calcium à 10 p. 100. Le sel calcique de l'acide alginique est tout à fait insoluble et peut être facilement séparé du liquide surnageant par centrifugation. Des témoins sans substrat et des témoins sans enzyme ont été menés parallèlement à chaque test enzymatique.

Au temps 0 (mise en présence de l'enzyme et des autres réactifs), puis après 1, 2, 4, 6 et 8 heures d'incubation à 30° C, on prélève 5 ml de milieu réactionnel. Cette quantité est pipettée dans un tube à centrifuguer. On couvre d'un capuchon de verre et on porte aussitôt au bain-marie à 100° C, pendant 15 minutes, afin d'obtenir une inactivation complète de l'enzyme et la précipitation d'une partie des protéines. Le capuchon de verre assure une étanchéité suffisante pour éviter toute variation sensible de volume par évaporation. Après refroidissement, la solution inactivée est centrifugée (2.500 tours/minute pendant 5 minutes).

Deux prélèvements sont ensuite effectués :

a) un premier volume de 1 ml est porté dans des tubes jaugés à 10 ml et destiné au dosage du pouvoir réducteur, par la méthode de Somogyi (voir ci-dessus) ;

b) un second prélèvement de 2 ml est pipetté dans deux ml de chlorure de calcium à 10 p. 100 contenu dans un tube à centrifuguer. La solution est agitée vigoureusement pendant 2 minutes puis centrifugée pendant 20 minutes à 15.000 tours/minute. On dose les acides uroniques par la méthode de Maughan *et al.* (naphtorésorcinol) dans le liquide surnageant.

La faible quantité de solution enzymatique utilisée et la précipitation partielle des protéines par la chaleur permet d'éviter une déprotéinisation préalable. Comme dans le cas du dosage du pouvoir réducteur, la courbe étalon est établie au moyen de glucuronate sodique.

2^e RÉSULTATS

Les activités alginolytiques des extraits aqueux ont été mesurées par viscosimétrie. Les résultats obtenus, au cours des 30 premières minutes d'incubation à 30° C, sont soit exprimés en variation de fluidité spécifique du substrat par unité de temps ($\frac{\Delta \Phi_{sp}}{\Delta t}$) soit convertis en Unités alginolytiques (U.A.) par g de tissus frais, en utilisant les valeurs obtenues au pH optimum (voir méthodes).

Le substrat a été tamponné au moyen d'une solution de tampon tris-hydroxy-méthylaminométhane (conc. finale : 0,1 M). Les valeurs de pH renseignées sont les valeurs réelles mesurées au moyen d'un pH-mètre Beckman Zéromatic, après incubation en présence de l'extrait enzymatique. Toutes les incubations furent effectuées à 30° C \pm 0,5° C.

Les résultats des dosages du pouvoir réducteur et des acides uroniques libérés dans le milieu réactionnel au cours des 8 premières heures d'incubation à 30° C sont exprimés en μ g de glucuronate sodique par ml de milieu réactionnel.

A. Recherche de l'alginate chez divers Invertébrés marins, Mollusques et Echinodermes exclus.

Les résultats obtenus pour les Invertébrés autres que les Mollusques et les Echinodermes, sont regroupés dans le tableau 1.

Pour chaque espèce étudiée, nous avons indiqué l'origine des extraits enzymatiques, la quantité de tissus (en poids frais) homogénéisés à partir desquels on a préparé l'extrait enzymatique incorporé au milieu réactionnel, le pH auquel les tests enzymatiques ont été effectués et les résultats obtenus (méthode viscosimétrique).

B. Echinodermes.

Nous avons recherché l'alginate dans le système digestif de quelques Echinodermes appartenant aux ordres des Stellérides, Echinides et Holothurides.

1) *Marthasterias glacialis* L. (Stelléride).

Les broyats de caecums pyloriques (195 mg poids frais/ml) n'ont montré aucune activité alginolytique aux pH 6,5 et 7,5, à la concentration de 1 ml d'extrait par essai viscosimétrique.

2) *Psammechinus miliaris* Gm. (Echinide).

Les individus utilisés étaient à jeun en aquarium. Des extraits des courbures inférieure (100 mg poids frais/ml) et supérieure (90 mg poids frais/ml) du tube digestif furent utilisés pour le dosage viscosimétrique. La valeur du pH optimum se situe aux environs de 7,9

TABLEAU 1
Distribution de l'alginase chez des Invertébrés autres que les Mollusques et Echinodermes

CLASSIFICATION		EXTRAITS ENZYMATIQUES		VISCOSIMETRIE		
	ESPÈCES	NATURE	CONC. (1)	pH d'incubation	Durée d'incubation à 30° C (en minutes)	Résultats : U. A./gm d'extract
Protozoaires (Foraminifères)	<i>Miliolina seminulum</i> L.	Extrait total (2).....	130 mg	6,5 et 7,5	50	0
Porifères	<i>Ficulina ficus</i> L.	Extrait total	370 mg	6,5 et 7,5	60	0
Cnidaires	<i>Anemonia sulcata</i> Penn. <i>Adamsia palliata</i> Boh.	Gastroderme	125 mg	7,5	60	0
Plathelminthes (Turbellariés)	<i>Planaria gonocephala</i> Dugés.	Extrait total	85 mg	6,5 et 7,5	30	0
Némertiens	<i>Linneus longissimus</i> Sowerby.	Tube digestif	74 mg	6,5 et 7,5	30	0
Brachiopodes	<i>Terebratulina caput-serpentis</i> L.	Tube digestif	9,1 mg	7,8	30	0
Annélides	<i>Nephthys hombergi</i> Aud.	Tube digestif	47 mg	6,4 - 7,2 - 8,5	30	0
Polychètes	<i>Perinereis cultrifera</i> Gr. <i>Spirographis spallanzanii</i> Viviani.	Tube digestif	50 mg	6,4 et 7,8	30	0
	<i>Arenicola marina</i> L.	2/3 ant. du tube digestif	50-100 mg	6,5 et 7,8	30	0
		Intestin	87 mg	7,8	30	1,68 U.A.
		Estomac et glande de Morren	121 mg	7,6	30	0,66 U.A.
Oligochètes	<i>Lumbricus</i> spp.	Tube digestif	100 mg	6,9 et 7,5	30	0
Arthropodes	<i>Androctonus australis</i> L. <i>Homarus vulgaris</i> L.	Hépatopancréas	62 mg	6,5 et 7,5	30	0
	<i>Bombyx mori</i> L. (dernier âge larvaire)	Hépatopancréas	100 mg	6,4 et 7,5	30	0
		Tube digestif	108 mg	6,4 et 7,5	30	0
		Tube digestif	146 mg	6,5 et 7,5	30	0

(1) Quantité de tissus homogénéisés à partir desquels la quantité d'extrait enzymatique incorporé au milieu réactionnel a été préparée.

(2) Y compris le test calcaire.

(fig. 13). Pour cette valeur de pH, les activités alginolytiques sont de 0,36 U.A./g de tissus pour la muqueuse de la courbure inférieure du tube digestif et de 0,55 U.A./g de tissus pour la muqueuse de la courbure supérieure.

3) *Parencentrotus lividus* Lomk. (Echinide).

Nous n'avons observé aucune activité alginolytique dans les extraits aqueux de muqueuses de la courbure supérieure du tube digestif (158 mg poids frais/ml), utilisés à raison de 0,5 ml d'extrait par essai.

4) *Cucumaria lefevrei* Barrois (Holothuride).

A pH 7,5, les extraits de tubes digestifs (muqueuse et contenu : 100 mg poids frais/ml) n'ont manifesté aucune activité alginolytique (1 ml d'extrait par essai viscosimétrique).

5) *Holothuria forskali della* Chiaje (Holothuride).

Un extrait enzymatique constitué d'un broyat de contenus intestinaux, non dilué, fut utilisé pour un dosage viscosimétrique à pH 7,3. Cet extrait manifesta une activité alginolytique nette, de l'ordre de 1 Unité alginolytique par g de contenus intestinaux.

C. Mollusques.

I. — LAMELLIBRANCHES

Gryphaea angulata Lamarck.

Par la méthode viscosimétrique, en utilisant 42 mg de broyat de tube digestif par essai, à pH 7,2 et 7,8, nous n'avons pas pu déceler la présence d'alginate, après 30 minutes d'incubation. Remarquons toutefois que les animaux ayant servi à cette expérience furent achetés sur le marché public et étaient donc à jeun depuis plusieurs jours.

Tapes decussatus L.

Dans l'hépatopancréas et dans le style cristallin, nous avons pu déceler la présence d'alginate par la méthode viscosimétrique. L'extrait aqueux d'hépatopancréas a manifesté à pH 7,9 une activité alginolytique égale à 0,66 U.A./g de tissus, tandis que l'extrait de style cristallin a manifesté à pH 7,9 une activité égale à 2,16 U.A./g de styles (poids frais).

II. — GASTÉROPODES

1. Prosobranches

Gibbula umbilicalis da Costa.

Un extrait d'hépatopancréas (100 mg/ml) réduit la viscosité des solutions d'alginate sodique ; l'activité est maximum à pH 8,1 (fig. 1). La teneur en alginate est de 16,4 U.A./g de tissus.

Cette réduction de viscosité s'accompagne d'une libération de sucres uroniques à partir du substrat (fig. 2 et 3). La différence dans la quantité de sucres uroniques, libérés au cours de l'incubation

enzymatique, que l'on constate en comparant les résultats fournis par la méthode de Somogyi (qui ne décèle que le groupement réducteur libre) et celle de Maughan *et al.* (qui dose les unités uroniques) suggère que l'alginate hydrolyse principalement l'alginate en oligouronides.

L'activité des contenus du tube digestif est beaucoup plus faible. Mesurée au pH 8,1, elle montre une teneur en alginase égale à 0,52 U.A./g de contenus.

Patella vulgata L.

Nous avons dosé l'alginate dans des broyats d'hépatopancréas (100 mg/ml) et de tube digestif (muqueuse et contenu : 100 mg/ml).

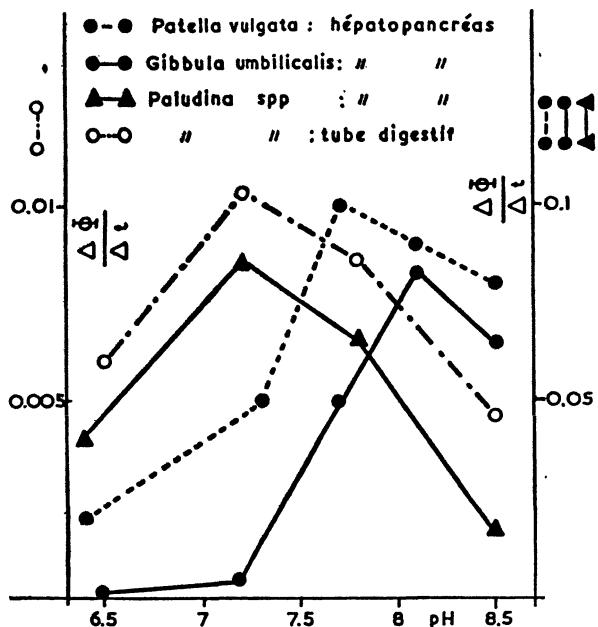


FIG. 1
Activité alginolytique en fonction du pH des extraits d'hépatopancréas de *Patella vulgata* L., *Gibbula umbilicalis* da Costa, et *Paludina* sp. et d'un extrait de tube digestif de *Paludina* sp.

Les extraits d'hépatopancréas montrent (fig. 1), par viscosimétrie, une activité maximum aux environs du pH 7,7. La teneur en alginase est de 20 U.A./g de tissus frais.

Au cours d'une incubation enzymatique (5 mg/ml final) à pH 7,9 en présence d'un même extrait d'hépatopancréas, nous avons obtenu une libération de sucres uroniques à partir de l'alginate de soude (fig. 2 et 3).

Les extraits provenant du tube digestif sont beaucoup moins actifs. La teneur en alginase y est, à pH 8,1, voisine de 2 U.A./g.

Paludina sp.

Ces Paludines originaires de la République du Congo, se reproduisent fort bien en aquarium d'eau douce, à 25° C.

Les extraits aqueux d'hépatopancréas (160 mg/ml) montrent une activité alginolytique maximum aux environs du pH 7,2 (fig. 1). La teneur en alginase est de 20 U.A./g de tissus.

Au cours d'une incubation enzymatique à 30° C et à pH 7,2 (6,5 mg d'hépatopancréas/ml de milieu réactionnel), nous avons obtenu une libération d'acides uroniques (fig. 3).

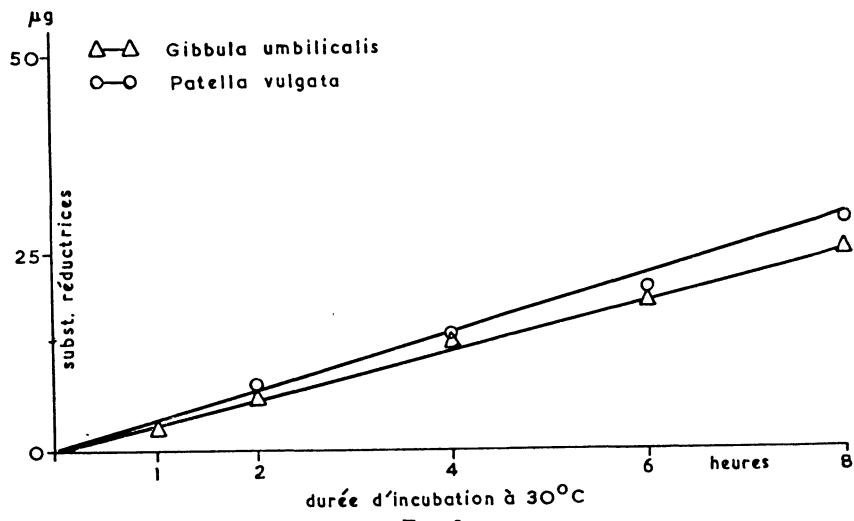


FIG. 2

Libération de sucres uroniques à partir d'alginate de sodium sous l'effet des extraits aqueux d'hépatopancréas de *Gibbula umbilicalis* da Costa et de *Patella vulgata* L. (mesure du pouvoir réducteur des sucres uroniques libérés en µg de glucuronate/ml de milieu réactionnel).

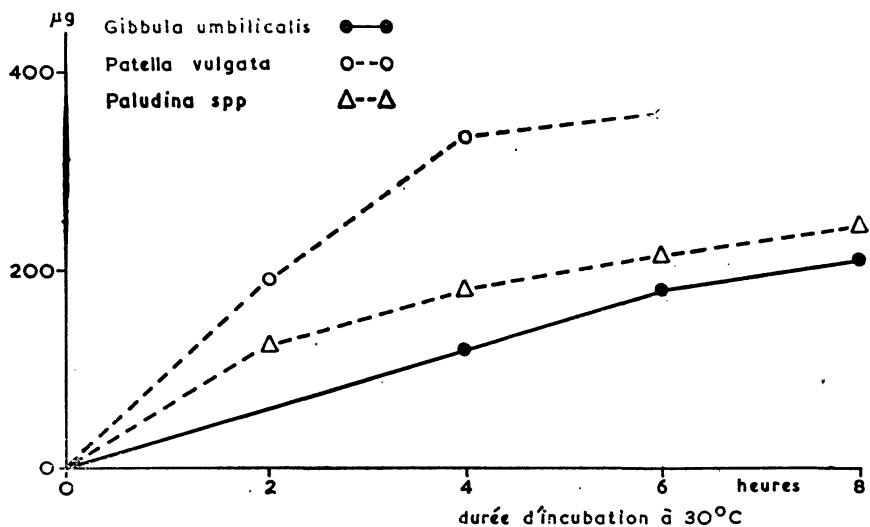


FIG. 3

Libération de sucres uroniques à partir de l'alginate de sodium sous l'effet des extraits aqueux d'hépatopancréas de *Gibbula umbilicalis* da Costa, *Patella vulgata* et *Paludina* sp. (acides uroniques en µg de glucuronate/ml de milieu réactionnel).

Les broyats de tube digestif montrent également une activité enzymatique aux environs de pH 7,2. Cette activité correspond à 0,59 U.A./g d'extrait (fig. 1).

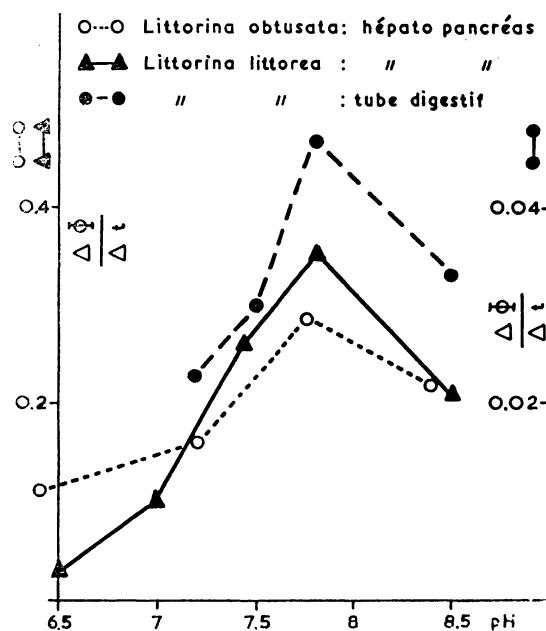


FIG. 4

Activité en fonction du pH, des extraits aqueux d'hépatopanréas de *Littorina littorea* L. et *Littorina obtusata* et du tube digestif de *Littorina littorea*.

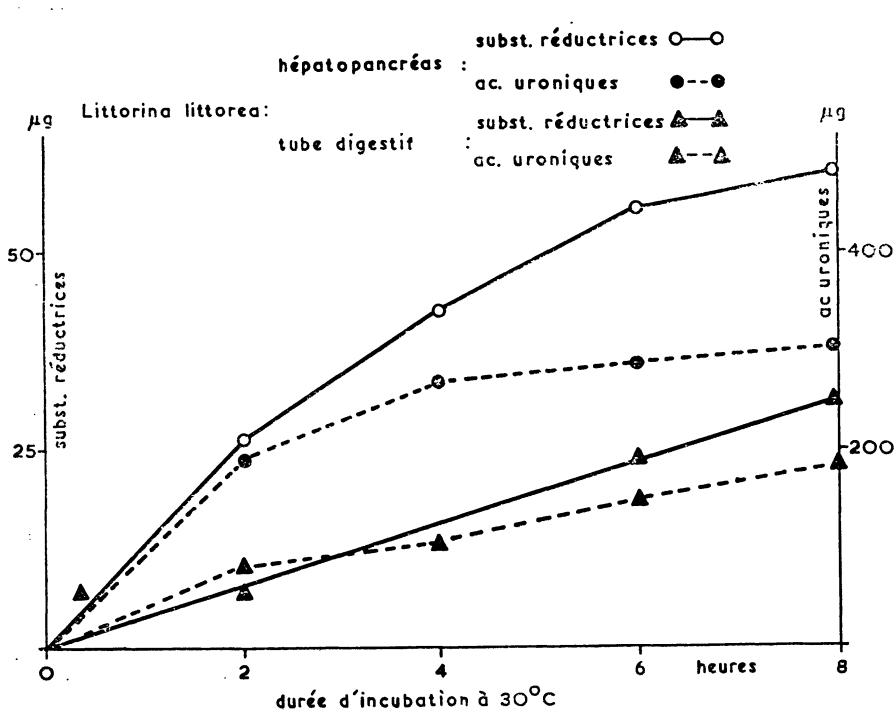


FIG. 5

Libération de sucres uroniques à partir d'alginate de sodium sous l'effet des extraits aqueux d'hépatopanréas et de tube digestif de *Littorina littorea* L. (mesure des substances réductrices et des acides uroniques libérés, en μg de glucuronate/ml de milieu réactionnel).

Littorina littorea L.

Les broyats d'hépatopancréas (50 mg/ml) manifestent une activité alginolytique maximum à pH 7,8 (fig. 4) correspondant à 72 U.A./g de tissus frais.

Les broyats de tubes digestifs (41 mg poids frais/ml) montrent une activité enzymatique plus faible ; au pH optimum de 7,8 (fig. 4), leur activité correspond à 11,4 U.A./g d'extrait.

Nous avons pu également mettre en évidence l'action de l'uginase de ces deux extraits en mesurant l'augmentation du pouvoir réducteur et la libération de sucres uroniques à pH 7,8 (cf. fig. 5 : concentration des extraits enzymatiques : 100 mg d'hépatopancréas ou 82 mg de contenus du tube digestif pour 40 ml de milieu réactionnel).

Littorina obtusata L.

Les extraits d'hépatopancréas (50 mg poids frais/ml), provenant d'animaux nourris d'algues brunes en aquarium, montrent une activité alginolytique maximum à pH 7,7 (fig. 4), correspondant à 70 U.A./g de tissus.

Au cours d'une incubation de 8 h à pH 7,8 et à 30° C (100 mg d'extrait/ml de milieu réactionnel), nous avons constaté la libération de sucres uroniques (fig. 6).

Littorina saxatilis Olivi.

Les extraits d'hépatopancréas (125 mg/ml) montrent à pH 7,8 une activité alginolytique correspondant à 20,3 U.A./g de tissus.

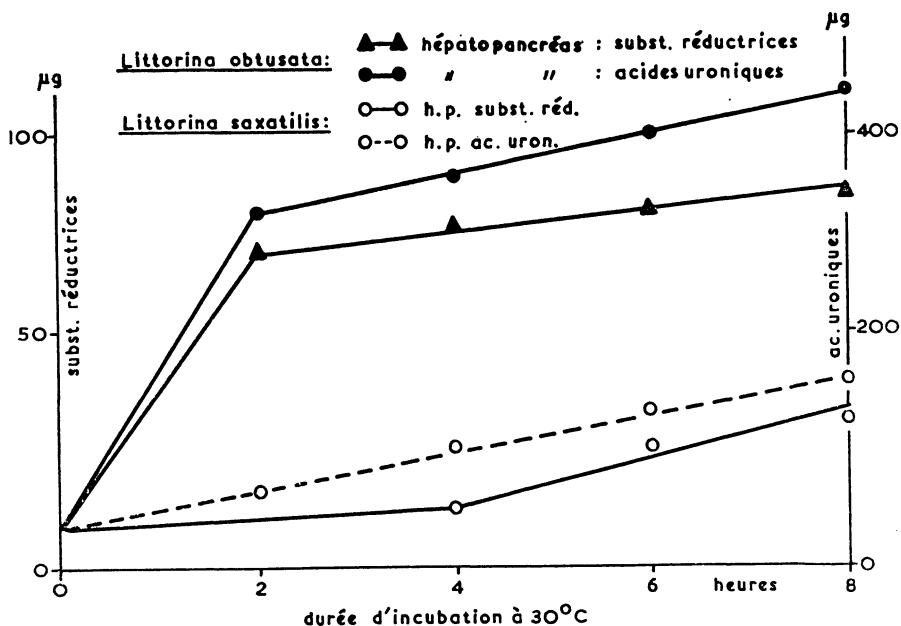


FIG. 6

Libération des sucres uroniques à partir d'alginate sous l'effet des extraits aqueux d'hépatopancréas de *Littorina obtusata* L. et de *Littorina saxatilis* L. (mesure des substances réductrices et des acides uroniques libérés, en µg de glucuronate/ml de milieu réactionnel).

Le pouvoir réducteur des oligo-uronides libérés dans le milieu réactionnel (pH 7,8) par 1 ml d'extrait enzymatique après 8 h d'incubation à 30° C correspond à celui de 15,6 µg de glucuronate de sodium par ml de milieu réactionnel (fig. 6). Les acides mono-uroniques, libérés à partir de ces oligo-uronides par hydrolyse acide correspondent à 150 µg de glucuronate par ml de milieu réactionnel (fig. 6).

Purpura lapillus L.

Les broyats d'hépatopancréas (100 mg/ml) d'animaux nourris en aquarium, ne contenaient que peu d'alginase. Celle-ci dosée par

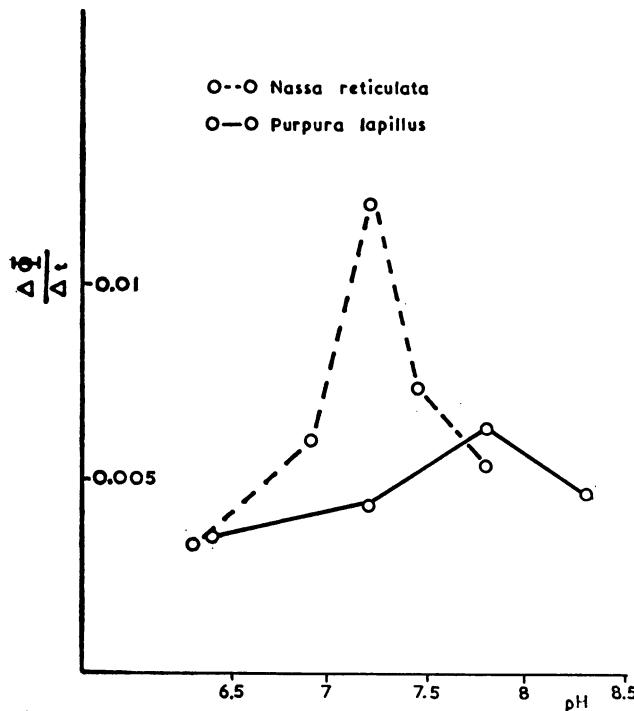


FIG. 7
Activité alginolytique, en fonction du pH, des extraits aqueux d'hépatopancréas de *Nassa reticulata* L. et de *Purpura lapillus* L.

viscosimétrie a montré une activité maximum à pH 7,8, correspondant à 1,26 U.A./g de tissus (fig. 7).

D'autre part, l'activité alginolytique des extraits aqueux de tubes digestifs (muqueuses et contenus : 100 mg poids frais/ml) est, à pH 7,8, égale à 0,92 U.A./g d'organes.

Nassa reticulata L.

Les extraits aqueux d'hépatopancréas (100 mg poids frais/ml) manifestent une activité alginolytique maximum à pH 7,2 (fig. 7) correspondant à 1,2 U.A./g de tissus.

De l'alginate de sodium, incubé pendant 8 h à 30° C en présence d'extrait d'hépatopancréas (conc. finale de l'extrait : 5 mg/ml) a libéré dans le milieu réactionnel 40 µg d'oligo-uronides par ml, dosés comme glucuronate après hydrolyse acide (fig. 8).

L'extrait enzymatique réalisé à partir du tube digestif (56 mg poids frais/ml) et dosé par viscosimétrie, a manifesté après 30 minutes

d'incubation à pH 7,2, une activité alginolytique égale à 0,167 U.A./g d'extrait.

2. Pulmonés

Limnaea limosa L.

Nous avons préparé des extraits aqueux d'hépatopancréas (148 mg poids frais/ml) et de tubes digestifs (muqueuse et contenu : 100 mg poids frais par ml) de Limnées récoltées dans un étang et nourries en aquarium de plantes vertes (*Elodea canadensis* et *Lemna minor*).

Bien que ces animaux ne se nourrissent pas d'algues brunes et que l'acide alginique n'entre pas dans la constitution chimique des plantes citées ci-dessus, les extraits d'hépatopancréas et de tube digestif contiennent de l'alginase. L'activité alginolytique est maximum

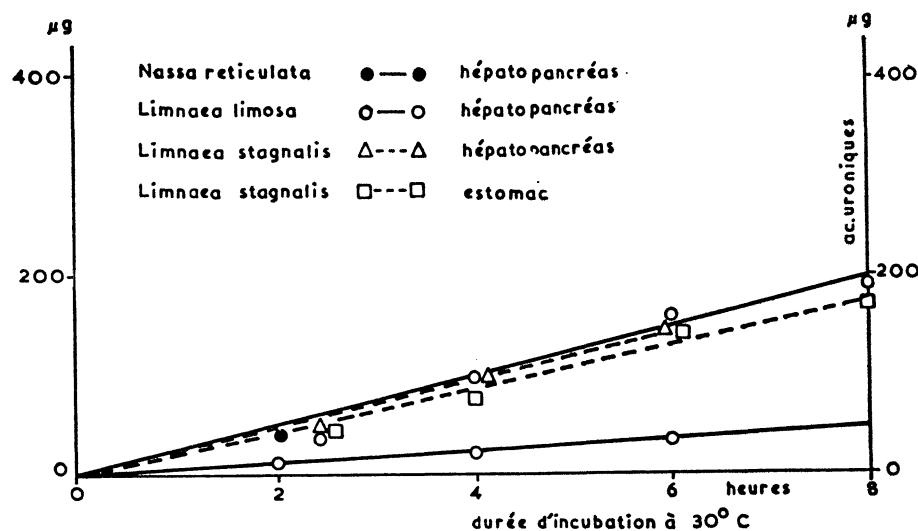


FIG. 8

Libération de sucres uroniques à partir d'alginate sous l'effet des extraits aqueux d'hépatopancréas de *Nassa reticulata* L., *Limnaea limosa* L. et *Limnaea stagnalis* L. (acides uroniques libérés en µg de glucuronate/ml de milieu réactionnel).

à pH 7,8 et correspond à 2,43 U.A./g d'hépatopancréas et à 0,66 U.A./g de tubes digestifs (fig. 9).

De l'alginate de soude incubé pendant 8 heures à pH 7,8 en présence de 2 ml d'extrait d'hépatopancréas pour 40 ml de milieu réactionnel a libéré 185 µg d'acides uroniques dosés comme glucuronate de soude par ml de milieu réactionnel (fig. 8).

Limnaea stagnalis L.

Ces animaux ont été nourris en aquarium d'*Elodea canadensis* et de *Lemna minor*. Comme dans le cas de l'espèce précédente, nous avons trouvé de l'alginase dans des extraits aqueux d'hépatopancréas (200 mg poids frais/ml), du contenu de l'estomac (194 mg poids frais/ml) et de l'intestin (muqueuse et contenu : 225 mg poids frais/ml).

L'activité alginolytique est maximum à pH 7,8 (fig. 10) et corres-

pond à 1,6 U.A./g de tissus pour l'hépatopancréas, à 0,51 U.A./g pour le tube digestif et à 2,06 U.A./g pour le contenu de l'estomac.

Après une incubation de 6 heures en présence de substrat tamponné à pH 7,8, un extrait aqueux d'hépatopancréas (2 ml pour 40 ml de milieu réactionnel) libère 150 µg d'acides uroniques dosés comme glucuronate sodique par ml de milieu réactionnel (fig. 8). Un extrait aqueux d'estomac (2 ml) libère 200 µg d'acides uroniques par ml de milieu réactionnel (8 h. d'incubation à 30° C.).

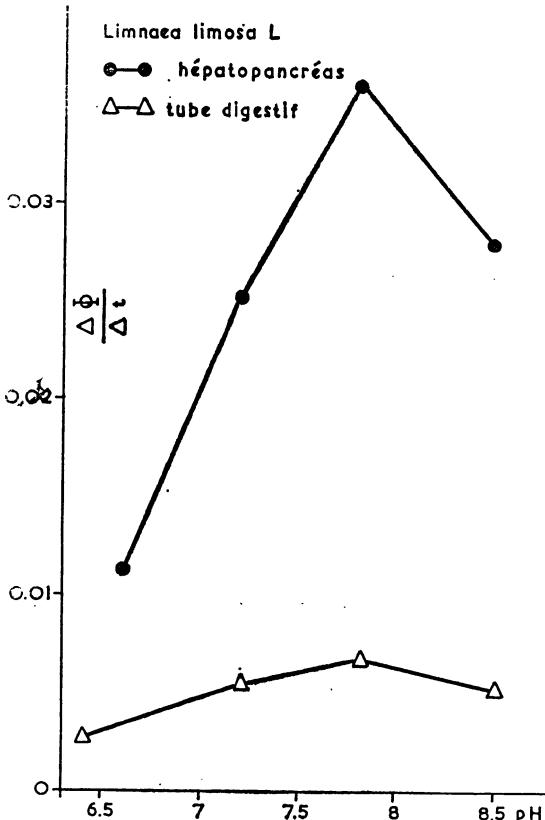


FIG. 9
Activité alginolytique en fonction du pH, des extraits d'hépatopancreas et de tube digestif de *Limnaea limosa* L.

Helix pomatia L.

Contrairement aux observations de Holden et Tracey (1950), nous avons constaté l'existence d'alginate dans les organes du système digestif de l'escargot *Helix pomatia*.

Le contenu de l'estomac (200 mg poids frais/ml) fut utilisé pour des mesures viscosimétriques de l'activité alginolytique en fonction du pH (fig. 11). Le pH optimum de l'alginate d'*Helix pomatia* est situé aux environs de 7,2.

Nous avons dosé également l'alginate des extraits aqueux de la muqueuse de l'estomac, de l'hépatopancréas, de l'intestin (muqueuse et contenu) et des glandes salivaires. Ces dosages ont été effectués par la méthode viscosimétrique. Les conditions expérimentales (pH, concentration des extraits) et les valeurs des activités alginolytiques sont résumées dans le tableau suivant (tableau 2).

TABLEAU 2
Activité alginolytique des extraits enzymatiques de divers organes d'*Helix pomatia* L.

Organes	Concentration des extraits en mg/ml	Valeurs de pH mesurées après l'incubation	Activité alginolytique en U. A./g d'extrait
Hépatopancréas	167 mg/ml	7,3	0.10 U.A.
Estomac (contenu)	200 mg/ml	7,25	0.95 U.A.
Muqueuse de l'estomac ..	100 mg/ml	7,3	0.00 U.A.
Intestin	114 mg/ml	7,5	0.37 U.A.
Glandes salivaires	100 mg/ml	7,2	0.13 U.A.

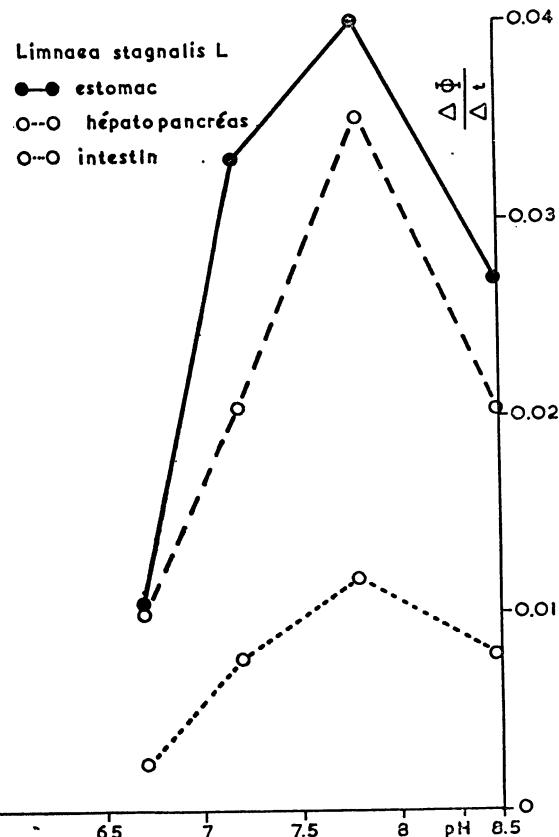


FIG. 10
Activité alginolytique en fonction du pH, des extraits d'hépatopancréas d'intestin et d'estomac de *Limnaea stagnalis* L.

Arion rufus L.

Des extraits d'hépatopancréas (100 mg poids frais/ml), d'estomac (muqueuse et contenu : 100 mg poids frais/ml) et d'intestin (100 mg poids frais/ml) ont manifesté une activité alginolytique égale, à pH 7,5, à 1,10 U.A./g pour le contenu stomacal, 0,93 U.A./g pour le contenu intestinal et 0,86 U.A./g pour l'hépatopancréas.

3. OPISTHOBRANCHES

Aplysia depilans L.

Nous avons utilisé des extraits d'hépatopancréas (concentration : 83 mg poids frais/ml) et de tube digestif (concentration : 15 mg poids frais/ml).

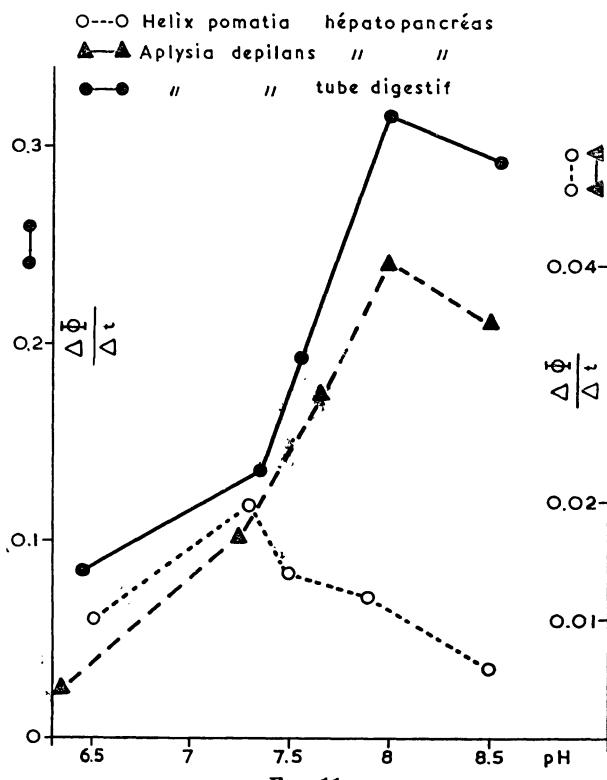


FIG. 11

Activité en fonction du pH des extraits aqueux d'estomac d'*Helix pomatia* L., de tube digestif et d'hépatopancréas de *Aplysia depilans* L.

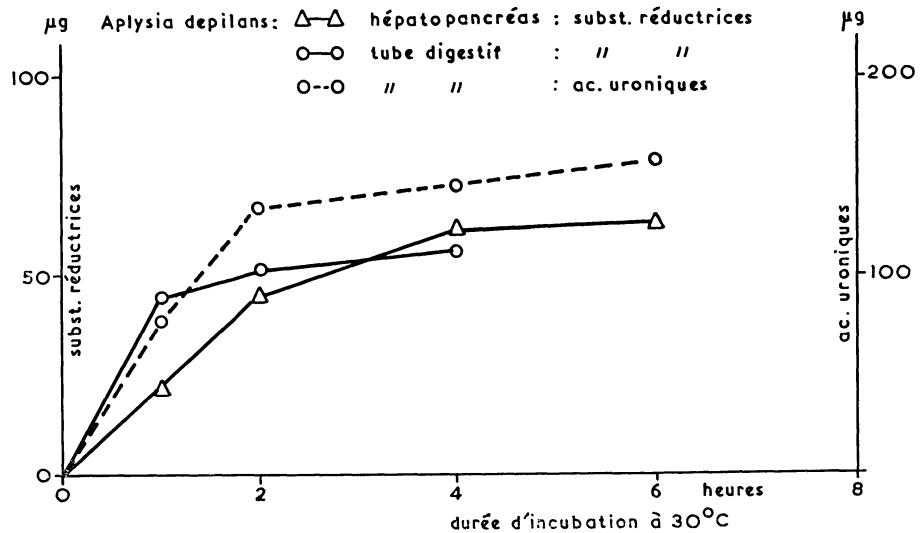


FIG. 12

Libération de sucres uroniques à partir d'alginate sous l'effet des extraits d'hépatopancréas et de tube digestif d'*Aplysia depilans* L. (mesure des substances réductrices et des acides uroniques libérés en µg de glucuronate/ml de milieu réactionnel).

L'activité alginolytique de l'hépatopancréas mesurée en fonction du pH montre une valeur optimum à pH 8, correspondant à 9,6 U.A./g de tissus (fig. 11). Après une incubation de 8 heures à 30° C, en présence de substrat tamponné à pH 8, cet extract enzymatique utilisé à la concentration de 3,10 mg/ml de milieu réactionnel libère 84 µg de sucres réducteurs par ml, dosés comme du glucuronate sodique (fig. 12).

L'activité alginolytique du contenu du tube digestif, mesurée par viscosimétrie en fonction du pH, est maximum à pH 8 et correspond à 420 U.A./g d'extrait (fig. 11).

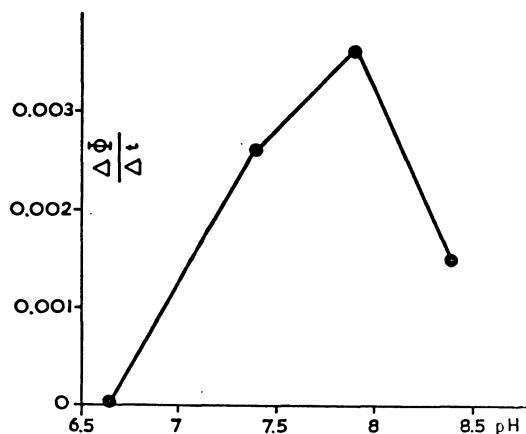


FIG. 13
Activité alginolytique, en fonction du pH, d'un extrait du tube digestif (courbure inférieure) de *Psammechinus miliaris* Gmelin.

Les résultats obtenus par le dosage des sucres uroniques libérés au cours d'une incubation de 8 heures à pH 8 (0,16 mg d'extrait par ml de milieu réactionnel), sont présentés dans la figure 12.

3° DISCUSSION ET CONCLUSIONS

A. Distribution des alginases.

Parmi les Invertébrés que nous avons étudiés, à l'exception des Mollusques et des Echinodermes, la seule espèce chez laquelle nous avons observé la présence d'alginate dans le système digestif est une Annélide Polychète, *Arenicola marina* L.

Chez les Mollusques, toutes les espèces étudiées possèdent cet enzyme, à l'exception peut-être du Lamellibranche *Gryphaea angulata* (1). Nous l'avons également trouvé chez les Echinodermes, non seulement chez des Oursins, où sa présence avait déjà été signalée, mais aussi chez une Holothurie (*Holothuria forskali* della Chiaje) où sa mise en évidence constitue un fait nouveau.

Chez les Mollusques Gastéropodes, l'alginate semble un constituant permanent de l'arsenal enzymatique digestif. En effet, elle est sécrétée

(1) Rappelons toutefois que les individus utilisés furent achetés sur un marché public et se trouvaient à jeun au moment du prélèvement des tissus.

non seulement par les herbivores marins mangeurs d'algues brunes, mais également par des herbivores dulcicoles et terrestres. Jusqu'à présent, sur 12 espèces examinées, nous n'avons rencontré aucune exception. Ces exemples sont à ajouter aux cas de *Tegula funeralis* (Galli et Giese, 1959), d'*Haliotis giganteus* (Oshima, 1931) et de *Dolabella scapula* (Hashimoto et Onoma, 1949), où la présence d'alginase avait déjà été signalée. C'est cependant chez les Gastéropodes marins brouteurs d'algues brunes que l'on relève les activités alginolytiques les plus élevées : chez les Gibbules, Patelles et Littorines, l'activité alginolytique des extraits aqueux de tissus glandulaires du système digestif est comprise entre 16,4 et 72 Unités alginolytiques/g de tissus frais. L'Aplysie (*Aplysia depilans* L.) semble particulièrement bien équipée à ce point de vue, le contenu du tube digestif manifestant une activité alginolytique remarquablement élevée, de l'ordre de 400 Unités/g de contenu.

Les Mollusques marins adaptés à un autre type de nourriture (*Purpura lapillus* et *Nassa reticulata*, plus ou moins carnassiers) sécrètent moins d'alginase : l'activité alginolytique des extraits glandulaires varie entre 0,16 et 1,28 U.A./g de tissus.

Chez les Gastéropodes Pulmonés, dulcicoles ou terrestres (*Limnaea*, *Helix* et *Arion*), l'activité alginolytique des extraits de tissus glandulaires est également beaucoup plus basse que dans le cas des Gastéropodes marins phytophages (entre 0,10 et 2,43 Unités alginolytiques/g de tissus frais). Il semble donc exister une certaine corrélation entre la nature de l'alimentation et l'importance relative de la sécrétion d'alginase chez ces animaux. L'origine marine des Mollusques n'étant guère contestée, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'au départ, l'alginase faisait partie de leur arsenal enzymatique digestif. Au cours de l'adaptation de certaines espèces à un autre mode de nourriture ou de vie, il se serait produit une régression de la sécrétion de certains enzymes, notamment de l'alginase. Chez les Mollusques marins non mangeurs d'algues brunes ainsi que chez les Mollusques dulcicoles ou terrestres, l'abandon d'une nourriture riche en acide alginique se serait accompagné d'une diminution de l'activité des systèmes biosynthétiques conduisant à l'élaboration de l'alginase.

Chez les Mollusques Gastéropodes, dans la plupart des cas, l'activité alginolytique des extraits d'hépatopancréas, exprimée par unité de poids de tissus frais, est nettement plus élevée que celle d'extraits de muqueuses d'estomac ou d'intestin, ou de contenus de ces organes. On peut donc admettre que c'est l'hépatopancréas qui est le siège de la biosynthèse de l'alginase chez les animaux. Soulignons cependant la remarquable exception d'*Aplysia depilans*, où le contenu de l'estomac est, par unité de poids, près de 40 fois plus riche en alginase que l'extrait aqueux d'hépatopancréas.

Chez les Mollusques Lamellibranches, la mise en évidence d'alginase dans des extraits aqueux de style cristallin de *Tapes decussatus* L. mérite d'être soulignée. Le style cristallin apparaît donc comme une importante source de saccharidases, l'alginase devant être ajoutée à la liste déjà connue des hydrolases libérées par la dissolution de cet organe dans l'estomac (cellulase, amylase, lipase). Rappelons également que selon Hashimoto, Matsumoto et Hibiya (1950), les plaques gas-

triques du Gastéropode Opisthobranche *Dolabella scapula* seraient également capable de libérer de l'alginase pendant la trituration des aliments.

Quant au problème de l'intervention éventuelle de flores microbien-nes intestinales dans la production des alginases que l'on trouve dans le tube digestif des Mollusques, nous l'avons abordé dans le cas du Gastéropode terrestre *Helix pomatia L.* Après destruction presque complète de la flore bactérienne intestinale par ingestion d'antibio-tiques additionnés à une nourriture stérile, les organes du tube digestif des escargots manifestent la même activité alginolytique que ceux des témoins (Jeuniaux et Franssen, inédit). Chez ces Mollusques, l'intervention des bactéries intestinales dans la production de l'alginase peut donc être considérée comme tout à fait négligeable.

B. Propriétés des alginases d'origine animale.

Chaque fois que les quantités d'extrait enzymatique nous le per-mettaient, nous avons recherché la zone de pH optimum des alginases. En règle générale, celle-ci oscille autour des valeurs de pH égal à 7,2 et 7,8, suivant les animaux étudiés. Dans le cas des Mollusques, chez un même animal, le pH optimum de l'alginase est le même pour les extraits provenant de l'hépatopancréas et ceux des contenus du tube digestif ou de l'estomac.

Dans les cas où nous avons pu étudier plusieurs espèces appartenant à un même genre, les différents extraits enzymatiques présentent des valeurs identiques de pH optimum (pH 7,8 pour *Littorina littorea* et *L. obtusata*, et également 7,8 pour *Limnaea stagnalis* et *L. limosa*).

Nous avons pu mettre en évidence l'action hydrolytique des extraits glandulaires sur l'alginate sodique et sur l'acide alginique, dosant les produits d'hydrolyse chaque fois que l'activité alginolytique des extraits étudiés était supérieure à 1,2 U.A./g de tissus frais. Nous avons mesuré simultanément l'augmentation du pouvoir réducteur (méthode de Somogyi) et les sucres uroniques libérés (méthode de Maughan *et al.*). Les résultats, exprimés en μ g de glucuronate libéré/ml de milieu réactionnel, obtenus au cours d'un même essai enzymatique, sont toujours plus élevés lorsqu'on dose les sucres uroniques que lorsqu'on mesure le pouvoir réducteur. Cette différence provient du fait que la méthode de Somogyi ne met en évidence que les groupements réducteurs libres, tandis que la méthode de Maughan *et al.* dose les acides uroniques, qu'ils soient libres ou liés à d'autres sucres uroniques au sein des oligo-uronides.

Cette différence entre les valeurs obtenues par les deux méthodes suggère que la dégradation complète de l'acide alginique n'est pas catalysée par un seul enzyme mais par une série d'hydrolases agissant les unes après les autres dans une série de réactions conduisant à la libération finale d'acides mannuroniques et guluroniques. C'est à celui de ces enzymes qui agit en premier lieu, et dont on mesure l'activité par viscosimétrie, que revient le nom d'alginase. La concentration respective de ces hydrolases peut varier d'un organisme à l'autre. Par conséquent, la mesure des produits de la réaction ne donne pas néces-

sairement une idée exacte de la quantité d'alginate présente dans les extraits étudiés. Celle-ci est mesurée avec plus d'exactitude par la méthode viscosimétrique.

Summary

Alginolytic enzymes have been detected, by viscosimetric method and by analysis of hydrolytic products, in the digestive tract of *Arenicola marina* L. and of the Echinoderms *Psammechinus miliaris* Gmelin and *Holothuria forskali* della Chiaje, in the crystalline tube of *Tapes decussatus* L. (Lamellibranchia) and in all the 13 different species of Gastropoda so far studied.

Alginase seems to be a permanent constituent of the enzymatic digestive equipment of Gastropoda, this enzyme indeed being secreted not only by phytophagous marine species, which feed on brown algae containing alginic acid, but also by carnivorous marine species and by phytophagous species terrestrial or living in fresh waters.

However, a correlation appears to exist between the dietary habits and the amount of alginase in the digestive organs.

In the cases so far studied, the optimum pH of alginases generally lies between 7,2 and 7,8.

Zusammenfassung

Die Alginase wurde durch Viskositätsbestimmung und durch die Bestimmung der Spaltprodukte der Alginäure in den Organen des Verdauungstraktes einer ganzen Reihe von Invertebraten gesucht. Sie wurde beim Anneliden *Arenicola marina* L., bei gewissen Echinodermen (*Psammechinus miliaris* Gm. und *Holothuria forskali* Della Chiaje), im kristallinen Stylus des Lamellibranchiers *Tapes decussatus* L., und bei allen hierfür untersuchten Gasteropoden (13 Arten) gefunden.

Die Alginase scheint ein dauernder Bestandteil des enzymatischen Verdauungsarsenals der Gasteropoden zu sein, da sie nicht nur von marinen pflanzenfressenden Gasteropoden, die sich von Braunalgen ernähren, welche an Alginäure reich sind, sondern auch von carnivoren marinen Arten und von pflanzenfressenden Süßwasserarten und terrestrischen Arten ausgeschieden wird. Es scheint aber eine Korrelation zu bestehen zwischen der Ernährungsart und der Quantität der ausgeschiedenen Alginase.

Das optimale pH der untersuchten Alginasen liegt meistens zwischen 7,2 und 7,8.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

EPPELEY, R.W. et LASKER, R., 1959. — Alginase in the sea Urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, 129, p. 214.

FISCHER, F.G. et DÖRFEL, H., 1955. — Die Polyuronäuren der Braunalgen (Kohlenhydrate der Algen I). *Zeits. Phys. Chem.*, 302, pp. 186-203.

FRANSSEN, J. et JEUNIAUX, CH., 1964. — Dosage et propriétés d'alginases d'origine microbienne. *Bull. Cl. Sci. Acad. R. Belgique*, 5^e série, pp. 713-724.

GALLI, D.R. et GIESE, A.C., 1959. — Carbohydrate digestion in a herbivorous snail *Tegula funeralis*. *J. Exp. Zool.*, 140, pp. 415-440.

HASHIMOTO, Y., MATSUMOTO, S. et HIBIYA, T., 1950. — Comparative studies on the stomachal plates and crystalline style. I : Enzymes of the stomachal plates in an Opisthobranch : *Dolabella scapula*. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.*, 17, pp. 41-46.

HASHIMOTO, Y. et ONOMA, K., 1949. — On the digestion of higher carbohydrates by Mollusca. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.*, 15, pp. 253-258.

HOLDEN, M. et TRACEY, M.V., 1950. — A study of enzymes that can break down Tobacco-leaf components. 2. Digestive juice of *Helix* on defined substrates. *Biochem. J.*, 47, pp. 407-414.

JIUANG, G. et GIESE, A.C., 1958. — Tests for digestion of algal polysaccharides by some marine herbivores. *Science*, 127, p. 475.

KOOIMAN, P., 1954. — Enzymic hydrolysis of alginic acid. *Bioch. Bioph. Acta*, 13, pp. 338-340.

LASKER, R.A. and BOLOOTIAN, R.A., 1960. — Digestion of the Alga *Macrocystis pyrifera* by the sea Urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Nature*, 188, p. 1130.

MAUGHAN, G.B., KENNETH, A.E. et BROWNE, J.S.L., 1938. — A method for the quantitative estimation of glucuronic acid and conjugated glucuronides. *J. Biol. Chem.*, 126, pp. 567-572.

MEEUSE, B.J.D. et FLUEGEL, W., 1958. — Carbohydrate-digesting enzymes in the sugar gland juice of *Cryptochiton stelleri* Middendorf (Polyplacophora, Mollusca). *Arch. Neerland. Zool.*, 13, pp. 301-313.

MIWA, T., 1940. — Biochemische Studien über die Zellmembranen von Braun-und Rotalgen. *Japan J. Botany*, 11, pp. 41-127.

OSHIMA, K., 1931. — Über die Entdeckung eines Alginäure spaltenden Enzyms und seine Eigenschaften. *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, 7, p. 17.

SOMOGYI, M., 1952. — Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195, pp. 19-23.