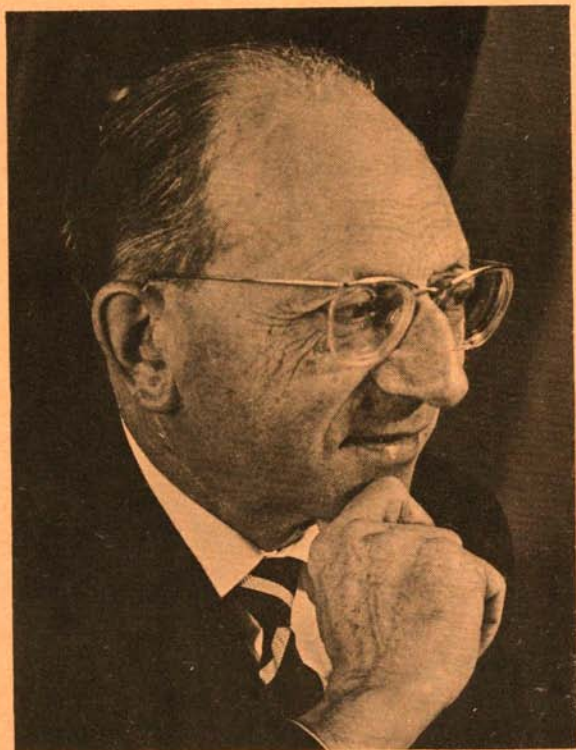


ACTES DES COLLOQUES INSECTES SOCIAUX

Edités par l'Union Internationale pour l'Etude des Insectes Sociaux
Section française

VOL.3 -COMPTE RENDU COLLOQUE ANNUEL ,

VAISON LA ROMAINE 12-14 Sept. 1985



(photo A.DEVEZ)

Pierre-Paul GRASSÉ

ETUDE COMPARATIVE ENTRE LA β -GLUCOSIDASE PRESENTE
 DANS LE TUBE DIGESTIF DU TERMITE MACROTERMES MÜLLERI
 (Termitidae, Macrotermitinae)
 ET LA β -GLUCOSIDASE DU CHAMPIGNON SYMBIOTIQUE
TERMITOMYCES SP.

par

C. ROULAND⁽¹⁾, P. MORA⁽¹⁾, M. MATOUB⁽²⁾, J. RENOUX⁽¹⁾, F. PETEK⁽²⁾

(1) Laboratoire de Zoologie et de Biologie des Populations
 Université Paris-Val de Marne, 94000 Créteil (France)

(2) Laboratoire de Biochimie, CNRS ERA 396, Faculté de Pharmacie
 Université Paris XI, 92290 Châtenay-Malabry (France)

Résumé. La β -glucosidase purifiée chez le termite *Macrotermes mülleri* présente des caractéristiques qui la différencient très nettement de celle produite par le champignon symbiotique *Termitomyces* sp. L'importance des relations symbiotiques entre ces deux organismes pour la cellulolyse est discutée.

Mots-clés: β -glucosidase, *Macrotermes mülleri*, *Termitomyces*, cellulolyse.

Comparative study of two β -glucosidases from *Macrotermes mülleri* and its symbiotic fungus *Termitomyces* sp.

Summary: The β -glucosidase purified from the fungus growing termite *Macrotermes mülleri* have very different characteristics in comparison to the β -glucosidase purified from the symbiotic fungus *Termitomyces* sp. The contribution of symbiotic fungus to cellulolysis was examined.

Key words: β -glucosidase, *Macrotermes mülleri*, *Termitomyces* sp., cellulolysis.

L'étude des osidases digestives de plusieurs espèces de termites africains (1) nous a permis de constater que le termite champignonniste de forêt *Macrotermes mülleri* était celui qui possédait l'équipement enzymatique le plus complet et les cellulases les plus actives.

M. mülleri est un termite champignonniste dont les hautes

constructions sont fréquentes dans la forêt tropicale humide du bassin congolais (2). Dans cette espèce, les ouvriers découpent et récoltent des rondelles de feuilles avec lesquelles ils confectionnent des meules sur lesquelles se développe un champignon basidiomycète, du genre *Termitomyces*, symbiote spécifique de *M. mülleri*. (3)

La dégradation du matériel végétal et, en particulier, de la cellulose, débute dans la meule et se poursuit chez le termite au cours du transit intestinal (4). Aucune étude approfondie n'a été effectuée sur les osidases intervenant dans cette dégradation et de ce fait leur origine (ouvrier de *M. mülleri*, *Termitomyces* ou microflore endosymbiotique) n'a pu encore être précisée à l'heure actuelle.

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux mécanismes de dégradation de la cellulose qui est un des constituants majeurs des cellules végétales. La cellulolyse s'effectue généralement par l'action de trois enzymes : une endocellulase, une exocellulase et une β -glucosidase ou cellobiase (5,6).

Cet article, qui constitue le premier volet de cette étude, concerne la purification de β -glucosidases à partir d'ouvriers de *Macrotermes mülleri* et de mycotètes de *Termitomyces*.

Les résultats obtenus sur les endo et les exocellulases feront l'objet d'une autre publication.

MATERIEL ET METHODES:

Obtention des extraits bruts :

15g. de termites ouvriers ou 5g. de mycotètes de *Termitomyces*, sont broyés dans du NaCl 9% à l'aide d'un microbroyeur Ultra-Turrax (type Tp10/18) durant 4 fois 30 secondes puis soniqués (Branson Sonoifier modèle B 15) 6 fois 30 secondes.

Le broyat est centrifugé pendant 20 mn à 20.000 t/mn, le surnageant est ensuite précipité par du sulfate d'ammonium à 80% de saturation.

Les précipités sont repris dans 10ml d'eau distillée et mis à dialyser contre l'eau distillée, à 4°, pendant 24h.

Les solutions ainsi obtenues constituent l'extrait brut.

Techniques de dosages:

- Dosage de l'activité β -glucosidase:

Le milieu réactionnel pour les tests d'activité comprend : 50 μ l de dérivé o-nitrophényl β -D glucoside 20 mM, 50 μ l de préparation enzymatique et 25 μ l de tampon Mc Ilvaine 30 mM, de pH correspondant au pH optimal de l'enzyme étudié. Le mélange est incubé à 37° pendant des durées variables (2 à 10 mn.). La réaction est arrêtée en alcalinisant le milieu avec 3 ml de carbonate de sodium 0,2 M. La coloration jaune correspondant à la concentration de l'o-nitrophénol libéré est mesurée à 420 nm, après 15 mn. de stabilisation à la température ambiante.

L'activité spécifique β glucosidase est exprimée en μ moles de glucose libérées par minute à 37°C (unité enzymatique) et par mg. de protéine.

- Dosage de protéines

Nous avons utilisé la technique utilisant le bleu de Coomassie G 250 (7). Le réactif est additionné à un volume égal de solution protéique contenant de 2 à 25 μ g de protéines. Après mélange, la lecture spectrophotométrique est effectuée à 595 nm (8). Le taux de protéine étant calculé par rapport à la serum albumine bovine.

Techniques chromatographiques:

1) Chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite est préparée au laboratoire selon la méthode de Tiselius, Hjerten et Levin (9) modifiée par Levin (10). Elle est conservée dans le tampon phosphate de sodium 5 mM, pH 6,8.

2) Chromatographie sur colonnes de DEAE-cellulose et ECTEOLA-cellulose

La DEAE-cellulose (type DE-52, Whatman) et l'ECTEOLA-cellulose (type Celltex-E Bio-Rad) sont précyclées avec HCl 0,5M et Na OH 0,5M selon le protocole préconisé par la firme, stabilisées ensuite pendant 24 heures dans un tampon acétate de sodium 20 mM pH 4,1 ou dans un tampon phosphate de potassium 10 mM pH 6,5.

Les colonnes sont lavées pendant 4 heures avec le tampon d'équilibre adéquat.

Techniques électrophorétiques

1) Electrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide

Elle est généralement réalisée dans des colonnes de verre (0,5 x 10 cm) avec des gels à 7,5 p. 100 (p/v) d'acrylamide, suivant la technique de Maizel (11).

Les gels sont démoulés et colorés, pendant 2 heures, dans une solution de bleu de Coomassie à 0,2 g p. 100 dans un mélange méthanol: acide acétique: eau (5:1:4). Ils sont ensuite décolorés pendant une nuit à 37°C dans un mélange méthanol: acide acétique: eau (3:1:10).

2) Détermination des poids moléculaires

a) sur gel de polyacrylamide

L'évaluation du poids moléculaire des enzymes étudiées a été effectuée suivant la technique de Hendrick et Smith (12), en utilisant des gels de 5,5 ; 6,5 ; 7,5 et 8,5 p. 100 en acrylamide, la sérum-albumine bovine servant de référence.

b) sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

Ces électrophorèses, effectuées selon la technique de Weber et Osborn (13), ont permis de vérifier les valeurs des poids moléculaires obtenus par la première technique et de mettre en évidence la présence de sous-unités.

Nous avons utilisé : la phosphorylase a (94000), la sérum-albumine bovine monomère (68 000), l'ovalbumine (45 000), la pepsine (35 000) et la trypsine (23 000) comme protéines de référence.

RESULTATS:

Purification d'une β -glucosidase (β -glucosidase A) présente chez les ouvriers de *M. mülleri* (Fig.1):

-**Colonne I** : l'extrait brut est adsorbé sur une colonne d'hydroxyapatite (2,5x10cm) équilibrée avec le tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 10mM + 1MKCl de pH=6,2. La colonne est éluée par des molarités croissantes de ce même tampon (50 mM, 100mM), la β -glucosidase est récupérée avec le tampon 200mM (Fraction Ia).

-**Colonne II** : La fraction Ia est appliquée sur une colonne d'ECTEOLA - Cellulose (1,5x7cm) équilibrée avec le tampon Phosphate 10mM pH=6,2. L'éluion se fait par paliers, en augmentant dans ce même tampon la molarité en NaCl (50mM, 100mM, 150mM, 300mM); l'activité β -glucosidasique est récupérée avec la fraction NaCl 400mM (Fraction IIa)

-**Colonne III** : La purification finale est obtenue par adsorption de la fraction IIa sur une colonne de TEAE-Cellulose (1,5x7cm) équilibrée avec le même tampon que précédemment; l'éluion se fait en augmentant la concentration en NaCl de ce tampon (50mM, 150mM, 250mM). A la suite de cette colonne, la β -glucosidase est éluée avec le tampon contenant 350mM NaCl.

A cette étape de la purification, l'activité spécifique de l'enzyme (β -glucosidase A) est de 214,1 unités enzymatiques/mg de protéine. Quelle que soit la concentration en protéine, la fraction active ne présente qu'une seule bande protéique sur gel de polyacrylamide qui correspond à l'activité β -glucosidasique.

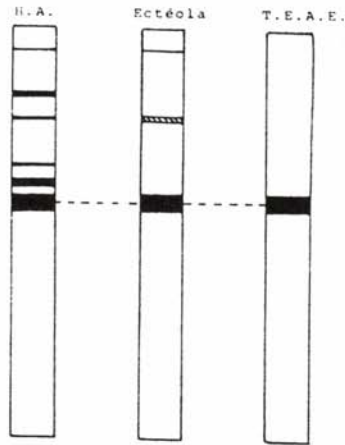


Fig.1: Etapes de purification de la β -glucosidase A.

ETAPES	VOLUME [ml]	ACTIVITE TOTALE [unités]	PROTEINES [mg]	ACTIVITE SPECIFIQUE [unités/mg de protéines]	RENDEMENT [%100]	PURIFICATION
EXTRAIT BRUT	20	181	22,2	8.2	100	1
COLONNE D'HYDROXYAPATITE	50	94.6	2,1	45.0	52	5.5
COLONNE ECTÉOLA	21	37,6	0,195	192,8	21	24
COLONNE T.E.A.E. CELLULOSE	33	21,2	0.099	214,1	12	26

Tableau 1 : Etapes de purification de la β -glucosidase A.

Une unité enzymatique correspond à une micromole de glucose libéré par minute à 37°

Purification d'une β -glucosidase (β -glucosidase B) chez le champignon *Termitomyces* (Fig. 2):

-**Colonne I** : L'extrait brut est déposé sur une colonne d'hydroxyapatite (1,5x7cm) équilibrée avec le tampon phosphate 10mM pH=5,3. La colonne est éluée avec ce même tampon en augmentant sa molarité (50mM, 100mM, 200mM, 300mM); l'activité β -glucosidasique est détectée dans la fraction obtenue avec le tampon 400mM (Fraction Ib).

-**Colonne II** : La purification de la fraction Ib est effectuée en utilisant une colonne d'ECTEOLA-Cellulose (1,5x7cm) équilibrée avec le tampon Phosphate 2mM pH=7,7. Les bandes contaminantes sont entièrement éliminées par un lavage de la colonne avec le tampon 5mM et la β -glucosidase B est récupérée dans la fraction éluée avec 10mM.

Le contrôle électrophorétique ne montre qu'une seule bande qui correspond à l'activité cellobiasique. L'activité spécifique de l'enzyme purifiée (β -glucosidase B) est de 90 unités enzymatiques/mg de protéines

L'augmentation de l'activité spécifique des β -glucosidases A et B ainsi que le rendement de chaque étape de purification sont présentés dans les tableaux 1 et 2.

PROPRIETES GENERALES DES β -GLUCOSIDASES A ET B :

-**Détermination du pH optimal (Fig.3):**

L'effet du pH sur les activités enzymatiques a été étudié avec le tampon phosphate - acide citrique 0,03M en utilisant l'ONP β -D-glucopyranoside comme substrat.

Les β -glucosidases A et B présentent des profils d'activité très différents.

La β -glucosidase A présente un maximum se situant entre 5,2 et 5,6 alors que la β -glucosidase B a une activité qui reste stable dans une large gamme de pH en présentant cependant un léger maximum entre 4,4 et 4,6.

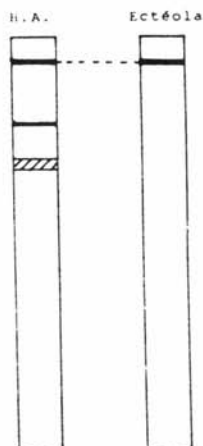


Fig. 2: Etapes de purification de la β -glucosidase B.

ETAPES	VOLUME (ml)	ACTIVITE TOTALE (unités)	PROTEINES (mg)	ACTIVITE SPECIFIQUE (unités/mg de protéines)	RENDEMENT (p. 100)	PURIFICATION
EXTRAIT BRU	20	9,06	28,8	0,31	100	1
COLONNE: D'HYDROXYAPATITE	65	5,3	4,5	3,6	58	11,6
COLONNE: ECTÉOLA	20	3,6	0,04	90	39	290

Tableau 2 : Etapes de purification de la β -glucosidase B.

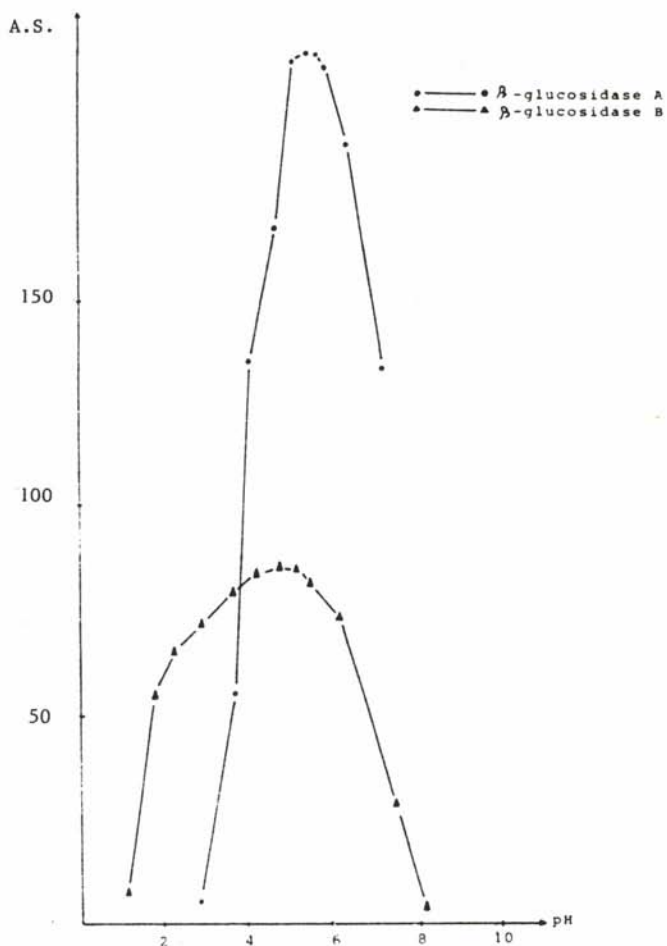


Fig.3 : Influence du pH sur l'hydrolyse de l'ONP-β-D-glucopyranoside par les β-glucosidases A et B.

L'activité spécifique (A.S.) est exprimée en micromoles de glucose libérées/mg de protéines/mn.

- Stabilité et conservation :

La β -glucosidase A perd 50% de son activité à la congélation et sa stabilité ne dépasse pas une semaine à +4°. Dans les mêmes conditions de conservation, la β -glucosidase B demeure stable à +4° pendant plus d'un mois et perd à peine 10% de son activité à la congélation.

- Détermination du poids moléculaire :

a) Les enzymes, électrophorétiquement pures, ont été soumises à une électrophorèse sur plaque en présence de SDS. Une seule bande a été obtenue avec chacune des enzymes, correspondant à un PM de 62.000 pour la β -glucosidase A et de 120.000 pour la β -glucosidase B.

b) La méthode de Hedrick et Smith a été appliquée sur les deux enzymes. Les valeurs de PM ainsi obtenus ont été respectivement de 120.000 + 5.000 pour la β -glucosidase A et de 123.000 + 5.000 pour la β -glucosidase B. Ces résultats montrent que la β -glucosidase A est composée de 2 sous-unités identiques chacune de PM=62.000 alors que la β -glucosidase B est monomérique et de PM=120.000.

DISCUSSION:

L'analyse des tableaux de purification montre que, purifiée, la β -glucosidase A du termite présente une plus grande activité spécifique que la β -glucosidase B provenant du champignon. Le protocole de purification de la β -glucosidase A qui nécessite l'utilisation de trois colonnes successives donne un rendement relativement faible de 12% par rapport à l'extrait brut alors que la β -glucosidase B est obtenue en deux colonnes avec un rendement meilleur qui se situe aux environs de 40%. Les PM des deux enzymes A et B sont respectivement de 124 000 et de 120 000 mais la β -glucosidase du termite est dimérique alors que celle du champignon est monomérique.

Les pH optimums ne sont pas très éloignés, 4,6 pour l'enzyme du champignon et 5,2 pour celle du termite mais les courbes indiquant l'effet du pH sur l'hydrolyse enzymatique sont fortement dissemblables : la β -glucosidase A reste active en milieu basique (pH=7,6) mais perd très rapidement son activité en milieu acide; au contraire la β -glucosidase B reste toujours active même en milieu fortement acide (pH=2) mais voit son activité décroître en milieu alcalin.

Les différences qui apparaissent entre les deux enzymes tant au niveau des protocoles de purification qu'au niveau des propriétés générales indiquent qu'il s'agit de deux enzymes distinctes.

L'existence d'une β -glucosidase différente de celle produite par le champignon et dont l'activité spécifique est plus élevée se trouve ainsi, pour la première fois, mise en évidence dans l'intestin du termite.

Ainsi nous pouvons suggérer que chez *M. mülleri*, la dégradation de la cellulose si elle débute dans la meule (4), se termine dans le tube digestif du termite grâce à une β -glucosidase très active qui provient du termite lui-même, ou de sa microflore symbiotique, mais qui n'est pas ingérée avec le champignon comme l'hypothèse en avait été formulée par plusieurs auteurs (14, 15).

Nos résultats posent le problème du rôle et des limites de la symbiose entre le termite et le champignon dans le cas particulier de la cellulolyse. Dans la meule, le *Termitomyces* dégraderait les débris végétaux qui seraient ensuite ingérés par le termite, toutefois, ces débris ne constitueraient pas pour celui-ci une nourriture directement assimilable. L'action hydrolytique de un ou plusieurs enzymes propres au termite ou à sa microflore serait donc indispensable à la production de glucose, absorbable par l'épithélium intestinal, à partir de la molécule de cellulose.

RCP CNRS n° 765.

BIBLIOGRAPHIE :

- 1- ROULAND C., CHARARAS C., RENOUX J. (1986) - C.R. Acad. Sci. Paris (sous presse).
- 2- GRASSE P.P. (1982) - Termitologia I et II, Masson, Paris.
- 3- NOIROT C. (1982) - Biol. Ecol. Médit., 7, 123-128.
- 4- ROULAND C., CHARARAS C., GARNIER-SILLAM E., TOUTAIN F., RENOUX J. (1984) - 7ème colloque Physiologie de l'insecte, Dijon.
- 5- HALLIWEL G. (1961) - Biochem. J., 79, 185-192.
- 6- WOOD T. M. and Mc CRAE S.J. (1972) - Biochem. J., 128, 1183-1192.
- 7- SEDMAK J. J. and GROSSBERG S.E. (1977) - Anal. Biochem., 79, 544-552.
- 8- BRADFORD M. M. (1976) - Anal. Biochem., 72, 248-254.
- 9- TISELIUS A., HJERTEN S. and LEVINO. (1956) - Arch. Biochem. Biophys., 65, 132-155.
- 10- LEVINO. (1962) - Methods Enzymol., 5, 27-32.
- 11- MAIZEL J. V. Jr (1964) - Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 383-390.
- 12- HEDRIK J. L. and SMITH A. J. (1968) - Arch. Biochem. Biophys., 126, 155-164.
- 13- WEBER K. and OSBORN M. (1969) - J. Biol. Chem., 244, 4406-4412.
- 14- MARTIN M. M. and MARTIN J.S. (1978) - Science, 199, 1453-1455.
- 15- ABO-KHATWA N. (1977) - Experientia, 34, 559-560.