

ACTES DES COLLOQUES INSECTES SOCIAUX

Édités par l'Union Internationale pour l'Étude des Insectes Sociaux
Section française

VOL. 4 – COMPTE RENDU COLLOQUE ANNUEL,

PAIMPONT 17-19 Sept. 1987



Charles Fernal
1899

ESSAI D'INTERPRETATION DE LA SYMBIOSE DIGESTIVE CHEZ
MACROTREMES MULLERI (TERMITIDAE, MACROTERTITINAE)

par

C. ROULAND, Ph. MORA & J. RENOUX

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

Résumé : Des expériences sur le temps de survie d'ouvriers de *Macrotermes mülleri* ont montré que la présence du champignon symbiotique est indispensable à leur nutrition particulièrement en ce qui concerne la dégradation de la cellulose.

L'existence d'un synergisme entre l'exocellulase purifiée chez le termite et l'endocellulase produite par le champignon a pu être observée. L'importance de ces activités enzymatiques synergiques dans le métabolisme digestif du termite est discutée.

Mots-clés : cellulases, *Macrotermes mülleri*, *Termitomyces*, synergie.

Digestive symbiosis in *Macrotermes mülleri* (Termitidae, Macrotermitinae)

Summary : Experiments on the survival time of *Macrotermes mülleri* workers indicated that the presence of the fungus *Termitomyces* sp. was necessary for nutrition particularly in the cellulolysis process.

Cellulases purified from the termite and from the mycotètes of its symbiotic fungus has been studied. Synergism was observed between cellulase I_F (fungus) and cellulase II (termite). The importance of this synergistic activity in the digestive metabolism of *M. mülleri* was discussed.

Key-words : cellulases, *Macrotermes mülleri*, *Termitomyces*, synergism.

INTRODUCTION :

Macrotermes mülleri est un termite champignonniste fréquent dans la forêt du Mayombe (Congo). Des résultats préliminaires (Rouland et col., 85; Rouland & al, 1987) montrent clairement que, chez ce termite, le métabolisme primaire de la cellulose met en jeu un système enzymatique composé des cellulases I_F et II et de la β-glucosidase A. Le champignon *Termitomyces*, spécifique de la termitière, est également muni d'un système cellulolytique formé de la cellulase I_F et de la β-glucosidase B que nous avons isolées et purifiées à partir des mycotètes de cet organisme.

L'endocellulase comme l'exocellulase présentant, seule, une capacité importante de dégrader la cellulose, nous avons voulu essayer de préciser l'apport de la symbiose dans la nutrition du termite. Dans ce but, nous avons effectué deux approches différentes mais complémentaires : tout d'abord, un essai d'alimentation artificielle d'animaux en élevage nous a permis de préciser l'importance de plusieurs facteurs alimentaires dans la survie du termite; puis une étude en synergie de la dégradation de la cellulose par les différentes enzymes purifiées a été réalisée.

MATERIEL ET METHODES :

Matériel biologique

Les termites étudiés proviennent de la forêt du Mayombe en République Populaire du Congo. Les animaux sont prélevés sur le terrain avec des fragments de nid puis mis en élevage dans une salle tropicalisée maintenue à une température constante de +25°C avec 90% d'humidité relative et une périodicité de 12h de jour et de 12h de nuit.

Solutions enzymatiques

Les cellulases I_T et I_F ont été isolées et purifiées par des techniques de chromatographie liquide. Chaque enzyme purifiée présente une seule bande protéique après électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les deux solutions enzymatiques sont utilisées à la même concentration de 20 µg/ml.

Substrats

Trois celluloses naturelles, une cellulose microcristalline (Whatman), une avicellulose (type SF), une cellulose en poudre (Schleicher & Schüll), et une cellulose prétraitée, la carboxyméthyl cellulose (Pronoval-France) ont été utilisées pour la détection des activités cellulolytiques.

Dosage enzymatique

La détection de l'activité CMCase est réalisée par l'incubation de 100 µl de solution enzymatique avec 100 µl d'une solution de CMCellulose à 8mg/ml et de 50 µl de tampon pH=4,5 à +37°C. Les activités cellulolytiques sont déterminées après incubation, sous agitation, de 200 µl de solution enzymatique avec 100 µl du même tampon et 10mg de cellulose insoluble.

La quantité de sucres réducteurs libérés par l'hydrolyse de ces substrats est déterminée par un microdosage (Williams *et al*) utilisant les réactifs de Somogyi (1945) et de Nelson (1944).

Le taux de protéines est estimé par la méthode de Sedmak et Grossberg (1977), la serumalbumine bovine étant utilisée en référence.

L'activité spécifique est exprimée en µMole de glucose libérée par minute et par mg de protéine.

RESULTATS

A - Essai d'alimentation artificielle

50 ouvriers, grands et petits, et 10 petits soldats prélevés directement dans la termitière sont placés dans des boîtes de Pétri de 15 cm de diamètre dont le fond a été rayé au papier de verre. Dans chaque boîte, un peu de sable de Fontainebleau stérilisé est humidifié tous les 3 jours avec 0,25 ml d'eau distillée.

Plusieurs types de boîtes d'élevage sont constitués :

- **Boîtes A** : contenant uniquement de la terre prélevée à la périphérie de la termitière et stérilisée.
- **Boîtes B** : le fond de ces Boîtes est tapissé de papier Whatman.

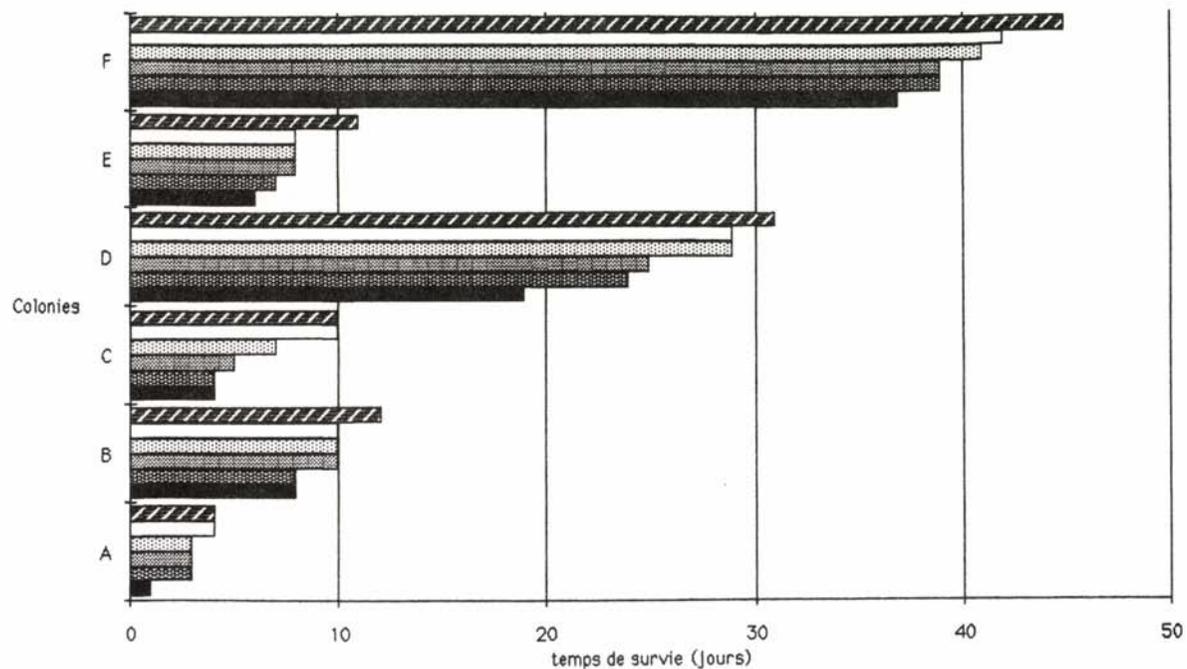


Fig. 1 : Durée de vie des différents élevages, pour chaque catégorie (A à F) six boîtes ont été étudiées.

- Boîtes C : contenant de la terre stérilisée et des rondelles de feuilles prélevées dans le nid.
- Boîtes D : tapissées de papier Whatman et renfermant 20 mycotètes prélevées sur des meules fraîches.
- Boîtes E : contenant de la terre stérile et 20 mycotètes prélevées comme précédemment.
- Boîtes F : tapissées de papier Whatman et contenant des fragments de meules dépouillées de leurs mycotètes.

Six boîtes de chaque type sont réalisées. Tous les jours, les morts sont dénombrés et retirés de la boîte. Les élevage se sont déroulés sur 45 jours maximum, dans aucune boîte il n'y a eu de renouvellement des éléments nutritifs. Les résultats obtenus sont donnés dans la figure 1.

Il apparaît que:

- série A : Les animaux ont perdu très rapidement (en 2 jours) toute activité et n'ont pas survécu plus de 5 jours.
- série B : Les premiers jours, les insectes ont manifesté une certaine activité; en particulier, ils ont commencé à découper les bords de la feuille de papier mise à leur disposition. L'activité des ouvriers s'est considérablement ralentie au bout de 4 à 5 jours et les morts sont devenus très abondants dans les boîtes. Les boîtes dans lesquelles les animaux ont survécu le plus longtemps ne contenaient en général plus que 5 à 6 ouvriers depuis plusieurs jours.
- série C : Les rondelles de feuilles ont été tout de suite disposées par les ouvriers de part et d'autre de la boîte, puis, il ne semble pas qu'elles aient été ni consommées ni même redéplacées par les termites. Les animaux ne sont restés actifs que 2 à 3 jours, les animaux sont morts massivement à partir du cinquième jour.
- série D : Les ouvriers ont, en 2 à 5h, consommé toutes les mycotètes puis le papier s'est révélé largement attaqué pendant toute la période d'élevage. L'activité des ouvriers s'est maintenue sans faiblir pendant 20 jours sauf pour une des boîtes. Les mortalités ont été très progressives et sont restées très faibles jusqu'au 18ème jour environ.
- série E : Comme pour les boîtes D, les ouvriers ont tout de suite ingéré les mycotètes mis à leur disposition. Ils sont devenus en 3 jours très peu actifs et le nombre de morts n'a cessé de croître du 4ème au 8ème jour, date à laquelle il ne restait plus que 7 animaux vivants dans une des 6 boîtes.
- série F : Les ouvriers ont manifesté une grande activité dans les boîtes pendant plus de 40 jours. Cette activité s'est traduite par un remaniement permanent des fragments de meules et par une consommation quasi totale du papier. Sur certaines meules des mycotètes ont réapparu au cours de l'élevage. La mortalité de tous les individus des boîtes a fait suite pour 5 d'entre elles à la contamination des meules par des moisissures.

Ces résultats permettent de constater que les mycotètes seules comme la cellulose seule ne peuvent suffire à assurer la survie du termite. Par contre, l'effet alimentaire combiné de la cellulose et

des mycotètes, permet de doubler et même de tripler la durée de vie des élevages.

Il apparaît clairement cependant que seules les boîtes contenant des fragments de meule et de la cellulose apportent une alimentation suffisante. Le nombre d'individus vivants par boîte diminuant cependant au cours du temps, il semble que les ouvriers restant ne puissent plus maintenir la meule en état. La mortalité s'accélère par suite de la contamination des meules.

B - Etude biochimique

Nous avons étudié l'activité en synergie des deux cellulases purifiées en faisant varier la concentration des enzymes les unes par rapport aux autres.

L'étude synergique des cellulases I₁ et I₂ a été effectuée sur quatre substrats différents :

+ carboxyméthylcellulose (Fig.2a) : il n'apparaît aucune synergie entre ces deux enzymes pour la dégradation de ce substrat.

+ cellulose microcristalline (Fig.2b) : l'augmentation d'activité due à la présence simultanée des deux cellulases est très importante surtout lorsque les enzymes sont présentes dans le milieu à des concentrations voisines. Le maximum d'activité est atteint avec environ 45% d'exocellulase et 55% d'endocellulase. Ce maximum représentant plus de 126% d'augmentation de leur capacité d'hydrolyse.

+ cellulose Schleichert et Schull (Fig.2c) : cette cellulose est plus nettement dégradée par les deux enzymes. Le profil de la courbe de synergie est très proche de celui observé pour la cellulose microcristalline. Le maximum d'activité étant obtenu avec 40% de l'exocellulase et 60% de l'endocellulase, cette activité représentant 160% d'augmentation.

+ cellulose Whatman (Fig.2d) : ce substrat, beaucoup moins dégradé que les précédents est, par contre, plus attaqué par l'endocellulase que par l'exocellulase. Les activités en synergie présentent cependant le même type de variations que les autres celluloses étudiées. L'activité de dégradation est maximum pour une concentration dans le milieu de 42% d'exocellulase et de 58% d'endocellulase. Cette activité est dans ces conditions augmentées de 112%.

Bien que les ouvriers de *M. mülleri* possèdent les enzymes nécessaires à la dégradation de la cellulose, on peut constater qu'ils ne peuvent vivre longtemps avec un substrat cellulosé comme seule source de nourriture. Par contre lorsqu'ils reçoivent des mycotètes et du papier Whatman, leur longévité est nettement plus grande et le papier est largement ingéré par les ouvriers, ce qui confirme l'importance de l'apport enzymatique par les mycotètes. Sands (1956) et Ansar *et al.* (1960) ont obtenu les mêmes résultats sur des élevages expérimentaux d'*Odontotermes*, ils constatent qu'une certaine quantité de

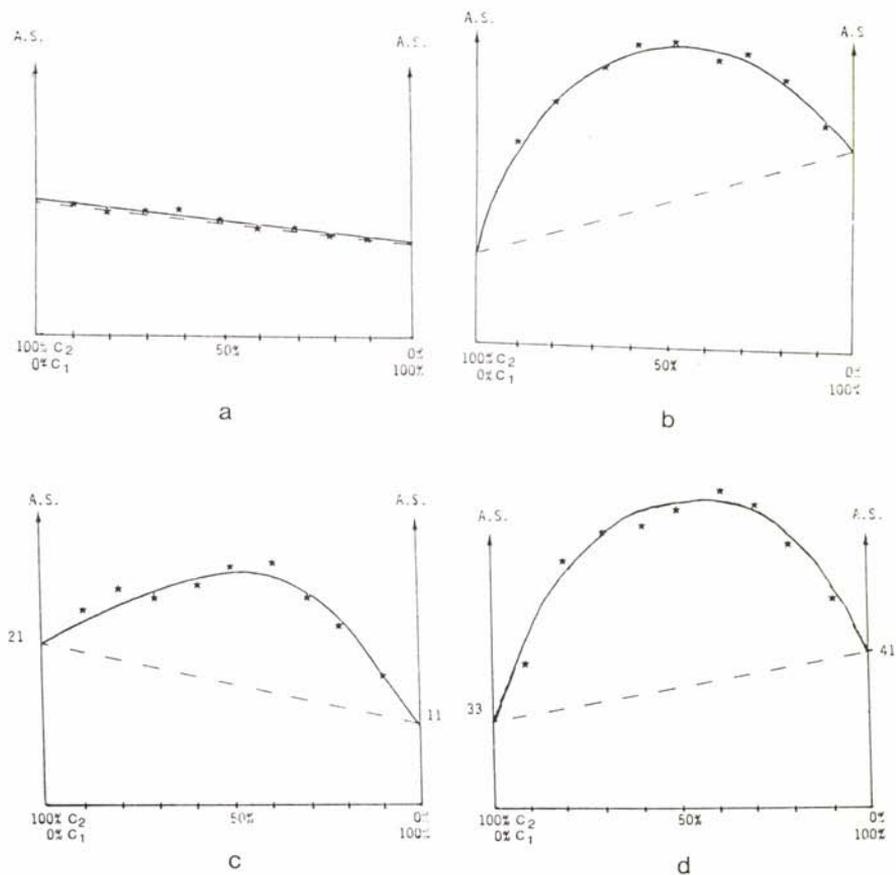


Fig. 2 : Activités en synergie de l'exocellulase et de l'endocellulase sur : a, carboxyméthylcellulose; b, cellulose microcristalline; c, cellulose Schleicher et Schüll; d, cellulose Whatman.

AS = Activité spécifique en micromoles de glucose par mg de protéines et par mn.

C₁ = endocellulase; C₂ = exocellulase.

meule ou de mycotêtes est indispensable à la survie de ces insectes. Les expériences de fondation de colonies, en laboratoire, de termites champignonnistes ont montré que la jeune colonie ne pouvait survivre que si les meules étaientensemencées par des spores de *Termitomyces* (Johnson, 1981; Johnson *et al.*, 1981). L'apport énergétique en vitamine et en azote des mycotêtes, proposé par Abo-Khatwa (1976) ne semble pas vérifiée dans le cas de *M. mülleri* puisque la durée de vie des ouvriers est pratiquement la même lorsqu'ils sont nourris avec des mycotêtes ou lorsqu'ils ne reçoivent aucun apport nutritif, par contre, ils survivent plus longtemps avec du papier comme seul élément nutritif. Il est même possible que la présence ou non du champignon symbiotique modifie le comportement alimentaire des ouvriers, en effet dans les boîtes d'élevage qui ne contenaient que des rondelles de feuilles ou que du papier, les animaux n'ont pratiquement pas touché à ces substrats, par contre lorsque la boîte contenait des mycotêtes ou de la meule les animaux, lorsqu'ils en avaient à leur disposition, ont largement consommé les substrats celluloses.

Les données biochimiques confortent et expliquent les résultats précédents. L'endocellulase du champignon et l'exocellulase produite par le termite présentent un synergisme très efficace pour la dégradation des celluloses natives : l'action conjointe de ces deux enzymes sur la cellulose microcristalline, par exemple, augmente de plus de deux fois la dégradation de ce substrat; on n'observe, par contre, aucun synergisme pour l'hydrolyse de la CMC, ce qui confirme les résultats obtenus par Henrissat *et al.* (1985) sur la dégradation des celluloses prétraitées. De nombreux auteurs avaient signalé depuis longtemps les pertes d'activité dues à la séparation des enzymes d'un même complexe enzymatique et ainsi introduit la notion de synergie; cette synergie a été mise en évidence chez la plupart des champignons cellulolytiques : *Trichoderma viride* (Li *et al.*, 1965; Selby & Maitland, 1966); *Trichoderma koningii* (Wood, 1971; Halliwell & Riaz, 1970); *Fusarium solani* (Wood & Mac Crae, 1979); *Trichoderma reesei* (Henrissat *et al.*, 1985); *Penicillium pinophilum* (Wood & Mac Crae, 1986) mais l'originalité de ce travail résulte dans le fait que le mécanisme de synergie mise en évidence dans le tractus digestif de *M. mülleri* s'effectue entre deux enzymes produites par des organismes différents.

Une analyse plus approfondie des sites d'attaque sur la molécule de ces deux cellulases permettrait de mieux comprendre les mécanismes de cette synergie mais nous pouvons supposer que la cellulase provenant du champignon ne dégrade pas les cellodextrines de faibles poids moléculaires alors qu'elle s'attaque aux longues fibres de cellulose, l'exocellulase du termite ayant, au contraire, une prédilection pour les cellodextrines; lorsque les deux enzymes sont en présence, l'exocellulase verrait son activité considérablement augmentée grâce à l'endocellulase du *Termitomyces* qui lui "préparerait" des cellodextrines plus facilement attaquables par cette enzyme. Ainsi l'exocellulase et la β -glucosidase produites par le termite, bien que capables de produire du glucose à partir de la molécule de cellulose, seraient incapables d'avoir un rendement suffisant pour maintenir l'ouvrier de termite en équilibre nutritionnel.

BIBLIOGRAPHIE

- ABO-KHATWA N. (1976) - Natural product from the tropical termite *Macrotermes subhyalinus* : chemical composition and fonction of the fungus garden. *Proc. Pont. Acad. Sc.*, 1-21.
- ANSAT A., CHEEMA P.S., KOSHI T., PETRI T. & RANGANATHAN S.K. (1960) - Laboratory culturing of termites. *Proc. New Delhi symp. UNESCO Paris*, 121-125.
- HALLIWELL G. & RIAZ M. (1970) - The formation of the short fibres from native cellulose by components of *Trichoderma koningi*. *Biochem. J.*, **135**, 587-594.
- HENRISSAT B., DRIGUEZ H., VIET C. & SCHULEIN M. (1985) - Synergism of cellulases from *Trichoderma viride* in the degradation of cellulose. *Biotechnol.*, **3**, 12-23.
- JOHNSON R. A. (1981) - Colony development and establishment of the fungus comb in *Microtermes umbaricus* from Nigeria. *Insec. Soc.*, **28**, 1, 3-12.
- JOHNSON R.A., THOMAS R.J., WOOD T.G. & SWIFT M.J. (1981) - The inoculation of the fungus comb in newly founded colonies of some species of *Macrotermitinae* from Nigeria. *J. Natural History*, **15**, 751-756.
- LI L.H., FLORA R.M. & KING K.W. (1965) - Individual roles of cellulases components derived from *Trichoderma viride*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **III**, 439-447.
- NELSON N. (1944) - Photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**, 375-380.
- ROULAND C., MORA P., MATOUB M., RENOUX J. et PETEK F. (1986) - Etude comparative entre la β -glucosidase présente dans le tube digestif du termite *Macrotermes mülleri* et celle de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* *Act. Insec. Soc.*, **3**, 109-118.
- ROULAND C., CIVAS A., RENOUX J. & PETEK F. (1987) - Purification and properties of cellulases from the termite *Macrotermes mülleri* and from its symbiotic fungus *Termitomyces sp.* *Comp. Biochem. Physiol.*, soumis le 29/10/ 87.
- SANDS W. A. (1956) - Some factors affecting the survival of *Odontotermes badius*. *Insec. Soc.*, **7**, 251-259.
- SEDMARK J.J. & GROSSBERG S.E. (1977) - A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant blue G 250. *Anal. Biochem.*, **79**, 544-552.
- SELBY K. & MAITLAND C.C. (1967) - The cellulase of *Trichoderma viride*, separation of the components involved in the solubilization of cotton. *Biochem. J.*, **104**, 716-724.
- SOMOGYI M. (1945) - Determination of blood sugar. *J. Biol. Chem.*, **160**, 61-68.
- WOOD T.M. (1971) - The cellulase of *Fusarium solani*. Purification and specificity of the β -1,4 glucanase and the β -glucosidase components. *Biochem. J.*, **121**, 353-362.
- WOOD T.M. & MAC CRAE S.I. (1979) - Synergism between enzymes involved in the solubilisation of native cellulose. In *Hydrolysis of cellulose : Mechanisms of enzymatic and acid catalysis*. Ed. R.D. Brown., 181-209.
- WOOD T.M. & MAC CRAE S.I. (1986) - The cellulase of *Penicillium pinophilum*. Synergism between components in solubilizing cellulose with special reference to the involvement of two immunologically distinct cellobiohydrolases. *Biochem. J.*, **234**, 93-94.