

**ETUDE DE LA MICROFLORE ACTINOMYCETALE CELLULOLYTIQUE
DU TUBE DIGESTIF DE PLUSIEURS ESPECES DE TERMITES
SUPERIEURS AFRICAINS**

D. AZARIZ et C. ROULAND

*Laboratoire d'Écophysiologie des Invertébrés- Université Paris XII Val de Marne, avenue
du Général de Gaulle. 94010 Créteil Cedex France*

Résumé. Les travaux sur la microflore symbiotique du tube digestif de termites supérieurs se sont le plus souvent intéressés aux bactéries sensu-stricto et ont ignoré les bactéries filamenteuses (actinomycètes).

Au cours de ce travail, la flore actinomycétale provenant du tube digestif de 15 espèces de termites a été analysée.

Les résultats des dénombrements montrent que la quantité d'actinomycètes par volume de tube digestif est variable d'un genre à l'autre et au sein d'une même espèce. La quantité d'actinomycètes cellulolytiques présente dans le tube digestif des termites de la sous-famille des Macrotermitinae est nettement plus faible que celle des autres sous-familles.

Une étude qualitative a été réalisée afin de mettre en évidence la diversité de cette microflore actinomycétale. Sur les 15 espèces de termites étudiées, on observe une grande diversité de morphotypes en particulier chez les Nasutitermitinae et les Macrotermitinae.

Mots-clés : Actinomycètes, Termites, tube digestif, cellulolyse.

Abstract : Study of cellulolytics actinomycetes from the gut of several african higher termites

Studies on termites gut microflora, concerned mainly bacteria sensu-stricto, but data on filamentous bacteria (actinomycetes) are scarce.

In this study, actinomycetal flora from digestive tracts of 15 termites species was analysed.

The actinomycetal concentration was different in termites belonging to the same genus and even in termites belonging to the same species. The cellulolytics actinomycetes concentration in the digestive tract of termites belonging to the sub-family of Macrotermitinae is especially low in comparison with the one on the concentration obtained in other sub-families. In order to display the actinomycetes microflora diversity, a qualitative study was assayed. Among the 15 termites species studied, the highest morphotypes diversity was observed in Nasutitermitinae and Macrotermitinae.

Key words : Actinomycetes, Termites, gut, cellulolysis.

INTRODUCTION

Beaucoup de travaux ont montré que l'intestin postérieur des termites contient une grande abondance de microorganismes symbiotiques dont la diversité est en relation avec l'évolution des isoptères (Grassé et Noirot, 1959 ; Eutick *et al.*, 1978 ; Czoliz *et al.*, 1985). Concernant les actinomycètes particulièrement peu d'études ont été réalisées.

Néanmoins ces dernières années des observations à l'aide du microscope électronique ont montré l'existence d'une abondante microflore filamenteuse au niveau du tube digestif de plusieurs espèces de termites (Bignell, et al., 1979 ; Brauman, 1983). Ceci a été confirmé par des numérations et des isolements (Pasti et Belli, 1985 ; Pasti et al., 1990 ; Azariz, 1996 ; Lenoir-Labé, 1996).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Plusieurs espèces de termites ont été étudiées (Tableau. 1). Ces termites qui présentent différents régimes alimentaires ont été récoltés dans plusieurs pays africains.

Termites	origine	régime alimentaire
Termitinae		
<i>Amitermesvuncifer 1</i> (AE.1)	Tchad (canne à sucre)	Xylophage-détritivore
<i>A. evuncifer 2</i> (AE.2)	Tchad (savane)	Xylophage-détritivore
<i>A. sp. 3</i> (A.3)	Sénégal	Xylophage-détritivore
<i>A. sp. 4</i> (A.4)	Sénégal	Xylophage-détritivore
<i>Microcotermes parvus</i> (Mi)	Sénégal	Xylophage
<i>M. parvulus</i> (M)	Tchad	Xylophage
<i>Termes hospes</i> (TH)	Cameroun	Xylophage -détritivore
<i>Cubitermes heghi</i> (CH)	Tchad	Humivore
Nasutitermitinae		
<i>Trinervitermes trinervius</i> (TT)	Cameroun	Xylophage-fourrageur
<i>T. togoensis</i> (TT ₀)	Tchad	Xylophage-détritivore
<i>T. geminatus</i> (TG)	Côte d'Ivoire	Xylophage-détritivore
<i>Nasutitermes lujai</i> (NL)	Cameroun	Xylophage
<i>N. fulleri</i> (NF)	Cameroun	Xylophage
Apicotermitinae		
<i>Astalotermes quietus</i> (AQ)	Cameroun	Humivore
Macrotermitinae		
<i>Macrotermes bellicosus</i> (MB)	Côte d'Ivoire	Champignoniste
<i>M. subhyalinus</i> (MS)	Côte d'Ivoire	Champignoniste

Tableau 1: Origine et régime alimentaire des différentes espèces de termites étudiées.
Table 1 : Origin of several termites species characterized by different feeding diets.

Dissections

Dix tubes digestifs de termites ouvriers vivants sont disséqués à sec dans des conditions stériles, puis broyés dans 1 ml d'eau distillée. Les différents broyats obtenus constituent les dilutions zéro à partir desquelles des dilutions en cascade, jusqu'à 10^{-5} , ont été réalisées.

Dénombrement

Les différentes suspensions bactériennes ont servi d'inoculum pour le dénombrement de la microflore actinomycétale aérobie cellulolytique. Les ensemencements sont effectués sur un milieu sélectif (Hayakawa et Nonomura, 1987 modifié au laboratoire) contenant de la cellulose microcristalline comme seule source de carbone.

1 ml de chaque dilution est étalé sur des boîtes de Petri carré (12 cm x 12cm) contenant 70 ml du milieu de culture décrit ci-dessus, puis incubées dans une étuve à 30°C.

Isolement des actinomycètes

Après une semaine de croissance sur le milieu de dénombrement, les différentes colonies d'actinomycètes sont prélevées et repiquées sur milieu de Bennet contenant de la carboxyméthylcellulose (CMC). Ce milieu permet non seulement la croissance et la sporulation des actinomycètes mais également une première distinction des différents morphotypes.

Mesure de l'activité cellulase

Après cinq jours de croissance, le milieu de culture est recouvert par une solution de rouge Congo (0.1 %). Ce colorant a la propriété de se fixer aux polysaccharides. Après pénétration du colorant, la décoloration est réalisée par rinçage avec une solution de NaCl (1 M). Le Rouge Congo colore en rouge la CMC partout où elle est présente. Lorsque celle-ci a été hydrolysée par des cellulases extracellulaires, des halos clairs apparaissent autour des colonies.

RESULTATS

Sélection d'actinomycètes cellulolytiques : étude quantitative et qualitative

Les résultats obtenus (Tableau 2) montrent que la quantité d'actinomycètes par volume de tube digestif est variable (test F, au risque de 2,5 %) non seulement d'un genre à l'autre mais également au sein d'un même genre ou d'une même espèce. Cependant, les espèces qui présentent la plus grande quantité d'actinomycètes cellulolytiques sont des espèces à régime alimentaire xylophage : Test F significatif au risque de 2,5 % entre xylophages/humivores et xylophages/champignonnistes.

Les populations d'actinomycètes cellulolytiques se sont révélées extrêmement diversifiées ainsi, par espèces, de 15 à 52 morphotypes ont pu être différenciés.

Il est intéressant de constater que la diversité n'est pas corrélée à l'abondance des populations d'actinomycètes. En effet, les espèces champignonnistes qui s'étaient révélées les plus pauvres en actinomycètes présentent un grand nombre de morphotypes différents (48 et 31 respectivement pour *M. bellicosus* et *M. subhyalinus*) alors que chez *M. parvulus* qui était l'espèce qui comportait la population la plus abondante (10^6 /ml de T.D.), seuls 18 morphotypes différents ont pu être identifiés.

Une étude en cours devrait permettre de préciser si les morphotypes isolés sont spécifiques ou communs à plusieurs espèces.

Production de cellulases extracellulaires

Sur les 500 morphotypes sélectionnés (cf. tableau 2), 222 ont produit des cellulases dans le milieu extérieur soit près de 50 %.

L'ensemble de ces observations nous a conduit à sélectionner 73 morphotypes qui présentent un rapport Auréole/Colonie égal ou supérieur à 2,5 et dont la plage de lyse est supérieure à 2 cm en 5 jours.

Toutes les souches sélectionnées par le test au rouge Congo sont mises en culture sur milieu minéral liquide additionné de cellulose microcristalline. Parmi les 73 souches testées, 37 ont pu se développer avec de la cellulose comme seule source de carbone soit plus de 50 %. Plusieurs souches ayant des rapports A/C élevés quand elles sont cultivées sur milieu solide avec de la carboxyméthylcellulose comme source de carbone, n'ont pas présenté de croissance sur cellulose microcristalline

Il n'existe, en fait, pas de corrélation ($r = 0,109$, $p < 0,05$) entre la taille de l'aurole et les capacités de croissance de la souche sur cellulose microcristalline.

Les activités carboxyméthylcellulases (CMCases) ont été recherchées dans le milieu de culture de ces 37 souches. 21 souches se sont révélées capables de produire au moins une endocellulase dans le milieu de culture

Si l'on s'intéresse à l'origine des souches sélectionnées, il apparaît que 75 % de ces souches proviennent de termites dont le régime alimentaire est typiquement

xylophage. Les autres souches sélectionnées proviennent des termites *Amitermes evuncifer* et *Termes hospes* qui sont des xylophages-détritivores.

Espèces		U.F.C/μl TD 10 ²	U.F.C/ TD 10 ²	Nombre de morphot -ypes.
TERMITINAE				
a	<i>Amitermes evuncifer</i> 1	4	16	35
	<i>Amitermes evuncifer</i> 2	2,3	9	37
	<i>Amitermes</i> sp3	5,2	20	31
	<i>Amitermes</i> sp4	5,2	20	25
abc	<i>Microcerotermes parvulus</i>	10	30	18
	<i>Microcerotermes parvus</i>	2,7	6	25
	<i>Termes hospes</i>	4	10	26
	<i>Cubitermes heghei</i>	2	18	20
NASUTITERMITINAE				
ab	<i>Trinervitermes trinervius</i>	3,2	4	35
	<i>Trinervitermes togoensis</i>	4,8	6	34
	<i>Trinervitermes geminatus</i>	3,8	5	26
c	<i>Nasutitermes lujae</i>	6,7	5	42
	<i>Nasutitermes fulleri</i>	8,1	6	52
APICOTERMITINAE				
	<i>Astalotermes quietus</i>	2,3	7	15
MACROTERTERMITINAE				
d	<i>Macrotermes subhyalinus</i>	0,5	5	48
	<i>Macrotermes bellicosus</i>	0,9	8	31

UFC = Unité formant colonie

TD = Tube digestif

Tableau 2 : Étude quantitative et qualitative des actinomycètes cellulolytiques du tube digestif de plusieurs espèces de termites.

a,b,c,d : Une même lettre indique que les concentrations ne sont pas significativement différentes.

Table 2 : Quantitative and qualitative study of cellulolytic actinomycetes from the gut of several termite species.

a,b,c,d : The same letter indicates that the concentrations are not significantly different.

DISCUSSION

Les résultats des dénombrements montrent que l'ensemble des termites supérieurs étudiés au cours de ce travail hébergent dans leur tube digestif une microflore actinomycétale cellulolytique importante et diverse dont l'importance varie entre $2,3 \times 10^5$ et 10^6 actinomycètes par ml de tube digestif. Ce nombre est non négligeable par rapport aux densités bactériennes totales habituellement dénombrées dans le tractus digestif des termites qui varient entre 10^8 et 10^{10} bactéries/ml (Krasil'nikov et Satdicov, 1970 ; Shultz et Breznack, 1978 ; Brauman *et al.*, 1987). Par contre, le nombre d'actinomycètes cellulolytiques est nettement plus élevé que la quantité de bactéries anaérobies cellulolytiques : Elle est inférieure à 100 bactéries par tube digestif chez *N. lujae* (Breznack et Brüne, 1994).

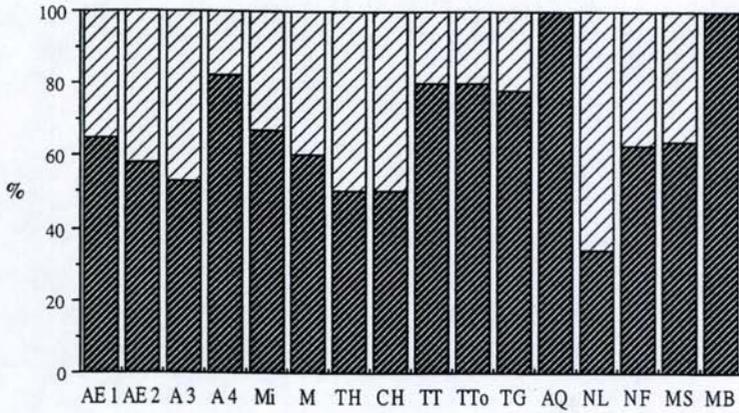


Figure 1 : Pourcentage de souches produisant des cellulases extracellulaires.
Percentage of strains that produce extracellular cellulase.

- % de souches ne produisant pas d'auréoles (% of strains without halo)
 % de souches produisant des auréoles (% of strains with halo)

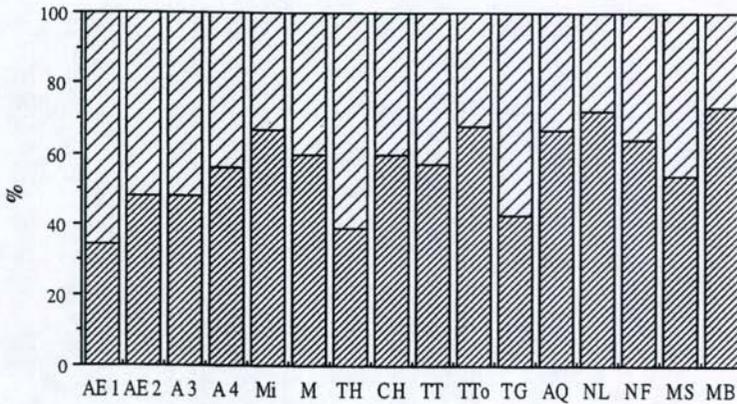


Figure 2 : Pourcentage de souches présentant un rapport A/C supérieur à 2,5.
Percentage of strains who posses A/C superior than 2,5.

- Souches avec auréoles (strains with halo)
 % A/C > 2,5.

Parmi la microflore actinomycétale isolée, plus de 50 % (fig.1) des morphotypes produisent des cellulase, actives sur carboxyméthylcellulose dans le milieu extracellulaire. Ce résultat confirme l'intérêt du tractus digestif des termites pour la recherche de microorganismes cellulolytiques. En effet les travaux de Morvan (1995) sur la microflore du rumen ont montré que la proportion de flore cellulolytique est de 25 % chez la vache, 20 % chez le lama et 8 % chez le mouton; dans l'estomac du cheval, la flore cellulolytique représente 10 %.

Parmi les morphotypes présentant des plages de lyse importantes sur milieu solide, seuls quelques uns ont présenté une bonne activité cellulolytique quand ils sont cultivés sur cellulose microcristalline. Ceci peut être dû soit au fait que le substrat inducteur n'est plus le même soit à la nature du milieu solide ou liquide. Ainsi, Prinzig (1990) a montré que la synthèse de certains antibiotiques ne s'effectue qu'en milieu solide chez deux souches d'actinomycètes (12T 35 et 3T 3) isolées à partir du sol. Il est également possible que l'aurole de cellulolyse observée en milieu solide soit dû non seulement à des enzymes extracellulaires mais aussi à des enzymes de type périplasmique.

75 % des souches cellulolytiques proviennent de termites dont le régime alimentaire est typiquement xylophage (fig.2). Les autres souches sélectionnées proviennent des termites *Amitermes evuncifer* et *Termes hospes* qui sont des xylophages-détritivores. Aucune souche provenant du tube digestif des termites humivores ou champignonnistes n'a présenté de croissance sur le milieu sélectif. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Rouland (1986) qui a montré que, chez plusieurs espèces de termites xylophages (*Microcerotermes parvus* et *Sphaerotermes sphaerotherax*), l'intestin postérieur, riche en microorganismes symbiotiques, est la partie du tube digestif la plus active dans la biodégradation des polysaccharides végétaux. De même, toutes les souches bactériennes non filamenteuses cellulolytiques isolées à partir de tractus digestif de termites proviennent de termites xylophages : *Reticulitermes virginicus* et *Coptotermes formosanus* (Mannesmann, 1972), *Nasutitermes lujae* (Brauman, 1989), *Cephalotermes rectangularis* (Lenoir et Rouland, 1993); Des actinomycètes cellulolytiques ont également été isolés chez des termites xylophages, *Amitermes sp.* et *Microcerotermes parvus*, et champignonnistes, *Odontotermes sp.* (Pasti et Belli, 1985).

REFERENCES

- Azariz, D., 1996. Sélection de souches d'actinomycètes cellulolytiques à partir du tube digestif de termites supérieurs en vue d'application en biotechnologie. Thèse d'Université, Université Paris XII-Val de Marne, 163 p.
- Bignell, D.E., H.Oskarsson and J.M. Anderson, 1979. Distribution and abundance of bacteria in the gut of a soil feeding termite *Procupitermes aburiensis* J. Gen. Microbiol., 117 : 393-403.
- Brauman, A., 1989. Etude du métabolisme bactérien de termites supérieurs à régime alimentaires différenciés. (Mise en évidence d'une nouvelle voie de dégradation du benzoate et du 3-hydroxybenzoate). Thèse de doctorat, Université Aix-Marseille II, 168 p.
- Brauman, A., M. Labat, and J.L. Garcia, 1987. Contribution à l'étude de la microflore hétérotrophe de termites supérieurs à régime alimentaires différenciés. Bull. Sci. Tech. INRA, 22 : 69-78.
- Brauman, A., 1983. Etude de la microflore hétérotrophe d'un termite supérieur *Nasutitermes arborum*. DEA, U. Paris XII, 110 p.
- Breznak, J.A. and A. Brüne, 1994. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. Annu. Rev. Entomol., 39 : 453-487.
- Czolib, R., M. Slaytor, and R.W. O'Brien, 1985. Bacterial flora of the mixed segment and the hindgut of the higher termite *Nasutitermes exitiosus* Hill (Termitidae, Nasutitermitinae). App. and Envi. Microbiol. 49 : 1226-1236.

- Eutick, M.L., P. Veivers., R.W. O'Brien and M. Slaytor, 1978. Dependence of the higher termite *Nasutitermes exitiosus* and the lower termite *Coptotermes lacteus* on their gut flora. *J. Insect. Physiol.*, 24 : 363-368.
- Grassé, P.P. and C. Noirot, 1959. L'évolution de la symbiose chez les Isoptères. *Experientia*, 15 : 365-372.
- Hayakawa, M. and H. Nonomura, 1987. Humic Acid-Vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil Actinomycetes. *J. Ferment. Technol.*, 65 : 501-509.
- Krasil'nikov, N.A., and S.I. Satdikov, 1970. Bacteria of termites intestines. *Microbiologiya*, 39 : 562-564.
- Lenoir-Labé, F. and C. Rouland, 1993. Purification et propriétés de deux osidases produites par des bactéries isolées à partir du tractus digestif de *Cephalotermes rectangularis* (Isoptera, Termitidae). *Act. Coll. IUSSI*, 8 : 71-78.
- Lenoir-Labé, F., 1996. Recherche d'une microflore actinomycétale spécifique du segment mixte de plusieurs espèces de termites supérieurs : Caractérisation et rôles. Thèse d'Université. Université Paris XII-Val de Marne, 135 p.
- Mannesman, R., 1972. A comparison between cellulolytic bacteria of the termites *Coptotermes formosanus* (Shiraki) and *Reticulitermes virginicus* (Banks) *Int. Biodeterior. Bull.*, 8 : 104-111.
- Morvan, B., 1995. Ecologie et physiologie des microorganismes hydrogénéotrophes des écosystèmes digestifs - Etude particulière de l'écosystème ruminant - Thèse d'Université, Université Claude Bernard- Lyon I, 161 p.
- Pasti, M.B., L. Pometto, M.P. Nuti and D.L. Crawford, 1990. Lignin-solubilizing ability of actinomycetes isolated from termite (Termitidae) gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 : 2213-2218.
- Pasti, M.R. and M.L. Belli, 1985. Cellulolytic activity of actinomycètes isolates from termites (Termitidae) guts. *FEMS Microbiol Lett.*, 26 : 107-112.
- Prinzis, S., 1990. Isolement et caractérisation de souches d'actinomycètes. Purification et étude structurale de leurs métabolites antifongiques. Thèse d'Université, Université Claude Bernard Lyon I, 197 p.
- Rouland, C. 1986. Contribution à l'étude des osidases digestives de plusieurs espèces de termites Africains. Thèse de Doctorat ès Sciences, Université Paris XII- Val de Marne, 210p.
- Schultz J.E. and J.A. Breznak, 1979. Heterotrophic bacteria present in hindguts of Wood-eating termite *Reticulitermes flavipes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35 : 930-936.