

MISE EN EVIDENCE DE LA DEGRADATION MICROBIENNE DE MONOMERES AROMATIQUES METHOXYLES EN ANAEROBIOSE CHEZ NASUTITERMES LUJAE

GRECH-MORA I. et GARNIER-SILLAM E.

Laboratoire de Biologie des Sols et des Eaux, Université Paris XII Val de Marne, Av. Général de Gaulle, 94010 Créteil cedex France

Résumé: Au cours de cette étude, une bactérie anaérobie stricte, dégradant des monomères aromatiques méthoxylés, a été isolée du tube digestif du termite xylophage *Nasutitermes lujae*. Cette bactérie dégrade complètement des acides aromatiques méthoxylés trisubstitués en acétate et elle utilise le soufre d'origine minérale et organique comme accepteurs de méthyl pour produire des composés soufrés volatils méthylés. Les acides cinnamiques méthoxylés disubstitués sont partiellement dégradés en catéchol et acétate sans ouverture du noyau aromatique. Les voies métaboliques impliquées dans ce processus sont inconnues. L'importance et le rôle de cette bactérie constituant le genre *Termitobacter aceticus* gen. nov., sp. nov., dans le métabolisme du termite xylophage sont discutés.

Mots-clés: *Termite, Nasutitermes lujae, bactérie anaérobie, aromatiques méthoxylés.*

Abstract: **Degradation of methoxylated aromatic monomers by the strict anaerobic bacterium from the digestive tract of the wood-feeding termite *Nasutitermes lujae*.**

In this study, an anaerobic bacterium which degrades some methoxylated monoaromatic compounds has been isolated from the hindgut of the wood-feeding termite *Nasutitermes lujae*. The isolate converted the trisubstituted methoxylated aromatic acids into acetate. Moreover, this homoacetogenic bacterium used sulfide (mineral) or cysteine (organic) as a methyl acceptor thereby forming gaseous sulfur compounds including dimethylsulfide. In case of the disubstituted methoxylated cinnamic acids, the strain only demethylated and oxidized the lateral aliphatic chain, forming catechol and acetate as end-products. The biochemical pathway remains unknown. The importance and the role of this bacterium considered as the new genus (*Termitobacter aceticus* gen. nov., sp. nov) in the metabolism of *Nasutitermes lujae* are discussed.

Key words: *Termite, Nasutitermes lujae, anaerobic bacterium, methoxylated aromatics.*

INTRODUCTION

Les termites présentent l'originalité d'une co-évolution avec des micro-organismes contenus dans leur intestin postérieur (bactéries chez les termites supérieurs; bactéries et protozoaires chez les termites inférieurs) leur permettant de jouer un rôle significatif dans le recyclage de la matière organique par l'intermédiaire de phénomènes biochimiques de cellulolyse voire de ligninolyse (Garnier-Sillam, 1987). Ces insectes sont en effet en mesure de dégrader les nombreux polymères de la matière végétale en monomères indispensables à leur métabolisme énergétique. Toutefois, le rôle des termites dans la dégradation de la lignine est peu connu. Des études effectuées depuis une quinzaine d'années (Butler et Buckerfield, 1979; Cookson, 1987 a, b) ont permis de mettre en évidence chez *Nasutitermes exitiosus*, espèce de termite supérieur xylophage, des possibilités de déméthylation, de dépolymérisation et d'ouverture des cycles aromatiques (émission de $^{14}\text{CO}_2$ à partir de la ^{14}C -lignine ingérée). Compte tenu des particularités digestives des termites, la microflore symbiotique intestinale pourrait jouer un rôle important dans la digestion des composés lignocellulosiques-et dans les

processus ligninolytiques. Grech-Mora *et al.* (1995) ont isolé une bactérie homoacétogène anaérobie stricte issue du tube digestif du termite xylophage *Nasutitermes lujae* capable de dégrader spécifiquement des monomères aromatiques méthoxylés. La caractérisation de cette bactérie montre qu'elle constitue un nouveau genre du domaine bactérien: *Termitobacter aceticus* gen. nov., sp. nov. Ce travail a pour but d'étudier le métabolisme des acides aromatiques dégradés par cette bactérie.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Termites

L'espèce de termites supérieurs xylophages, *Nasutitermes lujae* (Wasmann) est utilisée pour nos expériences. Cette espèce, arboricole, est abondante en forêt où elle se nourrit de bois mort faiblement biodégradé. *N. lujae* a été récoltée avec son nid dans la forêt de Mbalmayo près de Yaoundé (Cameroun). Elle est maintenue au laboratoire dans une étuve thermostatée à $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

Culture

Les techniques ayant permis l'obtention de l'inoculum bactérien puis de la souche en culture pure ont été décrites (Grech-Mora *et al.*, 1995). La souche bactérienne est maintenue par repiquage sur 3,4,5-triméthoxycinnamate (TMC). Afin d'étudier la dégradation des différents substrats, chaque substrat aromatique est ajouté au milieu de culture, sous forme de sel de sodium à partir de solutions stocks filtrées (filtre millipore stérile de $0,22\mu\text{m}$), à différentes concentrations. Le milieu estensemencé avec une culture en phase exponentielle de croissance, à raison de 10% d'inoculum. L'étude cinétique est effectuée au troisième repiquage.

Techniques d'analyse

Les techniques analytiques utilisées pour l'étude de la dégradation des composés aromatiques (mesure de la densité optique (DO); dosage des produits formés au cours du métabolisme) sont les mêmes que celle employées par Grech-Mora *et al.* (1995). En ce qui concerne le dosage des composés aromatiques, la composition de l'éluant est la seule modification apportée aux conditions opératoires: acétonitrile: eau, 60:40 (v/v).

Le sulfure de diméthyle (DMS) et le méthaneethiol (CH_4SH) n'ont pu être quantifiés au cours de l'expérimentation. Ils ont toutefois pu être détectés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) avec un chromatographe Chrompack CP 9000 (Chrompack, Les Ulis, France) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire Poraplot Q ($25\text{ m} \times 0,53\text{ mm}$). Les conditions opératoires sont les suivantes: température du four: 170°C , température de l'injecteur: 240°C , température du détecteur: 200°C , gaz vecteur: azote, pression: 100 kPa . $0,1\text{ ml}$ d'échantillon gazeux est injecté. La surface des pics est mesurée à l'aide d'un intégrateur Spectra-Physics.

RESULTATS

Métabolisme des substrats aromatiques méthoxylés trisubstitués

Dégradation du sinapate (4-hydroxy-3,5-diméthoxycinnamate)

L'étude de la dégradation de ce substrat montre que les seuls métabolites produits sont, comme lors de la dégradation du TMC (Grech-Mora *et al.*, 1995), l'acétate, le méthaneethiol (CH_4SH) et le sulfure de diméthyle (DMS).

L'effet de différentes concentrations en sinapate (tableau 1) montre que pour des concentrations initiales $\leq 4,21\text{ mM}$, le substrat est intégralement consommé alors que pour des teneurs de l'ordre de $8\text{ à }10\text{ mM}$, 75 à 80% du substrat est utilisé. A l'exception de la concentration la plus élevée ($10,45\text{ mM}$) où le rendement [Acétate produit/Sinapate consommé] diminue, 1 mole de substrat produit environ 4 moles d'acétate.

Concentration initiale en sinapate (mM)	Concentration en sinapate dégradé (mM)	Concentration en acétate formé (mM)	Acétate formé/sinapate dégradé
1,73	1,73	6,75	3,9
3,36	3,36	12,97	3,86
4,21	4,21	15,91	3,78
8,46	6,73	25,80	3,83
10,45	7,89	28,70	3,63

Résultats après 4 jours d'incubation à 37°C

Tableau 1 : Effet de la concentration initiale en sinapate sur la production d'acétate par la souche bactérienne

Table 1 : Bacterial strain growth at different sinapate concentrations

Dégradation du 3,4,5-triméthoxybenzoate (TMB)

L'effet de la concentration en TMB a été étudié pour des valeurs comprises entre 2 et 11,25mM (tableau 2).

Concentration initiale en TMB (mM)	Concentration en TMB dégradé (mM)	Concentration en acétate formé (mM)	Acétate formé/TMB dégradé
2,1	2,1	5,94	2,82
4,12	4,12	12,44	3,02
8,37	8,2	21	2,56
11,25	10,1	24,74	2,45

Résultats après 21 jours d'incubation à 37°C

Tableau 2 : Effet de la concentration initiale en TMB sur la production d'acétate par la souche bactérienne

Table 2 : Bacterial strain growth at different TMB concentrations

Comme dans le cas des composés aromatiques de structure cinnamique, la culture bactérienne produit lors de la dégradation du substrat de l'acétate et des composés soufrés gazeux: DMS et CH₄SH. Par contre, 3 moles d'acétate sont produites par mole de substrat consommée pour les concentrations testées ≤ 4,12mM. Au delà, le rendement est de 2,5 bien que 90% du substrat soit encore consommé pour une concentration de 11,25mM.

Dégradation du syringate (4-hydroxy-3,5-diméthoxybenzoate)

Le syringate est plus difficilement dégradé par la souche bactérienne comparé au TMB. Néanmoins, pour des concentrations < 2-3mM, tout le substrat est dégradé en 3 semaines. Lorsque les concentrations sont supérieures à 3mM, nous observons des phases de latence plus longues et une dégradation incomplète. L'étude de la croissance de la souche bactérienne, effectuée en présence de 4,3mM de substrat, indique qu'après trois semaines d'incubation, plus d'un tiers du composé se trouve présent dans le milieu de culture (tableau 3).

Les métabolites formés lors de la dégradation du syringate sont l'acétate, le DMS et le CH₄SH. La consommation de 1 mole de syringate donne 3 moles d'acétate.

Concentration initiale en syringate (mM)	Concentration en syringate dégradé (mM)	Concentration en acétate formé (mM)	Acétate formé/syringate dégradé
1,9	1,9	5,35	2,81
4,3	3	8,95	2,98

Incubation après 21 jours à 37°C

Tableau 3: Effet de la concentration initiale en syringate sur la production d'acétate par la souche bactérienne

Table 3 : Bacterial strain growth at different syringate concentrations

Métabolisme des substrats aromatiques méthoxylés disubstitués

Dégradation du 3,4-diméthoxycinnamate (DMC)

Production transitoire de vanillate (4-hydroxy-3-méthoxybenzoate)

Le comportement de la souche bactérienne a été étudiée pour une plage de concentrations allant de 2,45 à 28,4mM (concentration des dérivés trisubstitués inhibant totalement la croissance). Au bout de 29 jours d'incubation, seuls les tubes où la concentration initiale est inférieure à 16,25mM ont été testés, au delà la croissance apparaît inhibée. Dans ce cas, l'oxydation de 1 mol de DMC conduit à 1 mol d'acétate et 1 mol de vanillate à l'exception des résultats obtenus pour une concentration en DMC de 8,05 où la teneur en vanillate obtenue reste faible (tableau 4; figure 1). Le DMS est également mesuré dans la phase gazeuse.

Concentration initiale en DMC (mM)	Concentration en DMC dégradé (mM)	Concentration en acétate formé (mM)	Concentration en vanillate formé (mM)
2,45	2,45	2,47	2,47
4,29	4,29	4,41	3,9
8,05	8,05	7,8	5,67
12,3	12,1	11,2	12,25

Résultats après 29 jours d'incubation à 37°C

Tableau 4: Effet de la concentration initiale en DMC sur la production d'acétate et de vanillate par la souche bactérienne

Table 4 : Bacterial strain growth at different DMC concentrations with effect on vanillate and acetate production

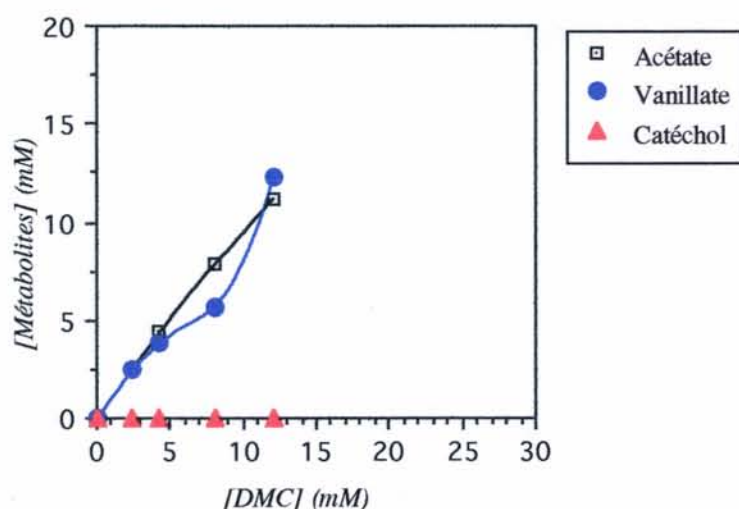


Figure 1: Production d'acétate, de vanillate et de catéchol en fonction de la concentration initiale en DMC
Effect of initial DMC concentration on the production of vanillate, catechol and acetate

Résultats après 29 jours d'incubation

Dégradation du vanillate

Le suivi de la croissance au delà de 29 jours montre que le vanillate, précédemment mesuré, est transformé en catéchol (1,2-dihydroxybenzène) et acétate pour les concentrations initiales en DMC de l'ordre de 7 à 8mM maximum. Pour les concentrations initiales en DMC supérieures, le vanillate s'accumule. La quantité de catéchol produite ne dépasse pas 5 à 6mM (tableau 5; figure 2).

Concentration initiale en DMC (mM)	Concentration en DMC dégradé (mM)	Concentration en acétate formé (mM)	Concentration en vanillate restant (mM)	Concentration en catéchol formé (mM)
2,45	2,45	3	0	2,45
4,29	4,29	5	0	3,2
8,05	8,05	9	0,7	5,4
12,3	12,1	non mesuré	non mesuré	non mesuré
16,25	14,04	13,06	8,25	5,64
23,78	20,07	17,6	14,71	5,30
28,4	25,15	24	22,05	0

Résultats après 62 jours d'incubation à 37°C

Tableau 5: Effet de la concentration initiale en DMC sur la production d'acétate, de vanillate et de catéchol par la souche bactérienne

Table 5 : Bacterial strain growth at different DMC concentrations with effect on vanillate, acetate and catechol production

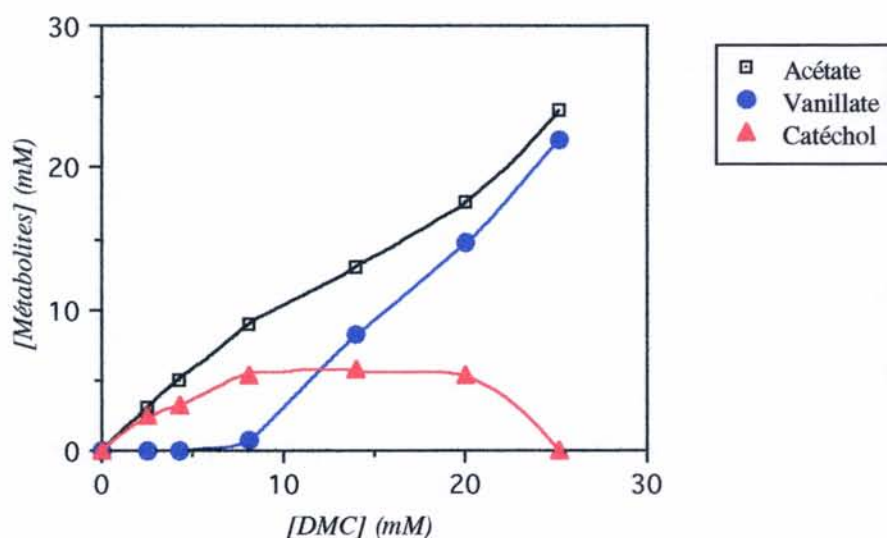


Figure 2: Production d'acétate, de vanillate et de catéchol en fonction de la concentration initiale en DMC
 Effet of initial DMC concentration on the production of vanillate, catechol and acetate

Résultats après 62 jours d'incubation

Dégradation du férulate (4-hydroxy-3-méthoxycinnamate)

La dégradation de ce composé aromatique est incomplète et la croissance bactérienne est très faible. La dégradation de 4,55mM de férulate a montré qu'après 7 semaines d'incubation seul 1,4mM du substrat est catabolisé et 1mM d'acétate et 1,2mM de vanillate sont produites. Le vanillate est ensuite dégradé comme démontré précédemment.

DISCUSSION-CONCLUSION

Termitobacter aceticus, souche bactérienne anaérobie stricte, isolée du tube digestif du termite xylophage *Nasutitermes lujae* (Grech-Mora, 1994; Grech-Mora *et al.*, 1995), fermente spécifiquement des composés aromatiques méthoxylés monomères de la lignine (3,4,5-triméthoxycinnamate, sinapate, 3,4,5-triméthoxybenzoate, syringate, 3,4-diméthoxycinnamate, férulate et vanillate). Toutefois, le nombre et la position des substituants méthoxylés du noyau benzénique sont déterminants pour la croissance de la souche et l'ouverture du cycle aromatique.

Outre le 3,4,5-triméthoxycinnamate déjà étudié (Grech-Mora *et al.*, 1995), les substrats méthoxylés trisubstitués (sinapate, 3,4,5-triméthoxybenzoate, syringate) sont intégralement dégradés en acétate et en composés soufrés volatils méthylés (grâce à la présence de sulfures dans le milieu de culture). Aucun produit organique intermédiaire n'a pu être détecté. Les produits de dégradation sont identiques et, dans tous les cas, la croissance bactérienne n'est inhibée qu'à partir de concentrations supérieures à 10 mM. La capacité de la bactérie à oxyder le sinapate, s'est avérée particulièrement intéressante. Le sinapate est un dérivé de l'alcool sinapylique ($C_{11}H_{14}O_4$), unité monomérique de la lignine. L'ensemble de ces résultats mettent en évidence le rôle que peut jouer la bactérie dans la dégradation de certains monolignols.

Les substrats méthoxylés disubstitués (3,4-diméthoxycinnamate, férulate et vanillate) sont transformés en catéchol avec production concomitante d'acétate, l'ouverture du cycle n'ayant

pas lieu. La bactérie est capable d'hydrolyser la chaîne latérale des composés en C₉ (3,4-diméthoxycinnamate et férulate) avec production d'acétate et de vanillate. Ce dernier s'accumule dans le milieu et est à son tour partiellement oxydé en catéchol par la bactérie. Cette oxydation entraîne une faible production d'acétate laissant supposer un processus de déméthylation et d'une décarboxylation. La production de sulfure de diméthyle n'est obtenue qu'en présence du composé diméthoxylé (3,4-diméthoxycinnamate). Il est à noter que la dégradation du férulate, dérivé de l'alcool coniférylique (C₁₀H₁₂O₃) et autre unité monomérique de la lignine, est très lente indiquant une moindre efficacité de la souche vis à vis de ce type de substrat.

Dans la mesure où cette souche ne dégrade aucun autre substrat (corps aromatiques non méthoxylés, oses...; Grech-Mora *et al.*, 1995), les composés précédemment cités constituent probablement la seule source d'énergie de la souche bactérienne ce qui montre une grande spécificité métabolique.

Importance écologique du métabolisme des corps aromatiques méthoxylés chez le termite

En général, le rôle des symbiontes bactériens des termites dans le processus de délignification est un sujet controversé compte tenu des travaux sporadiques et contradictoires réalisés sur la dégradation des monomères issus de la dégradation des lignines (Breznak et Brune, 1994). Ce type de dégradation n'a jusqu'à présent donné aucun résultat convaincant, ce d'autant que les conditions rédox régnant dans le proctodéum sont mal perçues excepté pour certaines espèces de termites xylophages inférieurs et termites humivores où il a été montré que le proctodéum était un milieu anaérobie (Grassé, 1982; Bignell, 1984) ainsi que chez *Nasutitermes exitiosus*, termite xylophage supérieur appartenant au même genre que *N. lujae* (Veivers *et al.*, 1979). Seule la souche BT, bactérie anaérobie stricte isolée du termite humivore *Cubitermes speciosus* (Brauman, 1989), est capable d'ouvrir le noyau aromatique d'un composé benzoïque hydroxylé. Breznak et Brune (1994) signalent la présence chez *Nasutitermes lujae* d'importantes populations bactériennes capables de dégrader complètement des monomères aromatiques dérivés de la lignine, phénomène uniquement observé en aérobiose. Selon ces auteurs, le clivage du noyau aromatique pourrait avoir lieu en aérobiose.

L'importance de la bactérie *Termitobacter aceticus* dans la physiologie digestive du termite *Nasutitermes lujae* ne peut être parfaitement appréhendée du fait de l'incertitude au niveau du dénombrement de cette bactérie dans le tube digestif du termite (Grech-Mora, 1994). La souche bactérienne montrerait une certaine précarité culturelle en dehors de son habitat naturel ce qui expliquerait les faibles résultats obtenus. Aussi, les difficultés rencontrées lors de sa culture et de son isolement pourraient faire émerger une mauvaise représentation de la bactérie par la méthode du nombre le plus probable (MPN). En effet, elle présente une adaptation particulière et possède des caractéristiques spécifiquement liées au tube digestif de *Nasutitermes lujae* (température, pH, salinité, temps de dégradation des substrats; Grech-Mora, 1994). De plus, la dégradation des monomères aromatiques méthoxylés conduit à la production d'acétate, la principale source énergétique des termites xylophages (Odelson et Breznak, 1983). D'après Breznak et Brune (1994), la production d'acétate à partir du glucose et d'autres intermédiaires de la dégradation de la lignocellulose serait le rôle majeur des micro-organismes du tube digestif. En effet, les termites sont déficients en pyruvate déshydrogénase, enzyme clé dans le processus d'acétogénèse (O'Brien et Breznak, 1984) et les bactéries endogènes leur seraient indispensables pour effectuer cette conversion.

Par ailleurs, le catéchol, issu de la dégradation des structures aromatiques disubstituées, pourrait participer à la formation des composés humiques servant à l'élaboration de la muraille du nid, particulièrement résistante (l'assemblage élémentaire du nid du termite est constitué de déjections et de boulettes cibariales agglomérées), (Garnier-Sillam, 1987). Enfin, la présence de sulfure de diméthyle pourrait jouer un rôle dans la formation du méthane chez les termites ou dans les sols avoisinant les termitières en particulier, par un mécanisme similaire à ce qui a été démontré dans les sédiments d'estuaires (Öremland *et al.*, 1989).

Bien qu'il ne soit pas possible d'affirmer que cette bactérie soit un symbionte du termite, la spécificité de cette souche à utiliser des composés aromatiques dérivés de la lignine pourrait

contribuer à l'amélioration de la digestibilité de la lignocellulose, en particulier pour la dégradation des polysaccharides, chez *Nasutitermes lujae*.

REFERENCES

- Bignell, D.E., 1984. Direct potentiometric determination of redox potentials of the gut contents in the termites *Zootermopsis nevadensis* and *Cubitermes severus* and in three other arthropods. *J. Insect. Physiol.* 30: 169-174.
- Brauman, A., 1989. Etude du métabolisme bactérien de termites supérieurs à régimes alimentaires différenciés. Mise en évidence d'une nouvelle voie de dégradation du benzoate et du 3-hydroxybenzoate. Thèse de l'Université d'Aix-Marseille II, 168 pp.
- Breznak, J.A. & A. Brune, 1994. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Ann. Rev. Entomol.* 39: 453-487.
- Butler, J.H. & J.C. Buckerfield, 1979. Digestion of lignin by termites. *Soil. Biol. Biochem.* 11: 507-513.
- Cookson, L.J., 1987 a. ¹⁴C-lignin degradation by three Australian termites species. *Wood Sci. Technol.* 21: 11-25.
- Cookson, L.J., 1987 b. Influence of laboratory maintenance, relative humidity and coprophagy on ¹⁴C-lignin degradation by *Nasutitermes exitiosus*. *J. Insect. Physiol.* 33: 683-687.
- Garnier-Sillam, E., 1987. Biologie et rôle des termites dans les processus d'humification des sols forestiers tropicaux du Congo. Thèse d'état, Université Paris XII Val de Marne, 276 pp.
- Grassé, P.P., 1982. Anatomie - Physiologie - Reproduction des termites. In: Masson (Ed) *Termitologia Tome I*. 676 pp.
- Grech-Mora, I., 1994. Biodégradation des parois végétales lignifiées par deux espèces de termites xylophages. Mise en évidence de la dégradation microbienne de monomères aromatiques méthoxylés en anaérobiose chez *Nasutitermes lujae*. Thèse de l'Université Paris XII-Val de Marne, 172 pp.
- Grech-Mora, I., M-L. Fardeau, B.K.C. Patel, B. Ollivier, A. Rimbault, G. Prensier, J-L. Garcia & E. Garnier-Zarli, 1995. Isolation and characterization of *Termitobacter aceticus* gen. nov., sp. nov. from the digestive tract of the wood-feeding termite *Nasutitermes lujae*. *Int. J.Syst. Bacteriol.* Soumis.
- O'Brien, R.W. & J.A. Breznak, 1984. Enzymes of acetate and glucose metabolism in termites. *Insect. Biochem.* 14: 639-643.
- Odelson, D.A. & J.A. Breznak, 1983. Volatile fatty acid production by the hindgut microbiota of xylophagous termites. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1602-1613.
- Oremland, R.S., R.P. Kiene, I. Mathrani, M.J. Whiticar & D.R. Boone, 1989. Description of an estuarine methylotrophic methanogen which grows on dimethyl sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 994-1004.
- Veivers, P.C., R.W. O'Brien & M. Slaytor, 1979. The redox state of the gut of termites. *J. Insect. Physiol.* 26: 75-77.