

ETUDE DE LA BIODEGRADATION, *IN VIVO* ET *IN VITRO*, DE POLYMERES GLUCIDIQUES PAR TROIS CHAMPIGNONS DU GENRE *TERMITOMYCES*

IKHOUANE A. et ROULAND C.

Laboratoire d'Ecophysiologie des Invertébrés, Université Paris XII Val de Marne,
Av. Général de Gaulle, 94010 Créteil cedex, France

Résumé : Trois espèces de *Termitomyces*, *T. eurhizus*, *T. sp. bellicosus*, *T. medius*, ont été sélectionnées en fonction de leur importance écologique. Leurs termites hôtes (*Pseudacanthotermes spiniger*, *Macrotermes bellicosus* et *Ancistrotermes guineensis*) contribuent activement dans leur biotope au recyclage des principaux constituants de la matière végétale. Les capacités d'hydrolyse des polysaccharides par ces *Termitomyces* ont été étudiées *in vivo* dans des broyats de mycotêtes et *in-vitro* dans des milieux de culture. Les résultats obtenus montrent que chez *T. eurhizus* et *T. medius*, les activités osidasiques sont induites par les conditions de culture alors que *T. sp. bellicosus* est xylanolytique quelque soit les conditions de culture.

Mots-clés : *Macrotermitinae*, *Termitomyces*, *symbiose*, *osidases*.

Abstract : **Glucidic polymers biodegradation, *in vivo* and *in vitro*, by three termites symbiotic fungi *Termitomyces*.** Three *Termitomyces* species, *T. eurhizus*, *T. sp. bellicosus*, *T. medius* were studied in the present work. These strains were selected mainly because there respective host termites (*Pseudacanthotermes spiniger*, *Macrotermes bellicosus* and *Ancistrotermes guineensis*) contribute to the degradation of principal components of vegetal material and thus they play an important role in tropical biotopes. The capacity of fungi to degrade different polysaccharides (cellulose, xylan, starch...) was tested in nodule homogenates and in culture medium. The metabolism of these components was induced by natural conditions growing in fungal comb.

Key words: *Macrotermitinae*, *Termitomyces*, *symbiosis*, *osidases*.

INTRODUCTION

En Afrique intertropicale, les termites qui représentent la biomasse la plus importante des sols ont une influence considérable aussi bien écologique qu'économique par leur régime alimentaire et leur opportunisme. Cette importance dans les processus de décomposition et de recyclage de la matière organique est due à une distribution des espèces dans des biotopes variés qu'ils ont pu coloniser grâce à une diversification de leur régime alimentaire (Woods et Sands, 1978).

L'établissement des équipements enzymatiques de plusieurs espèces de termites africains à régime alimentaire différent a permis de montrer que la plupart de ces insectes ne sont capables de dégrader les différents composés complexes de la matière végétale qu'en faisant appel à des microorganismes symbiotiques (protozoaires, bactéries, champignons) spécialistes de leur dégradation (Abo Katwa, 1978 ; Martin and Martin, 1979 ; Rouland *et al.*, 1986 ; 1989 ; Lebrun *et al.*, 1990).

La symbiose la plus performante est réalisée par les termites *Macrotermitinae*. Ces termites sont capables de recycler 95% de la production annuelle de litière (Collins, 1981)

grâce aux activités enzymatiques exceptionnelles de leur champignon symbionte (Rouland *et al.*, 1991).

S'il est admis maintenant que la relation termite/champignon est essentiellement nutritionnelle, le champignon permettant au termite d'utiliser un certain nombre de composés végétaux pour son alimentation, la spécificité de cette association n'est pas encore clairement établie. Ainsi, un même *Termitomyces* pourrait être cultivé par plusieurs espèces, voire plusieurs genres, de termites et une même espèce de termites pourrait, en fonction de sa distribution géographique, être associée à des *Termitomyces* différents (Heim, 1977 ; Wood et Thomas, 1989). De plus, bien que cette symbiose soit obligatoire (Sands, 1956 ; Rouland *et al.*, 1987 ; Matoub, 1993), il semble que son importance dans la physiologie du termite puisse être différente (Rouland *et al.*, 1991).

C'est pourquoi, nous avons entrepris d'étudier *in vivo* et *in vitro*, le métabolisme osidasique de trois espèces de *Termitomyces* afin d'une part de préciser leur rôle dans la nutrition de leur termite symbionte, d'autre part de préciser l'origine, génétique ou environnementale, de leurs capacités enzymatiques.

MATERIEL ET METHODES

Matériel biologique

Les solutions enzymatiques et les cultures ont été réalisées à partir des mycotêtes de trois souches de *Termitomyces* : *T. medius* champignon symbionte d'*Ancistrotermes guineensis*, *T. eurhizus*, symbionte de *Pseudacanthotermes spiniger* et *T. sp.*, champignon symbionte du termite *Macrotermes bellicosus*, ce champignon ne présentant jamais de carpophore, n'a pas de nom d'espèce, c'est pourquoi pour notre étude nous avons choisi de le désigner sous le nom de *T. sp. bellicosus*.

Isolement et culture des *Termitomyces*

Les mycotêtes, prélevées stérilement dans les termitières, sont lavées dans trois bains d'eau distillée stérile afin de les débarrasser d'impuretés éventuelles. Elles sont ensuite utilisées pour ensemercer des fioles de milieu de Raulin additionné d'un bactéricide, le chloramphénicol (0,5g/l) et d'un fongicide, le benzylpénicilline sodique à cinq cent mille unités. La composition du milieu de Raulin ainsi que le protocole d'isolement des *Termitomyces* ont été décrits par Mora et Rouland (1994).

Les inductions enzymatiques sont réalisées dans des fioles de 100 ml contenant 50 ml de milieu de Raulin additionné de 0,5% d'un des substrats suivants : extraits de meule des trois *Termitomyces*, cellulose, xylane ou amidon. Sur ces différents substrats, la détermination des osidases a été limitée à l'analyse des trois complexes enzymatiques principaux chez ces champignons : cellulolytique, xylanolytique et amylolytique. Les fioles sont incubées à 29°C sous agitation (150 rpm).

Préparation des extraits enzymatiques

La détection des activités enzymatiques *in vivo* est réalisée à partir des mycotêtes des trois souches de *Termitomyces* selon le protocole décrit par Rouland *et al.* (1991).

Pour l'étude du métabolisme *in vitro*, après sept jours de croissance, les milieux de culture sont filtrés et centrifugés à +4°C pendant 20 mn à 15 000 t/mn. Le surnageant constitue la solution enzymatique.

Techniques de dosages enzymatiques

La recherche des activités enzymatique est effectuée selon des techniques de dosage déjà décrites (Rouland *et al.*, 1991). Les sucres réducteurs produits par l'hydrolyse des polysaccharides sont dosés par la microméthode de Somogyi et Nelson (Williams *et al.*, 1978).

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Sedmark et Crossberg (1977).

Les activités enzymatiques sont exprimées en unités (μ moles d'équivalent glucose par minute) par mg de protéines.

RESULTATS

Activités osidasiques présentes dans les mycotêtes des trois espèces de *Termitomyces*

+ Activités oligosaccharidasés (Fig.1a)

Termitomyces eurhizus : Ce champignon se caractérise par une forte activité maltase qui représente plus de 50% des activités oligosaccharidasiques présentes dans les extraits de mycotêtes. Ces extraits sont également actifs sur le cellobiose et le gentobiose alors que le saccharose n'est que très peu hydrolysé. Aucune activité d'hydrolyse du lactose n'a été relevée chez ce champignon.

Termitomyces sp bellicosus : Tous les oligosaccharides testés sont dégradés par l'extrait enzymatique de ce broyat. Le champignon présente trois fortes activités, détectées sur maltose, gentiobiose et cellobiose à un pourcentage d'environ 30% de l'activité totale sur oligosaccharides. Chez ce champignon, le saccharose est peu hydrolysé par les extraits enzymatiques de mycotêtes alors que l'hydrolyse du lactose représente 9% de l'activité totale oligosaccharidase.

Termitomyces medius : Parmi tous les substrats testés seul le gentiobiose et le cellobiose sont fortement hydrolysés par les extraits enzymatiques. Les activités relevées sur ces deux substrats représentent respectivement 65% et 34% de l'activité totale sur oligosaccharides. Le maltose est lui aussi hydrolysé mais dans de très faibles proportions.

+ Activités hétérosidasiques (Fig.1b)

Termitomyces eurhizus : L'activité β -glucosidase est particulièrement forte puisqu'elle représente plus de 70% des activités hétérosidasiques. Ces extraits de mycotêtes sont également actifs sur le β -xyloside. D'autres activités mais beaucoup plus faibles, ont été observées sur N-acétylglucosamine et β -galactoside.

Termitomyces sp bellicosus : 4 substrats sont hydrolysés par les extraits de mycotêtes de ce champignon : le β -xyloside, le β -galactoside, l' α -galactoside et avec une beaucoup plus faible activité le β -glucoside.

Termitomyces medius : Le champignon présente l'essentiel de son activité sur le β -glucoside (plus de 60% de l'activité totale sur hétérosides). Deux autres activités assez fortes sont relevées sur β -xyloside et β -galactoside. L'hydrolyse de ces deux substrats représente près de 20% des activités hétérosidasiques. De très faibles activités sur N-acétylglucosamine et sur α -galactoside sont également détectées.

+ Activités polysaccharidasiques (Fig.1c)

Termitomyces eurhizus : Ce champignon se caractérise par une activité amylase exceptionnellement élevée. Elle représente plus de 60% de l'activité totale sur polysaccharides. De fortes activités sont également notées sur xylane et sur CMC (15% et 13%). La plupart des autres polysaccharides (laminarine, lichénine, galactomannane, glucomannane) sont également hydrolysés mais dans des proportions bien moindres.

Termitomyces sp bellicosus : Ce champignon présente une activité xylanasiq ue importante. Cette activité constitue à elle seule 51% de l'activité totale détectée sur polysaccharides. L'hydrolyse de la CMC et de la lichénine est également importante de l'ordre de 20% de l'activité totale. Les autres polysaccharides comme la laminarine et le glucomannane sont faiblement hydrolysés. La dégradation du galactomannane est pratiquement nulle.

Termitomyces medius : Pratiquement tous les polysaccharides testés sont dégradés par l'extrait de mycotêtes de ce champignon. Cependant les activités relevées dans ces extraits sont beaucoup plus faibles comparées à ceux des deux autres souches de champignons. L'activité xylanasiq ue est la plus importante (26%), l'hydrolyse de l'arabinogalactane et de l'amidon représentent encore respectivement 19% et 17% des activités totales. Le champignon hydrolyse également la laminarine, le galactomannane et la CMC. Seul le glucomannane n'est pas dégradé.

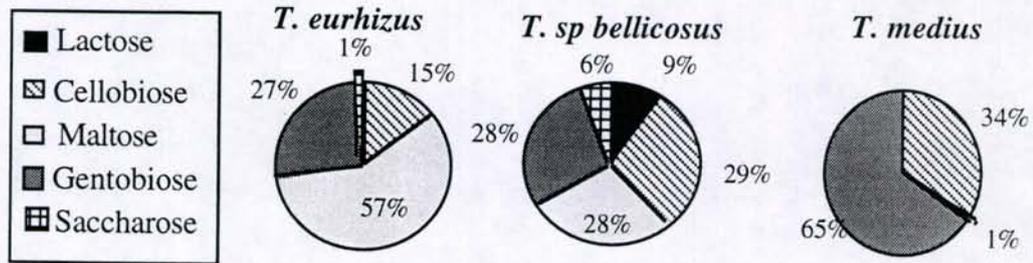


Fig. 1a : activités oligosaccharidasiques

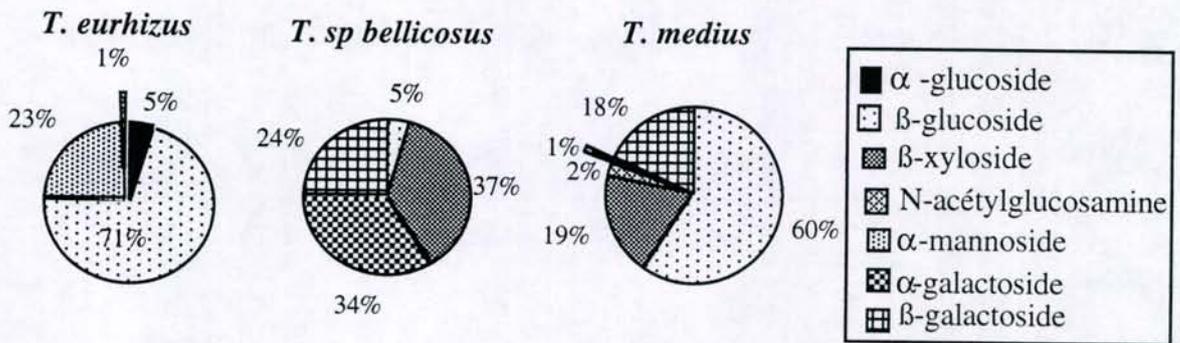


Fig. 1b: activités hétérosidasiques

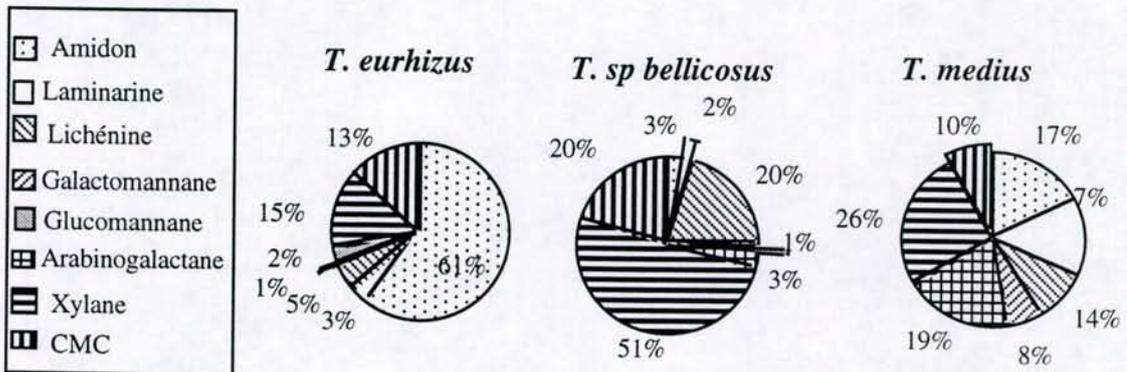


Fig. 1c : activités polysaccharidasiques

Fig 1 : a) oligosaccharidasic activities ; b) heterosidasic activities ; c) polysaccharidasic activities

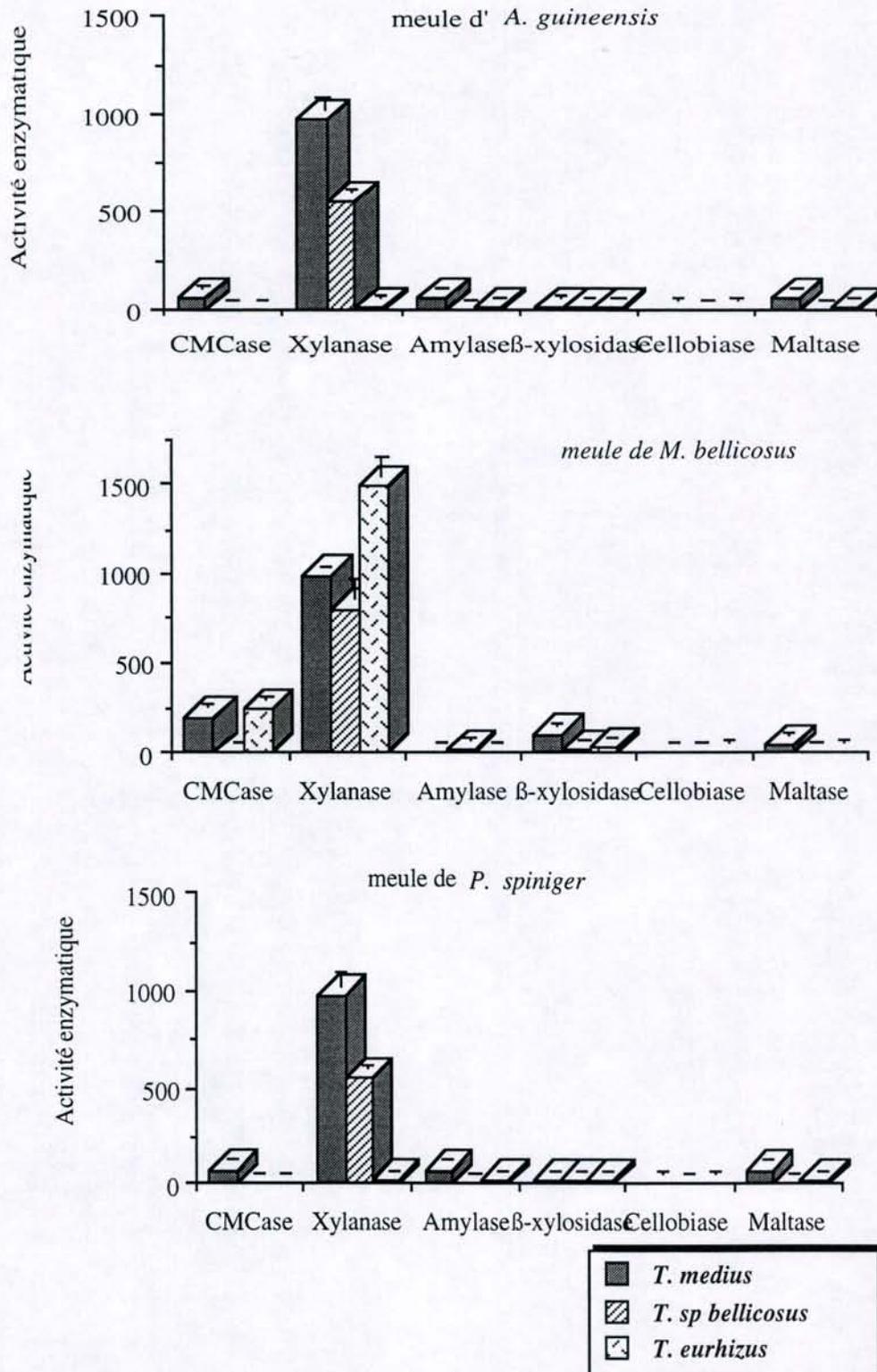


Fig. 2 : Production d'osidases par les Termitomyces en culture sur des extraits de meules. Osidases production by the three Termitomyces cultivated on fungus combs.

Induction de la production d'osidases par les *Termitomyces* en culture sur meule

L'utilisation d'extrait de meules comme source de carbone dans les milieux de culture permet la croissance et la production enzymatique des trois souches de *Termitomyces*. (Fig.2). Les différences métaboliques qui apparaissent sont extrêmement faibles puisque, dans tous les cas, c'est la xylanase qui est produite en majorité. Quelque soit l'espèce et le type de meule la production d'oligosaccharidases est très faible. Enfin, *T. eurhizus* se distingue des deux autres souches par les productions enzymatiques beaucoup moins élevées que celles observées avec les deux autres souches.

Induction de la production d'osidases par les *Termitomyces* en culture sur polysaccharides

+ Sur cellulose microcristalline (Fig.3) les productions d'osidases sont peu importantes pour les trois *Termitomyces* et toujours inférieures à 15×10^{-3} $\mu\text{moles/mn/ml}$. Bien que présentant une faible activité, les enzymes du complexe cellulolytique sont induites dans ce milieu chez les trois espèces. Les autres activités osidasiques en particulier les activités xylanolytiques (xylanase et β -xylosidase) sont également présentes dans les 3 milieux de culture à l'exception du *T. eurhizus* qui ne produit pas de β -xylosidase.

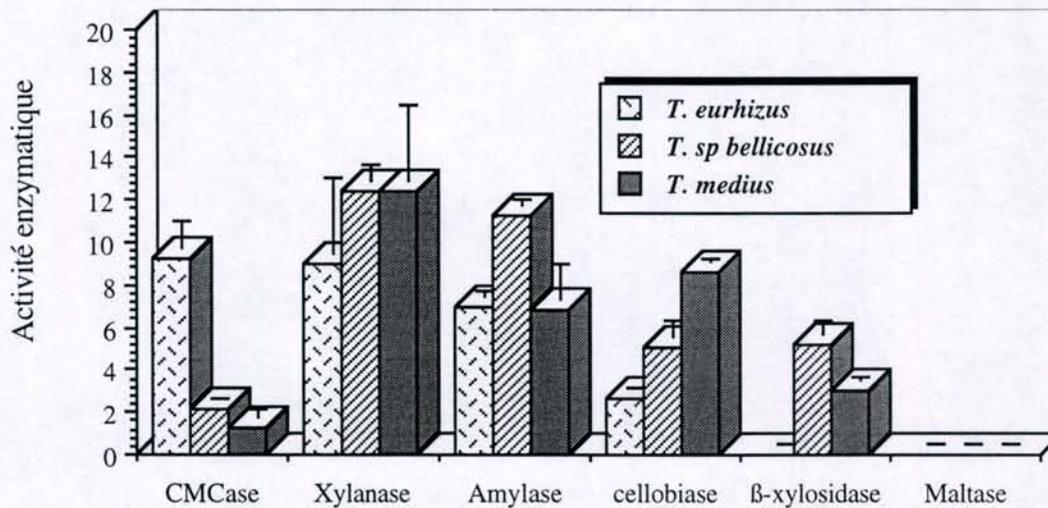


Fig. 3 : Production d'osidases par les trois champignons en culture sur cellulose. Osidases production by the fungi cultivated on cellulose

+ Sur xylane les champignons présentent de fortes productions enzymatiques (Fig.4). Chez *T. sp. bellicosus*, seules les enzymes du complexe xylanolytique (xylanase et β -xylosidase) présentent de fortes activités ($\pm 50 \times 10^{-3}$ $\mu\text{moles/mn/ml}$). En plus de ces fortes activités xylanolytiques, les deux autres espèces de champignon produisent également en très fortes proportions de l'amylase et de la cellobiase.

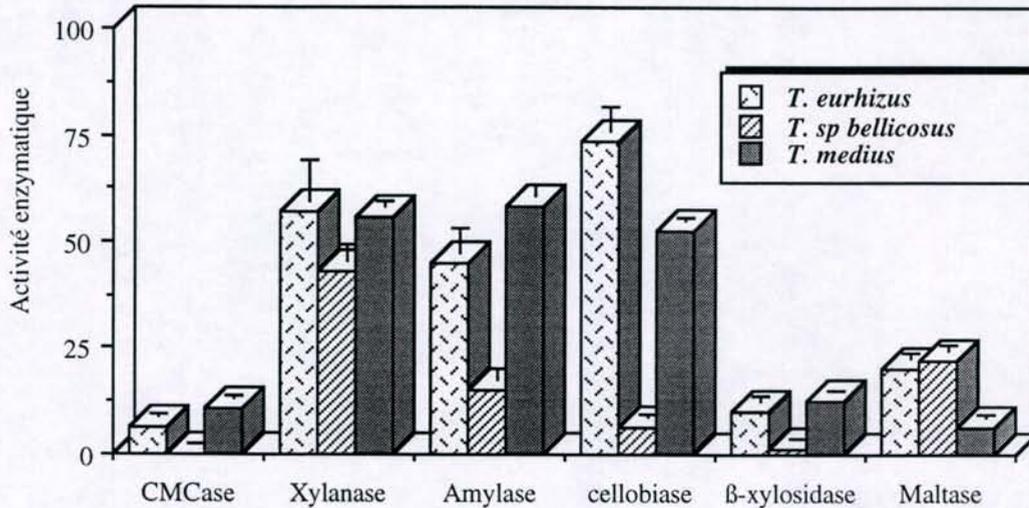


Fig. 4: Production d'osidases par les trois champignons en culture sur xylane. Osidases production by the fungi cultivated on xylane.

+ Dans le milieu de culture contenant de l'amidon (Fig. 5), toutes les enzymes recherchées ont été détectées quelque soit la souche considérée. Les enzymes du complexe amylolytique sont particulièrement abondants mais on note également de fortes activités sur xylane et cellobiose chez *T. sp. bellicosus* et *T. medius*. Chez *T. eurhizus*, par contre, seuls l'amidon et le maltose sont fortement hydrolysés.

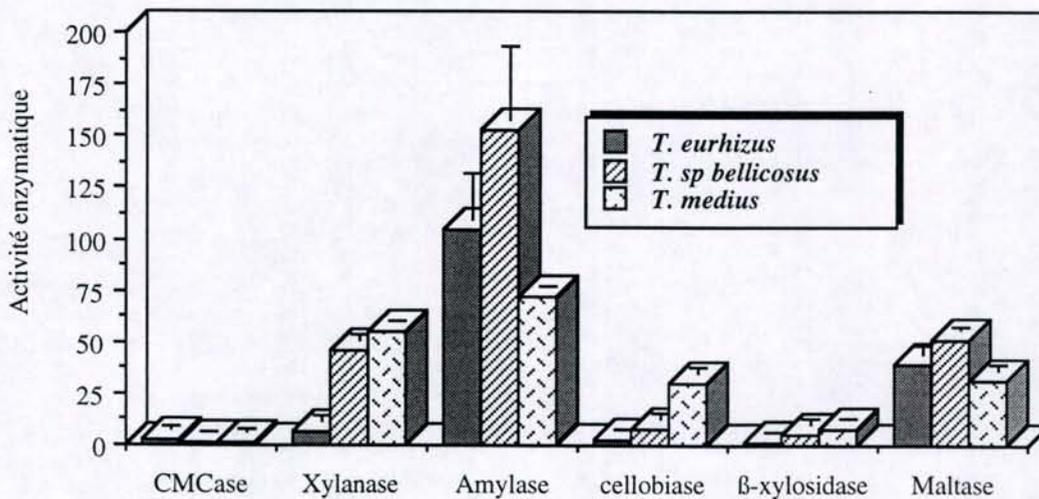


Fig. 5: Production d'osidases par les trois champignons en culture sur amidon. Osidases production by the fungi cultivated on starch.

CONCLUSION

Les résultats du criblage osidasique sur les mycotètes des trois *Termitomyces* montrent que ces trois espèces sont actives sur la plupart des substrats testés, mais elles présentent des spécialisations différentes :

- *T. eurhizus* se caractérise par un très fort complexe amylolytique constitué d'une amylase représentant plus de 60% de l'ensemble des activités polysaccharidases, d'une forte maltase ainsi que d'une α -glucosidase.

-*T. sp. bellicosus* est particulièrement actif sur xylane avec de fortes activités xylanasiques et β -xylosidasiques. Il possède également un complexe cellulolytique efficace (CMCase et cellobiase).

-*T. medius* présente des activités beaucoup plus faibles que celles observées chez les deux autres souches mais plus diversifiées. Les enzymes nécessaires à la dégradation de l'amidon (maltase + amylase), de la cellulose (cellobiase + CMCase) et du xylane (xylanase + β -xylosidase) sont présentes en proportions voisines, indiquant une spécificité beaucoup moins grande de ce champignon.

Ainsi il apparaît que les trois espèces présentent un équipement enzymatique en relation avec le régime alimentaire de leur termite symbiote. *T. eurhizus* dont le termite symbiote consomme, dans le biotope où nous avons travaillé, les bouts blancs des cannes très riches en amidon, est fortement amylolytique, alors que *T. sp. bellicosus*, dont le termite symbiote récolte essentiellement du bois sec, est xylanolytique. *T. medius* présente lui des activités enzymatiques faibles mais variées, il dégrade en particulier certains acides aminés présents dans l'humus (Ikhouane, 1995), ceci pourrait être mis en relation avec le fait que les ouvriers d'*A. guineensis* se nourrissent de débris végétaux souterrains.

Finalement l'ensemble de ces résultats sur les activités *in vivo* montrent que ces trois champignons ne dégradent pas les mêmes substrats. Afin de préciser si les différences enzymatiques observées entre ces espèces sont dues à un équipement génétique spécifique et/ou à leurs biotopes différents, nous avons entrepris de comparer leur production osidasique lorsqu'ils sont cultivés dans les mêmes conditions sur différentes sources de carbone.

Il ressort de cette étude qu'il y a une grande similitude entre le comportement du *T. eurhizus* et du *T. medius* en culture ce qui n'apparaissait pas lors de notre étude *in vivo*. En particulier, dans ces deux espèces, l'amylase et la xylanase, produites indépendamment du substrat de croissance utilisé, seraient des enzymes constitutives alors que la CMCase ne serait induite que lors des cultures sur broyats de meules. Les différences enzymatiques, principalement quantitatives, observées *in vivo* entre ces deux espèces, seraient donc dues essentiellement à leurs conditions de croissance.

Le *T. sp. bellicosus* se distingue nettement des deux autres espèces par l'absence apparente de toute osidase constitutive et par le fait que la plupart des substrats testés ne sont pas inducteurs. En effet, bien que présentant sur la plupart des substrats testés une bonne croissance, *T. sp. bellicosus* ne produit que peu d'enzymes différentes dans le même milieu, l'amidon étant le seul substrat qui permet la sécrétion de l'ensemble des enzymes recherchées. Chez ce champignon, seule la présence dans le milieu de culture d'extraits de meules (riches en lignine et en tannins) entraîne une forte sécrétion de xylanase.

Les champignons étudiés peuvent donc se diviser en deux groupes :

- *T. eurhizus* et *T. medius* qui présentent *in vivo* des activités enzymatiques nettement différenciées, ont un métabolisme très voisin lorsqu'ils sont cultivés dans les mêmes conditions. Leurs différences de capacité enzymatique seraient donc essentiellement liées à leurs conditions de croissance.

- *T. sp. bellicosus* diffère des deux autres espèces *in vivo* et *in vitro*, il présente donc un équipement osidasique qui lui est spécifique.

Ces deux groupes coïncident avec les deux groupes biologiques des ces champignons : *T. eurhizus* et *T. medius* sont des champignons produisant des carpophores ce qui n'est pas le cas du *T. sp. bellicosus*. Les différences biologiques et biochimiques observées entre ses champignons pourraient donc traduire leur appartenance à des groupes évolutifs différents.

REFERENCES

- Abo-Khatwa, N., 1978. Cellulase of fungus growing termites : a new hypothesis on its origine. *Experientia* 34 : 559-560.
- Collins, N.M., 1981. Consumption of wood by artificialy isolated colonies of the fungus growing termites *Macrotermes bellicosus*. *Entomol. Exp. Appl.* 29 : 313-320.

- Heim, R., 1977. Termites et champignons, Ed Boubée, 205 pp.
- Ikhouane, A., 1995. Etude de la biodégradation de polymères végétaux par des champignons du genre *Termitomyces* symbiontes de termites. Thèse d'Université, Paris XII, 170p.
- Lebrun, D., Rouland C. et Chararas C., 1990. Influence de la défaunation sur la survie de *Kaloterme flavicollis*. *Material und Organismen* 25 : 11-14.
- Martin, M.M., Martin J.S., 1979. The distribution and origins of the cellulolytic enzymes of the higher termite *Macrotermes natalensis*. *Physiol. Zool.* 52 : 11-21.
- Matoub, M., 1993. La symbiose termite-champignon chez *Macrotermes bellicosus* (Termitidae Macrotermitinae). Rôle des enzymes acquises dans la xylanolyse. Thèse d'université, Univ. Paris XII-Val de Marne 187p.
- Mora, P., Rouland C., 1994. Comparison of hydrolytic enzymes produced during growth on carbohydrate substrates by *Termitomyces* associated with *Pseudacanthotermes spiniger* and *Microtermes subhyalinus*. *Sociobiology* 26 : 1-15.
- Rouland, C., Chararas C., Renoux J., 1986. Etude comparée des osidases digestives de trois espèces de termites africains à régime alimentaire différent. *C.R. Acad. Sci. Paris* 292 : 677-680.
- Rouland, C., Mora P., Renoux J., 1987. Essai d'interprétation de la symbiose digestive chez *Macrotermes muelleri* (Termitidae, Macrotermitinae). *Act. Coll. U.I.E.I.S.*, 4 : 111-118.
- Rouland, C., Brauman A., Keleke S., Labat M., Mora P., Renoux J., 1989. Endosymbiosis and ectosymbiosis in the fungus growing termites. In *Microbiol. Poeci.*, R. Lésel (Ed), Elsevier science, Amsterdam, 79-82.
- Rouland, C., Lenoir F., Lepage M., 1991. The role of the symbiotic fungus in the digestive metabolism of several species of fungus-growing termites. *Comp. Biochem. Physiol.* 99 A (4) : 657-663.
- Sands, W.A., 1956. Some factors affecting the survival of *Odontotermes badius*. *Insectes Sociaux* 3 : 531-536.
- Williams, J., Villaroya H., Petek F., 1978. Galactosidase II, II and IV from seeds of *Trifolium repens*. *Biochem. J.* 175 : 1069-1077.
- Wood, T.G., Sands W.A., 1978. The role of termites in ecosystems. In "Production Ecology of Ants and Termites" (M.V. Brian, ed.), pp. 245-292. Cambridge Univ. Press, Cambridge.