

**PURIFICATION D'UNE ENDOCELLULASE CHEZ *MACROTREMES*
BELLICOSUS (TERMITIDAE - MACROTREMIDINAE) ET CHEZ SON
CHAMPIGNON SYMBIOTIQUE *TERMITOMYCES* SP.**

MATOUB M. ET ROULAND C.

Laboratoire d'Ecophysiologie des Invertébrés, Université Paris XII Val de Marne,
avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil Cédex (France)

Résumé : Deux endocellulases ont été purifiées. La première, à partir du tube digestif des ouvriers de *Macrotermes bellicosus*. La seconde, à partir des mycotètes du champignon symbiotique *Termitomyces* sp. La comparaison de quelques propriétés biochimiques et structurales indiquerait que ces deux enzymes sont en fait identiques. L'acquisition de cellulase à partir du champignon serait donc possible chez un *Macrotermes* de savane.

Mots clés : Terme, *Termitomyces*, Macrotermidinae, endocellulases, symbiose

Abstract : Purification of an endocellulase from *Macrotermes bellicosus* (Termitidae, Macrotermidinae) and from its symbiotic fungus *Termitomyces* sp. Two endocellulases were purified. One from the digestive tract of the savanna termite *Macrotermes bellicosus* and one from the mycotetes of its symbiotic fungus *Termitomyces* sp. Characterization and comparison of some biochemical and structural properties indicate that these two enzymes are indeed the same. For the first time, acquired cellulase is demonstrated for a savanna *Macrotermes*.

Key words : Termite, *Termitomyces*, Macrotermidinae, endocellulase, symbiosis.

INTRODUCTION

Les termites champignonnistes ont la particularité de cultiver à l'intérieur de leur nid un champignon symbiotique basidiomycète du genre *Termitomyces*. Les premiers travaux concernant le rôle de ce champignon dans la physiologie digestive ont été réalisés chez deux espèces de terme de savane *Macrotermes natalensis* (Martin and Martin, 1978) et *Macrotermes subhyalinus* (Abo Khatwa 1978).

Les dosages d'activité cellulolytique des mycotètes et des ouvriers de *Macrotermes natalensis* (Martin and Martin, 1978) et *Macrotermes subhyalinus* (Abo Khatwa 1978) ont montré que les champignons apportent aux termites les enzymes nécessaires à la digestion de la cellulose. Martin et Martin émettent donc l'hypothèse de l'acquisition de ces enzymes par ingestion de fragments de meule. Les termites possèderaient, alors, le système multienzymatique nécessaire à la dégradation de la cellulose. Cette hypothèse confirme celle de Sands qui, déjà, en 1956, l'avait sous-entendue sans pouvoir la démontrer.

Toutefois, malgré ces premiers résultats, il faut attendre les travaux de Rouland et al. (1988a) pour comprendre chez *Macrotermes muelleri*, le mécanisme de la symbiose terme/champignon. Ces auteurs réalisent pour la première fois une comparaison biochimique des différentes composantes du complexe cellulolytique purifiées à partir du tube digestif des ouvriers de cette espèce et des mycotètes de son champignon symbiotique, *Termitomyces* sp. Ce premier travail, démontre sans ambiguïté, l'origine fongique de l'endocellulase présente dans le tube digestif des ouvriers. Par ailleurs, leurs expériences d'élevage d'ouvriers dans différentes conditions alimentaires montrent qu'ils ne peuvent digérer la cellulose en absence de mycotètes et que les mycotètes seules ou la cellulose seule n'augmente pas leur durée de vie. Celle-ci, d'environ 4 jours, est similaire à celle des ouvriers non alimentés (Rouland et al, 1988b). Enfin, ces auteurs démontrent qu'une exocellulase absente chez le champignon, donc spécifique du terme, et qu'une β -glucosidase différente de celle du champignon, agissent en synergie avec l'endocellulase du champignon pour dégrader avec efficacité la cellulose (Rouland et al, 1988c).

Macrotermes bellicosus, termite de savane, et son champignon symbiotique *Termitomyces sp.*, ont la particularité d'être, contrairement à *Macrotermes muelleri*, termite de forêt, beaucoup plus xylanolytiques que cellulolytiques (Rouland *et al.*, 1991 ; Matoub, 1993). Des résultats antérieurs ont montré que, dans cette espèce, l'endoxylanase présente dans le tube digestif des ouvriers est d'origine fongique et acquise lorsqu'ils consomment de la meule et/ou des mycotêtes (Matoub et Rouland, 1995).

A titre comparatif, il était donc intéressant de voir si le termite de savane, *Macrotermes bellicosus*, pouvait, comme le termite de forêt, *Macrotermes muelleri* (Rouland *et al.*, 1988 d) acquérir, non seulement une xylanase mais également une cellulase.

MATERIEL ET METHODES

Obtention des extraits bruts

Les extraits bruts provenant de 30 g d'ouvriers de *M. bellicosus* ou de 12g de mycotêtes du champignon symbiotique sont obtenus selon un protocole déjà décrit (Matoub et Rouland, 1995)

Technique de dosages

- L'activité cellulasique a été dosée en utilisant la CMC comme substrat et en déterminant, par la microméthode de Somogyi (1945) Nelson (1944) modifiée par Williams (1968), la quantité de sucres réducteurs libérée par l'hydrolyse enzymatique.

- Les protéines sont dosées par le réactif de Bradford (1976) selon la méthode de Sedmak et Grossberg (1977), la sérum albumine bovine servant de standard.

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

Techniques électrophorétiques

Les différentes étapes de purification sont suivies sur des gels de polyacrylamide à 7,5% selon le protocole de Maizel (1964).

Les poids moléculaires sont déterminés en condition native selon la méthode d'Hedrick et Smith (1968), la sérum albumine bovine servant de standard, et en condition dénaturante selon le principe de Laemmli (1970), la phosphorylase A (94 kd), le monomère de la sérum albumine bovine (68kd), l'ovalbumine (45kd), la pepsine (35 kd) et la trypsine (23kd) servant de références.

Techniques chromatographiques

- Chromatographies liquides

L'hydroxyapatite est fabriquée au laboratoire selon la méthode Tiselius *et al.* (1956) modifiée par Levin (1962). Les échangeurs d'ions utilisés (DEAE Sépharose et SP Séphadex) sont précyclés selon les protocoles préconisés par la firme (Pharmacia).

- Chromatographies sur couches minces de silice

La quantité d'enzymes correspondant à environ 1 unité est incubée pendant 12 heures à 37°C en présence de cellulose microcristalline. Le milieu réactionnel est ensuite centrifugé pendant 3 minutes. 1 à 2 gouttes de cet hydrolysate sont déposées sur un gel de silice (F 1500) le glucose, le cellobiose et le cellotriose servant de marqueurs. La migration se déroule dans les conditions décrites par Rouland *et al.* (1988a). Les plaques sont révélées selon la méthode de Petek (1962).

RESULTATS

Purification de la cellulase Cm présente dans les mycotètes du champignon symbiotique *Termitomyces* sp.

L'électrophorèse, suivie d'un découpage du gel et d'un dosage de chaque tranche, d'extrait brut de mycotètes du champignon symbiotique a permis de mettre en évidence une seule activité cellulasique correspondant à une protéine de Rm 0,15.

L'extrait brut obtenu à partir de 12g de mycotètes est déposé sur une colonne d'hydroxyapatite prééquilibrée par un tampon phosphate de potassium pH 5,3 - 2 mM (2,5 x 10 cm). L'élution est réalisée en augmentant la molarité de ce tampon. Une fraction active représentant 74% de l'activité totale déposée n'est pas retenue sur la colonne. Après dialyse contre un tampon Tris HCl, pH 7,6 - 10mM pendant 12 heures à 4°C, elle est déposée sur une colonne de DEAE Sépharose (1,8 x 20cm) prééquilibrée par un tampon identique. La fraction active sur CMC est éluée par 25mM NaCl. A ce stade de la purification, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide colorée au bleu de Coomassie met en évidence deux bandes protéiques. L'activité cellulasique est associée à la bande majeure. Cette fraction, dialysée pendant 12 heures à 4°C contre un tampon acétate de sodium pH 3 - 10 mM, est déposée sur une colonne de SP Séphadex (108 x 8 cm) prééquilibrée par ce même tampon. La fraction active sur CMC est éluée par 100 mM NaCl.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide de cette dernière fraction ne met en évidence qu'une seule bande protéique à laquelle est associée l'activité CMCase (fig 1). Cette fraction purifiée 335 fois par rapport à l'extrait brut avec un rendement de 15% possède une activité spécifique de 94 ± 2 unités par mg de protéines (tableau 1).

Purification d'une cellulase Ct présente dans le tube digestif des ouvriers de *Macrotermes bellicosus*

Deux activités cellulasiques de Rm respectif 0,15 et 0,3 sont mises en évidence sur gel d'électrophorèse d'un extrait brut. L'activité cellulasique que nous avons purifiée est celle présentant un Rm de 0,15.

L'extrait brut provenant de 30g d'ouvriers est déposé sur une colonne d'hydroxyapatite (2,5cm x 10 cm) prééquilibrée par un tampon phosphate de potassium pH 5,3 - 2mM. L'élution, réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, permet l'obtention de deux fractions actives sur CMC. Une première fraction, non retenue, de Rm 0,15 représente 18% de l'activité totale déposée. Une deuxième fraction, représentant 20% de l'activité cellulasique est éluée par 10 mM de ce tampon. La fraction non retenue, dialysée pendant 12 heures à 4°C contre un tampon Tris HCl, pH 7,6 - 10 mM, est déposée sur une colonne de DEAE Sépharose (1,8 cm x 20 cm) prééquilibrée par ce même tampon. La fraction active sur CMC est éluée par 25 mM NaCl. Cette fraction est alors dialysée contre un tampon acétate de sodium pH 3, 10 mM pendant 12 heures à 4°C. Elle est ensuite déposée sur une colonne de SP Séphadex (1,8 cm x 8 cm) prééquilibrée par un tampon identique au tampon de dialyse. Dans ces conditions, la fraction active sur CMC est éluée par ce tampon contenant 100 mM NaCl.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide colorée au bleu de Coomassie de cette fraction (fig 1) ne met en évidence qu'une seule bande protéique à laquelle est associée l'activité CMCase. Ce protocole de purification permet d'obtenir une fraction active, purifiée 28 fois avec un rendement de 20% par rapport à l'hydroxyapatite. L'activité spécifique de cette fraction est de 97 ± 4 unités par mg de protéines (tableau 1).

Etapes	Volumes (ml)	Activité totale unités	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (unités/mg protéines)	purification	rendement (%)
Cellulase Cm						
extrait brut	43	710	2576	0.28	1	100
hydroxyapatite	119	524	100	5.24	19	74
DEAE Sépharose	84	215	2.4	90	320	30
SP Séphadex	15	106	1.13	94	335	15
Cellulase Ct						
extrait brut	44	93	49.5	1.9	1	100
hydroxyapatite	90	17	5	3.5	1.8	18
DEAE Sépharose	52	7	0.14	50	1	100
SP Séphadex	27	3.5	0.036	97	15	42
					28	20

Tableau 1 : Purification des cellulases Cm et Ct.
Purification of the cellulases Cm and Ct

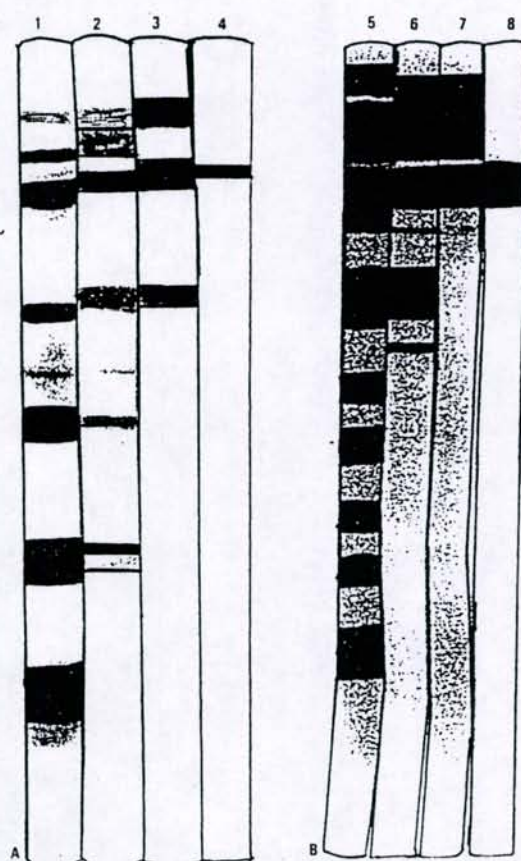


Fig. 1 : Electrophorèse des différentes étapes de purification de la cellulase Ct (A) et de la cellulase Cm(B); 1-5 : extraits bruts, 2-6 : hydroxyapatite, 3-7 : DEAE Sépharose, 4-8 : SP Séphadex.

Electrophoresis of the different purification steps of cellulase Ct (A) and cellulase Cm (B); 1-5 : crude extracts, 2-6 : hydroxyapatite, 3-7 : DEAE - Sepharose, 4-8 : SP-Sephadex.

Propriétés de Ct et Cm

Mode d'action

Les cellulases Ct et Cm sont incubées sur cellulose microcristalline. La chromatographie sur couche mince de silice des surnageants des milieux d'incubation révèle pour les deux cellulases une succession de taches correspondant à la présence de plusieurs oligosaccharides de degrés de polymérisation supérieur ou égal à 2 dont le principal est le cellotétraose. Ces enzymes sont donc des 1,4- β -glucan 4 -glucanhydrolase (EC 3.2.1.4).

Poids moléculaires

Les poids moléculaires déterminés par la méthode d'Hedrick et Smith sont respectivement de 40 ± 4 et 41 ± 4 kDa pour la cellulase du champignon et la cellulase du termite. Les poids moléculaires établis selon la méthode de Laemmli sont de 37 et 38 kDa respectivement pour la cellulase du champignon et la cellulase du termite.

Effet de la concentration en substrat

L'enzyme du termite ou du champignon est incubée en présence de quantité croissante de CMC (0,8 à 1,6% final). La représentation de Lineweaver et Burk (1934) montre que le K_m de ces deux enzymes est de 0,5% (fig 2).

DISCUSSION

Une cellulase de Rm 0,15 a été purifiée à partir du tube digestif des ouvriers de *Macrotermes bellicosus* et une cellulase, de même Rm, à partir des mycotètes de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* Ces deux enzymes ont été purifiées selon un protocole faisant intervenir les mêmes échangeurs d'ions. Les profils d'élutions de ces deux cellulases, pour chacun des supports de chromatographie testés, sont similaires. L'activité spécifique de ces deux enzymes est de 95 unités par mg de protéines. Elles dégradent la cellulose pour produire essentiellement du cellotétraose. Ces deux cellulases sont donc des endocellulases (1 $\rightarrow$ 4 β -glucan 4-glucanhydrolase, E.C : 3.2.1.4). Leur poids moléculaire en condition native (40 kDa), confirmé en condition dénaturante indique une structure monomérique pour ces deux endocellulases. L'effet de la concentration en substrat a également été étudié et leur K_m déterminé (0,5% pour ces deux enzymes).

Ces deux endocellulases présentant des propriétés très voisines pourraient être en fait une seule et même enzyme. La cellulase présente dans le tractus digestif du termite serait, comme l'endoxylanase (Matoub *et al.*, 1995), une enzyme acquise. La comparaison de l'équipement cellulolytique d'animaux élevés sur cellulose en absence ou en présence de mycotètes, comme cela a été fait dans cette espèce sur xylane (Matoub, 1993), devrait nous permettre de confirmer cette hypothèse ou de mettre en évidence un phénomène, nouveau pour les enzymes digestives, de convergence évolutive.

La purification et la caractérisation des autres composantes du complexe cellulolytique de *Macrotermes bellicosus*, à savoir la deuxième cellulase de Rm 0,3 et la β -glucosidase ainsi que l'étude de la production de glucose par l'action concertée de ces trois enzymes devrait permettre de préciser le rôle de ces enzymes, acquises ou non, dans la physiologie digestive des Macrotermitinae.

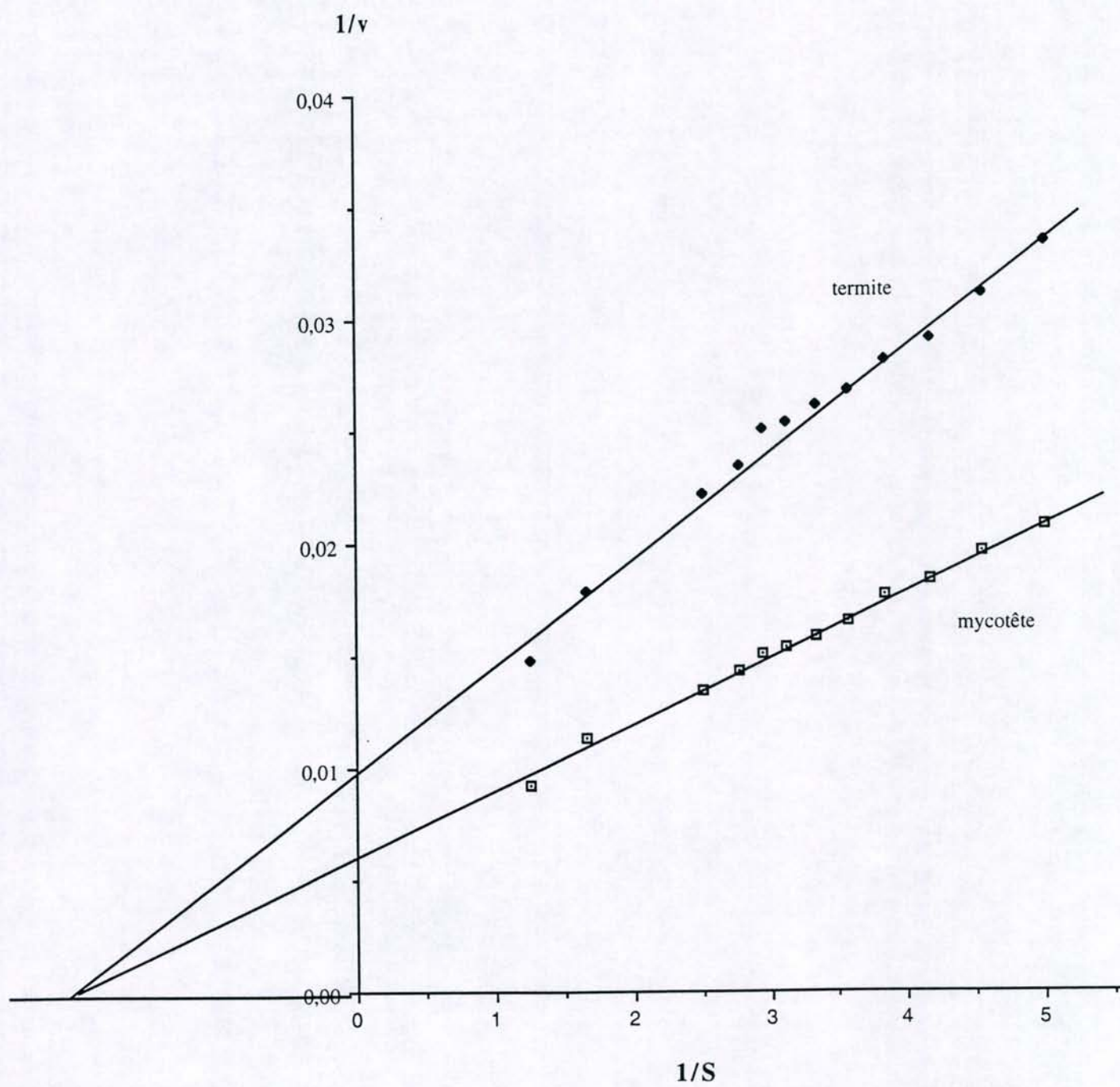


Fig 2 : Effect de la concentration en substrat sur l'activité des deux cellulases purifiées.
Substrate concentration effect on the activity of the purified cellulases.

BIBLIOGRAPHIE

- Abo Khatwa, N., 1978. Cellulase of fungus growing termite : a new hypothesis on its origin. *Experientia*, 34/5 : 559-560.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of mg quantities of protein utilizing the princip of protein dye binding. *Analtic. Chem.*, 72 : 248-254.
- Hedrick, J.L. et Smith, A., 1968. Size and charge separation of molecular weight of protein by disk gel electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 126 : 155-165.
- Laëmmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680-685.
- Levin, O., 1962. Protein chromatography on calcium phosphate columns. *Methods Enzymol.*, 5 : 27-32.
- Lineweaver, H, et Burk, K., 1934. The determination of enzyme dissociation constant. *J. Am. Chem. Soc.*, 56 : 658-666.
- Maizel, J.V. Jr., 1964. Preparative electrophoresis in acrylamide gels. *Ann. N.Y. Acad. Sc.* 121 : 381-390.
- Martin, M.M. et Martin, J.S., 1978. Cellulose digestion in the midgut of the fungus growing termite *Macrotermes natalensis* : the role of acquired digestive enzymes. *Science*, 199 : 1453-1455.
- Matoub, M., 1993. La symbiose termite champignon chez *Macrotermes bellicosus* (Termitidae, Macrotermitinae). Thèse de Doctorat de l'Université Paris XII Val de Marne ;
- Matoub, M., et Rouland, C., 1995. Characterization and comparison of the xylanolytic complex purified from the termite *Macrotermes bellicosus* (Ttermitidae, Macrotermitinae) digestive tract and its symbiotic fungus *Termitomyces sp.*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 112 - 3 : sous presse
- Nelson, N., 1944. Photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 131 : 123-128.
- Rouland, C., Civas, C., Renoux, J., et Petek, F., 1988a. Purification and properties of cellulases from the termite *Macrotermes muelleri* (Termitidae, Macrotermitinae) and its symbiotic fungus *Termitomyces sp.* *Comp. Biochem. Physiol.*, 198 : 440-458.
- Rouland, C., Civas, C., Renoux, J., et Petek, F., 1988b. Synergistic activities of the enzymes involved in cellulose degradation purified from *Macrotermes muelleri* and its symbiotic fungus *Termitomyces sp.* *Comp. Biochem. Physiol.*, 91B : 459-465.
- Rouland, C., Mora, P., et Renoux, J., 1988c. Essai d'interprétation de la symbiose digestive chez *Macrotermes muelleri* (Termitidae, Macrotermitinae). *Actes Coll. Insectes Sociaux*, 4 : 111-118.
- Rouland, C., Renoux, J., et Petek, F., 1988d. Purification and properties of two xylanases from *Macrotermes muelleri* (Termitidae, Macrotermitinae) and its symbioc fungus *Termitomyces sp.* *Comp. Insect Biochem.*, 18 : 709-715.
- Rouland, C., Lenoir, F., et Lepage, M., 1991. The role of the symbiotic fungus in the digestive metabolism of several species of fungus growing termite. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99A : 657-663.
- Sands, W.A., 1956. Some factors affecting the survival of *Odontotermes badius*. *Insectes Sociaux*, 3 : 531-536.
- Somogyi, M., 1945. Determination of blood sugar. *J. Biol. Chem.*, 160 : 61-68.
- Tisselius, A., Hjerten, S. and Levin, O., 1956. Protein chromatography on calcium phosphate columns. *Ann. Biochem. Biophys.*, 65 : 132-155.
- Williams, J., Villaroya, H, et Petek, F., 1968. α -galactosidase II, III and IV from seed of *Trifolium repens*. *Biochem J.*, 175 : 1069-1077.