

## RECHERCHE D'ENZYMES INTERVENANT DANS LA DEGRADATION DE LA LIGNINE CHEZ PLUSIEURS ESPECES DE TERMITES A REGIMES ALIMENTAIRES DIFFERENTS

Philippe MORA<sup>1</sup>, Claude LATTAUD<sup>2</sup> et Corinne ROULAND<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Ecophysiologie des Invertébrés, Université Paris XII Val de Marne - Avenue du Général de Gaulle, 94000 Créteil cedex, France

<sup>2</sup>ORSTOM Ile de France- Laboratoire d'Ecologie des Sols Tropicaux 32, avenue Varagnat, 93000 Bondy cedex 09, France

**Résumé.** La recherche d'enzymes intervenant dans la dégradation de la lignine chez plusieurs espèces de termites à régimes alimentaires différents montre que les termites xylophages et les termites humivores ne possèdent pas les enzymes recherchées. Les termites champignonnistes présentent la particularité de posséder des laccases. Au sein de ce groupe des Macrotermitinae, seules deux espèces secrètent des pyranose oxydases.

**Mots-clés.** *Isoptera, termites, lignine, laccases*

### **Summary. Enzyme involved in lignin degradation among termites with various feeding habits**

Several termite species characterized by different diets were screened for enzymes involved in lignin degradation. Xylophagous and soil-feeding termites had no ligninolytic enzymes. Fungus-growing termites produced laccases and some specificity appeared in this group : only two species exhibited pyranose oxydase activities.

**Key words.** *Isoptera, termites, lignin, laccases*

## INTRODUCTION

Les études biochimiques de la dégradation de la matière végétale par les termites concernent essentiellement l'hydrolyse des polysaccharides. Par contre, peu d'études ont porté sur la dégradation de la lignine. Selon les espèces, le pourcentage de dégradation de la lignine pouvait être très élevé (Butler et Buckerfield, 1979 ; French et Bland, 1975) mais ces premiers travaux ont été largement contestés en raison du peu de spécificité des méthodes employées (Breznak et Brune, 1994). Jusqu'à présent, aucune donnée n'a encore été obtenue sur l'existence, chez ces insectes, des différentes enzymes intervenant dans la dégradation des lignines. Ces enzymes sont de deux types : le groupe de polyphénol-oxydase à savoir les laccases et des peroxydases telles que la lignine peroxydase (LiP) et la manganèse peroxydase (Mn peroxydase). Les deux dernières agissent directement sur la lignine uniquement en présence d'eau oxygénée. Le deuxième groupe d'enzymes regroupe les pyranoses oxydases qui produisent de l'eau oxygénée.

Cette étude a pour objectif la recherche de ces enzymes chez plusieurs espèces de termites à régimes alimentaires différents (humivore, xylophage, champignonniste).

## MATERIEL ET METHODES

**Matériel biologique.** - Cette étude a été effectuée sur :

- 4 espèces de termites xylophages : *Amitermes evuncifer*, *Nasutitermes lujae*, *Reticulitermes santonensis*, *Trinervitermes rhodesiensis*.
- 5 espèces de termites humivores : *Crenetermes albotarsalis*, *Cubitermes speciosus*, *Noditermes sp.*, *Procutitermes arburiensis*, *Thoracotermes macrothorax*.
- 5 espèces de termites champignonnistes : *Ancistrotermes periphraasis*, *Macrotermes bellicosus*, *Macrotermes mülleri*, *Macrotermes renouxi*, *Pseudacanthotermes spiniger*.

**Obtention des extraits enzymatiques.** - Les extraits bruts ont été obtenus selon un protocole déjà décrit (Rouland *et al.*, 1986).

**Dosages enzymatiques** - Laccases : le dosage a été effectué en présence d'ABTS (2,2' - azino bis [3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate]) comme substrat enzymatique (Bourbonnais et Paice, 1990). L'unité enzymatique est définie comme la quantité (en  $\mu\text{M}$ ) d'ABTS oxydé par mn à 37°C.

- Lignine peroxydase (LiP) : l'activité enzymatique a été dosée par une technique colorimétrique basée sur l'oxydation de l'Azur B (Archibald, 1992). L'unité enzymatique est définie comme la quantité (en  $\mu\text{M}$ ) d'Azur B oxydée par mn à 37°C.

- Manganèse peroxydase (Mn peroxydase) : le dosage de la Mn peroxydase a été effectué en présence de rouge phénol et de peroxyde d'hydrogène (Pasczynski *et al.*, 1988). L'activité spécifique est définie comme la quantité de rouge phénol oxydé par mn et par mg de protéines ( $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ ).

- L'activité pyranose oxydase a été déterminée selon la technique décrite par Janssen et Ruelius (1975). L'unité enzymatique est définie comme la quantité (en  $\mu\text{M}$ ) de sucre oxydé par mn à 37°C.

**Dosage des protéines** - La quantité de protéines des solutions enzymatiques a été déterminée selon une méthode basée sur l'emploi de Bleu de Coomassie et utilisant la sérum albumine comme référence (Sedmark et Crossberg, 1977).

## RESULTATS

Les activités LiP et Mn peroxydase n'ont pas été détectées chez toutes les espèces étudiées.

Seules les espèces champignonnistes possèdent une activité laccase (Fig. 1).

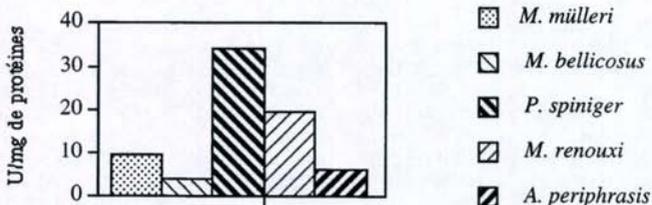


Fig. 1 : Activités laccase chez différentes espèces de termites champignonnistes  
Laccase activities from different species of fungus-growing termites

Les activités les plus élevées ont été mises en évidence chez *P. spiniger* et *M. renouxi* avec respectivement 34 U/mg et 19 U/mg. Les activités des trois autres espèces ne dépassent pas 10 U/mg.

Des activités pyranose oxydases ont été détectées uniquement chez deux espèces champignonnistes (Fig 2.): *P. spiniger* et *A. periphraisis*. Pour ces deux espèces, l'activité la plus importante a été obtenue sur le glucose. Chez *P. spiniger*, cette activité correspond au double de celle d'*A. periphraisis*. Sur les autres sucres, les activités sont plus faibles et restent comprises entre 2 et 10 U/mg.

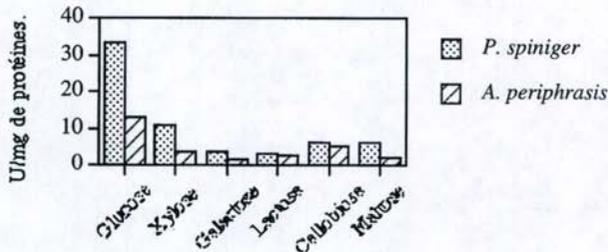


Fig. 2 : Activités pyranose oxydase chez deux espèces de termites champignonnistes  
Pyranose oxidase activities from two species of fungus-growing termites

## DISCUSSION

L'ensemble des résultats montre que les enzymes intervenant dans la dégradation de la lignine n'ont pas été détectées chez les espèces xylophages et humivores. Les termites champignonnistes se caractérisent par une plus grande diversité d'enzymes et en particulier par une activité laccase rencontrée chez toutes les espèces testées. L'absence d'enzyme ligninolytique chez les espèces xylophages peut paraître surprenante puisque c'est dans ce groupe alimentaire que la ligninolyse a été décelée pour la première fois. (Seifert et Becker, 1965 ; Butler et Buckerfield, 1979). L'absence d'activité laccase chez ces espèces, pourrait être due à la nature du substrat utilisé (ABTS). En effet, bien que l'ABTS soit employé très généralement pour l'étude des laccases, ces enzymes peuvent être recherchées en utilisant d'autres substrats, tel que le syringaldazine (Yaver *et al.*, 1996).

Les détections de la Mn peroxydase et de la LiP réalisées à partir de méthodes colorimétriques s'étant révélées négatives, il faudrait à aussi envisager d'utiliser d'autres méthodes telle que l'oxydation du vératryl alcool en UV (Tien et Kirk, 1988). Enfin, outre ces aspects méthodologiques, il est possible que, chez les termites xylophages, la dégradation de la lignine emprunte d'autres voies métaboliques que celles connues actuellement.

En l'absence d'enzyme intervenant dans la dégradation de lignine chez les espèces humivores, on peut supposer que l'assimilation de complexes phénoliques comme la lignine pourrait résulter d'une action physico-chimique et pas uniquement enzymatique. En effet, l'intestin postérieur des termites humivores se caractérise par des pH extrêmement alcalins, le plus souvent voisins de 10 (Bignell et Eggleton, 1996) ; à de tels pH, il est possible qu'une fraction de la lignine et plus généralement les complexes phénoliques soient solubilisés voir minéralisés.

La présence de pyranose oxydases uniquement chez deux espèces de termites champignonnistes, *P. spiniger* et *A. periphraisis*, indique qu'il existe, au sein des

*Macrotermitinae*, des différences spécifiques dans les mécanismes de dégradation de la lignine. L'activité laccase mise en évidence chez l'ensemble des termites champignonnistes étudiés pourrait jouer un rôle essentiel dans la dépolymérisation de la lignine. Cette activité, bien que dosée dans le tractus digestif du termite, pourrait être d'origine fongique car elle est également trouvée dans les mycotêtes de leurs champignons symbiontes (travaux en cours). Ainsi, comme il a été précédemment montré pour les cellulases et les xylanases (Abo-khatwa, 1978 ; Rouland *et al.*, 1988 a et b ; Matoub et Rouland, 1995) les laccases pourraient être des enzymes "acquises". Un prolongement intéressant à ce travail serait donc de purifier et caractériser les laccases présentes chez le termite et chez son champignon symbiotique. Ces nouvelles données pourraient permettre de mieux appréhender le problème complexe de la symbiose termite-champignon chez les *Macrotermitinae*.

## REFERENCES

- Abo-khatwa N., 1978. Cellulase of fungus growing termites : a new hypothesis on its origin. *Experientia* 34, 559-560.
- Archibald F. S., 1992. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye Azure B. *Appl. and Env. Micro.* 58, 3110-3116.
- Bignell D. E. and P. Eggleton, 1996. On the elevated intestinal pH of higher termites (Isoptera: Termitidae). *Insectes Soc.* 42, 57-69.
- Bourbonnais R. and M. G. Paice, 1990. Oxidation of non phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS lett.* 267, 99-102.
- Breznak J. A. and A. Brune, 1994. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annu. Rev. Entomol.* 39, 453-487.
- Butler J. H. and J. C. Buckerfield, 1979. Digestion of lignin by termites. *Soil. Biol. Biochem.* 11, 507-513.
- French J. R. J. and D. E. Bland, 1975. Lignin degradation in the termites *Coptotermes lacteus* and *Nasutitermes exitiosus*. *Mater. Org.* 10, 281-288.
- Janssen F. W. and H. W., Ruelius, 1975. Pyranose oxidase from *Polyporus obtusus*. *Methods in Enzy.* 41 B, 170-171.
- Matoub M. and C. Rouland, 1995. Purification and properties of the xylanases from the termite *Macrotermes bellicosus* and its symbiotic fungus *Termitomyces sp.* *Comp. Biochem. Physiol.* 112 B, 629-635.
- Paszczynski A., R. L. Crawford and V-B. Huynh, 1988. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* : purification. *Methods in Enzy.* 161, 264-270.
- Rouland C., C. Chararas and J. Renoux, 1986. Etude comparée des osidases de trois espèces de termites africains à régime alimentaire différent. *C. R. Acad. Sc. Paris Série III*, 9, 341-345.
- Rouland C., A. Civas, J. Renoux and F. Petek, 1988a. Purification and properties of cellulases from the termite *Macrotermes mülleri* and its symbiotic fungus *Termitomyces sp.* *Comp. Biochem. Physiol.* 91B, 449-458.
- Rouland C., J. Renoux and F. Petek, 1988b. Purification and properties of two xylanases from the termite *Macrotermes mülleri* (Termitidae, Macrotermitinae) and its symbiotic fungus *Termitomyces sp.* *Insect. Biochem.* 18, 709-715.
- Sedmark J. J. and G. Crossberg, 1977. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G 250. *Analyt. Biochem.* 79, 544-552.
- Seifert K. and G. Becker, 1965. Der chemische abbau von laub- und nadelholzarten durch verschiedene termiten. *Holzforschung* 19, 105-111.
- Tien M. and T. K. Kirk, 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzy.* 161, 238-249.
- Yaver D. S., F. Xu, E. J. Golightly, K. M. Brown, S. H. Brown, M. W. Rey, P. Schneider, K. Halkier, K. Mondorf and H. Dalboge, 1996. Purification, characterization, molecular cloning and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. and Envi. Micro.*, 62, 834-841.