

## RÔLE DU CHAMPIGNON SYMBIOTIQUE DANS LE MÉTABOLISME DIGESTIF DE DEUX ESPÈCES DE FOURMIS CHAMPIGNONNISTES

D'ETTORRE P.<sup>1</sup>, MORA P.<sup>2</sup>, DIBANGOU V.<sup>2</sup> & ERRARD C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte UPRES.A CNRS 6035,  
Faculté des Sciences et Technique, Parc de Grandmont, F-37200 Tours

<sup>2</sup>Laboratoire d'Ecophysiologie des Invertébrés, Université Paris XII Val de la Marne,  
Av. Général De Gaulle, F-94010 Créteil Cedex

**Résumé:** *Acromyrmex subterraneus* et *A. crassispinus* sont deux espèces de fourmis champignonnistes. L'objectif de cette étude était de déterminer les rôles respectifs des fourmis et du champignon dans la dégradation de la matière végétale. La détermination des osidases digestifs a été réalisée sur différentes castes des deux espèces de fourmis ainsi que sur le jardin à champignon. Au total, 7 polysaccharides, 5 hétérosides et 6 oligosaccharides ont été testés.

Les ouvrières d'*A. subterraneus* présentent de fortes activités enzymatiques sur l'amidon et le glycogène contrairement aux ouvrières d'*A. crassispinus* dont les activités sont environ dix fois plus faibles. Chez ces deux espèces, les activités majeures concernent la maltase, l' $\alpha$ -1,4 glucosidase et la saccharase. Toutes les activités enzymatiques détectées chez les larves sont supérieures à celles des ouvrières et interviennent non seulement dans la dégradation de l'amidon, mais aussi dans celle du saccharose et de la laminarine.

Le jardin d'*A. subterraneus* se caractérise par des activités majeures sur la laminarine, le xylane et dans une moindre mesure sur la cellulose, alors que le jardin d'*A. crassispinus* présente de surcroît d'importantes activités sur l'amidon, le glycogène et également sur le maltose et le saccharose.

Ainsi, *A. subterraneus* présente un spectre osidasique caractérisé par de fortes activités de l'amylase, de la maltase et de la saccharase alors que dans le jardin à champignon, les activités principales sont celles intervenant dans la dégradation des constituants pariétaux. *Acromyrmex crassispinus* ne semble pas pouvoir dégrader les polysaccharides, rôle qui serait assuré par le champignon du jardin en particulier en ce qui concerne la dégradation de l'amidon.

**Mots-clés:** Fourmis champignonnistes, métabolisme digestif, symbiose.

**Abstract:** Role of the symbiotic fungus in the digestive metabolism of two species of fungus-growing ants.

*Acromyrmex subterraneus* and *A. crassispinus* are two leaf cutting ant species living in symbiosis with a fungus exploited in the nest on fresh leaves harvested by ants.

The aim of the study was to clarify the role of ants and fungus in the degradation of plant materials. To determine the digestive osidases we tested 7 polysaccharides, 5 heterosides and 6 oligosaccharides on workers (*major* and *minor*), larvae and fungus.

Workers of *A. subterraneus* present high enzymatic activities on starch and glycogen, while in *A. crassispinus* they are ten times as low. In both species the major activities are expressed on maltose, saccharose and  $\alpha$ -1,4 glucoside. Larvae degrade starch, saccharose but also laminarin, and all the activities detected are higher as compared of workers.

The symbiotic fungus of *A. subterraneus* is mostly active on laminarin, xylan and cellulose, while the symbiotic fungus of *A. crassispinus* is mostly active on starch, glycogen, maltose and saccharose.

**Key words:** Fungus-growing ants, digestive metabolism, symbiosis.

## INTRODUCTION

Les fourmis champignonnistes, appelées aussi «coupeuses de feuilles» font partie de la tribu des Attini et sont propres à la région néotropicale Sud-Américaine. Elles sont connues pour leur symbiose obligatoire avec le champignon qu'elles cultivent dans la fourmilière sur un «jardin à champignon», constitué de débris végétaux récoltés par les ouvrières. Le champignon, un Basidiomycète, apporterait une source d'énergie à la société de fourmis en lui permettant d'exploiter des ressources autrement inaccessibles. Par ailleurs, les fourmis apportent un substrat approprié au champignon et le protègent contre différents contaminants par la sécrétion d'enzymes et la production d'antibiotiques (Cherret, 1980 ; Wetterer, 1994).

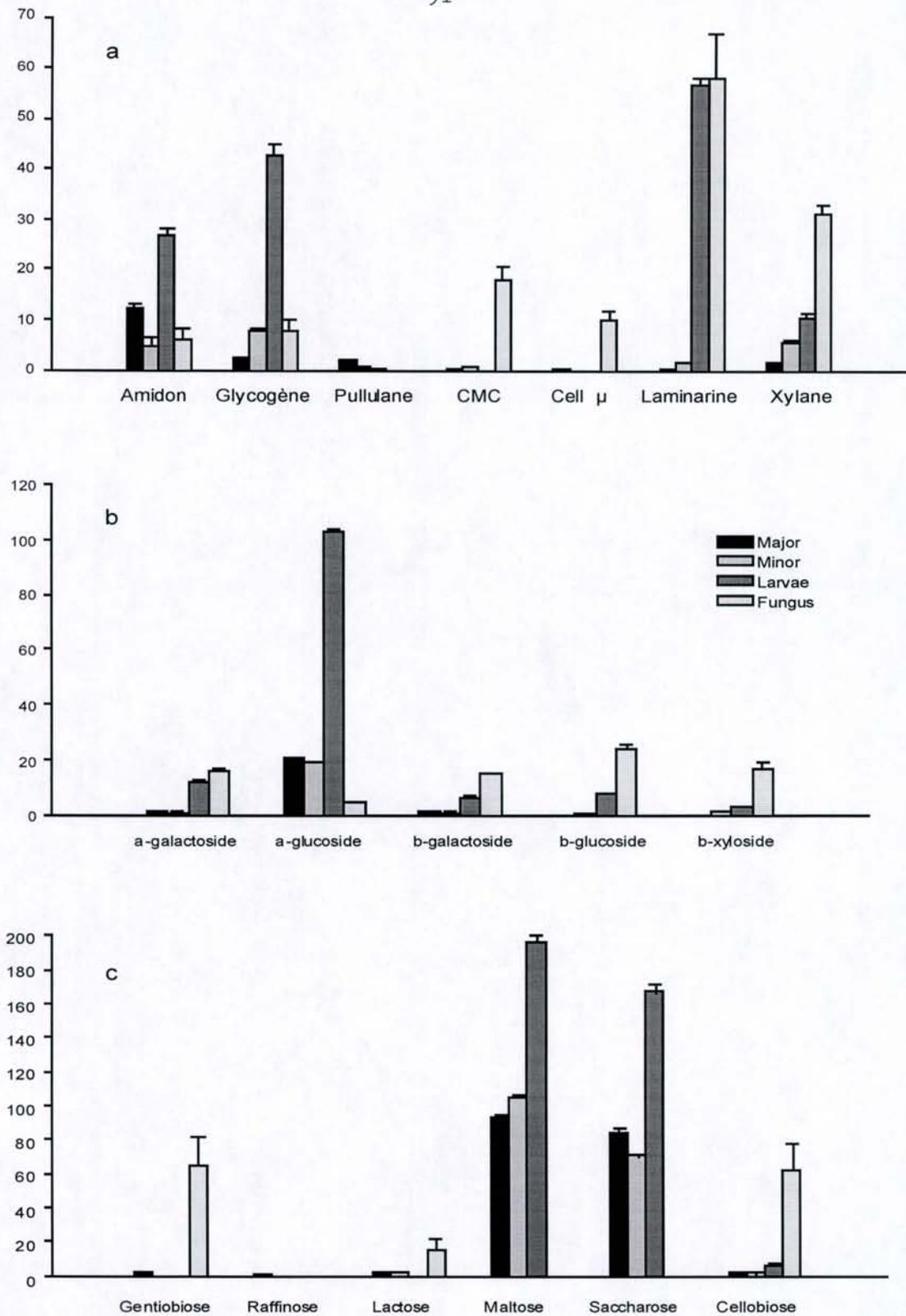
Des travaux ont montré que le champignon, sous forme de mycelium, sert surtout d'aliment aux larves, ses fructifications étant récoltées par les ouvrières, mâchées et régurgitées aux larves (Wetterer, 1994). En ce qui concerne les fourmis adultes, le champignon, bien qu'important pour leur survie, ne leur apporte que le 5% environ de l'énergie nécessaire, le reste étant fourni par la sève des végétaux (Bass & Cherret, 1995). Les plantes découpées par les ouvrières ne sont pas simplement ramenées dans la colonie, mais sont transformées en une sorte de compost qui constitue le substrat idéal pour leur symbiote. Le processus de transformation de la matière végétale serait vraisemblablement amorcé par les fourmis et complété par le champignon. La question fondamentale concerne la capacité du champignon à dégrader les polysaccharides structuraux des plantes qui, normalement, ne peuvent pas être directement utilisés par les fourmis. Dans certaines sociétés du genre *Atta*, le champignon dégrade efficacement la cellulose en la rendant disponible pour son utilisation par les fourmis (Bacci et coll., 1995). Une activité amylasique est présente dans le liquide rectal des fourmis (Martin et coll., 1973), mais chez *Atta texana* la sécrétion des protéases a été remise en question car les activités décelées dans le liquide rectal seraient d'origine fongique (Boyd & Martin, 1975). Par contre, chez *Acromyrmex octospinosus*, la fourmi sécrète ses propres enzymes pour la digestion des polymères  $\alpha$ -glucosidiques qu'elle consomme (Febvay et Kermarrec, 1983). Par ailleurs, dans cette espèce, il existerait un système chitinolytique produit directement par les glandes labiales des fourmis, ce système intervenant dans la digestion des parois chitineuses du champignon symbiotique (Febvay et coll., 1984).

La détermination des osidases digestives des différentes castes de fourmis et du champignon chez différentes espèces pourrait clarifier les rôles respectifs des deux partenaires symbiotiques dans la dégradation de la matière végétale.

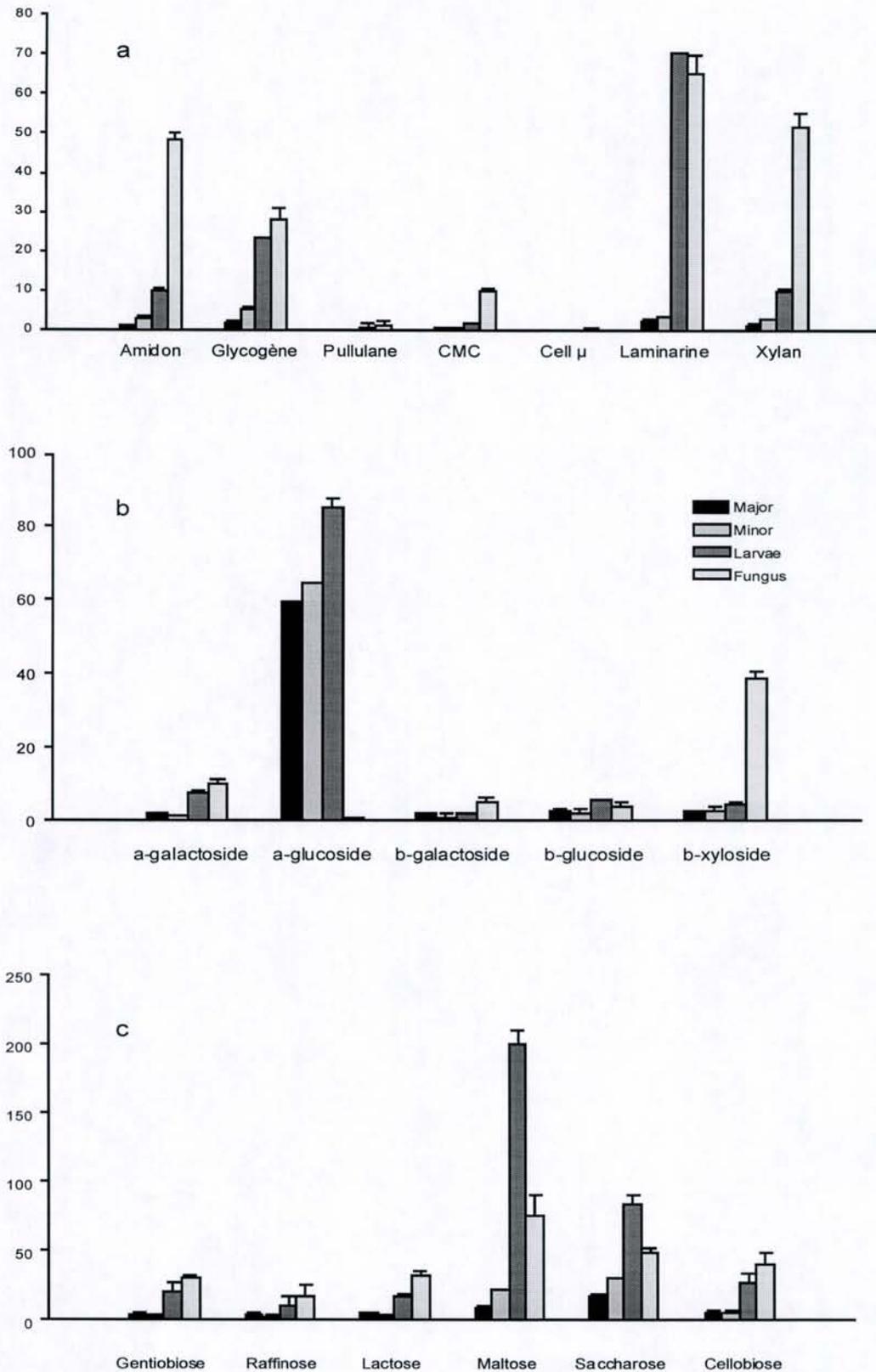
## MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Matériel biologique.* Les analyses sont réalisées sur des colonies d'*Acromyrmex subterraneus* récoltées à Viçosa (M. G., Brésil) et d'*A. crassispinus* récoltées à 250 km de Viçosa, et maintenues au laboratoire à une température de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  et à une hygrométrie relative de  $45 \pm 5\%$ . La photopériode est de 12 : 12. Les colonies sont nourries de façon identique trois fois par semaine avec des fruits (pommes et oranges) et des végétaux (feuilles de troène, pétales de roses et flocons d'avoine). Les nids sont constitués d'une boîte en plastique maintenue à l'obscurité par un cache noir (le jardin à champignon) placée dans un bac servant de milieu extérieur où est déposée la nourriture. L'ensemble est humidifié tous les jours par pulvérisation. Pour les analyses biochimiques, nous avons utilisé : trois castes de fourmis (ouvrières *major*, ouvrières *minor* et larves) et du champignon (prélevé directement dans le jardin) dont nous avons retiré tout élément de couvain.

*Analyse biochimique.* La détection des activités enzymatiques est réalisée à partir des extraits bruts provenant du matériel biologique obtenus selon un protocole déjà décrit chez les termites champignonnistes (Rouland et coll., 1986). Au total 7 polysaccharides (amidon, glycogène, pullulane, carboxyméthylcellulose (CMC), cellulose microcristalline (Cell  $\mu$ ), laminarine, xylane), 5 hétérosides ( $\alpha$ -galactoside,  $\alpha$ -glucoside,  $\beta$ -galactoside,  $\beta$ -glucoside,  $\beta$ -xyloside) et 6 oligosaccharides (gentiobiose, raffinose, lactose, maltose, saccharose, cellobiose) ont été testés.



**Figure 1.** *Acromyrmex subterranean*. Spectres osidasiques des ouvrières (major et minor), larves et champignon sur différents polysaccharides (a), hétérosides (b) et oligosaccharides (c). L'activité est exprimée en  $\mu\text{g}$  de glucose eq. per min. per mg de protéine. Histogrammes giving osidase activities of workers (major and minor), larvae and fungus on various polysaccharides (a), heterosids (b) and oligosaccharides (c). Specific activity values are expressed as  $\mu\text{g}$  of glucose eq. per min. per mg of protein.



**Figure 2.** *Acromyrmex crassispinus*. Spectres osidasiques des ouvrières (major et minor), larves et champignon sur différents polysaccharides (a), hétérosides (b) et oligosaccharides (c). L'activité est exprimée en  $\mu\text{g}$  de glucose eq. per min. per mg de protéine. Histogrammes giving osidase activities of workers (major and minor), larvae and fungus on various polysaccharides (a), heterosides (b) and oligosaccharides (c). Specific activity values are expressed as  $\mu\text{g}$  of glucose eq. per min. per mg of protein.

Les sucres réducteurs produits par l'hydrolyse des polysaccharides sont dosés par la microméthode de Somogy et Nelson (Williams et coll., 1978). Les activités oligosaccharidasiques sont déterminées selon la technique décrite par Janssen et Ruelius (1975). Les activités hétérosidasiques sont mesurées par l'intensité de la coloration jaune résultant de la libération de l'unité nitrophényl.

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Sedmark et Crossberg (1977) qui permet de doser des teneurs en protéines inférieures à 25µg/ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en unités (µmoles d'équivalent glucose par minute) par mg de protéines.

## RÉSULTATS

Les ouvrières d'*A. subterraneus* (*major* et *minor*) présentent de fortes activités enzymatiques sur l'amidon et le glycogène, constituants de réserve des végétaux et du champignon. En revanche, elles ne sont pas capables de dégrader ni la cellulose ni la laminarine, constituants de la paroi végétale (Fig 1a). De plus, une très faible activité enzymatique est détectée sur le substrat xylane. Enfin, les activités majeures ont été détectées sur le maltose et le saccharose (Fig. 1c). Les résultats sont confirmés par la présence d'une activité importante sur l' $\alpha$ -glucoside (Fig. 1b), en sachant que le maltose est un dimère de l'amidon formé de deux unités glucose liées en  $\alpha$ 1,4. En ce qui concerne les larves, l'ensemble de leur activité enzymatique, chez les deux espèces, est supérieure à celles des deux castes d'ouvrières. Comme celles-ci, les larves interviennent dans la dégradation de l'amidon (amylase, maltase,  $\alpha$ -glucosidase), du glycogène et du saccharose, mais cette fois, une très forte activité est présente sur la laminarine (Fig. 1a; Fig. 2a). Le champignon du jardin d'*A. subterraneus* intervient très peu dans la dégradation de l'amidon et du glycogène. En revanche les activités majeures sont exprimées dans l'ordre sur : laminarine, xylane, carboxyméthylcellulose et cellulose microcristalline (Fig. 1a). Ces résultats sont confirmés par l'analyse sur les hétérosides (Fig. 1b). En ce qui concerne les oligosaccharides, le champignon n'est pas capable de dégrader le maltose ni le saccharose (Fig. 1c), ceci étant confirmé par la très faible activité sur l' $\alpha$ 1,4-glucoside (Fig.1b). Le champignon intervient cependant dans la dégradation du cellobiose et du gentiobiose.

Chez les ouvrières (*major* et *minor*) d'*A. crassispinus* les activités enzymatiques qui agissent dans la dégradation de l'amidon et du glycogène sont environ dix fois plus faibles par rapport à celles observées chez *A. subterraneus* (Fig. 2abc). De plus, même si la présence de l' $\alpha$ 1,4-glucosidase est importante (Fig.2b), l'activité enzymatique sur les dimères est très faible (Fig. 2c). En revanche, la dégradation des constituants pariétaux (Fig. 2abc) est comparable à celle d'*A. subterraneus*. En ce qui concerne les larves, on observe une capacité à dégrader l'amidon, le glycogène et le xylane, ainsi qu'une très forte activité sur la laminarine (Fig. 2a). Comparées aux ouvrières homosécifiques, les larves d'*A. crassispinus* présentent une activité plus importante sur les oligosaccharides, principalement le maltose et le saccharose (Fig. 2c). À part l'activité sur les constituants pariétaux, le champignon d'*A. crassispinus*, intervient de façon plus marquée dans la dégradation de l'amidon et du glycogène (Fig. 2a) en comparaison avec le champignon symbiote d'*A. subterraneus* (Fig. 1a). De plus, il présente d'importantes activités sur le maltose et le saccharose (Fig. 2c).

## CONCLUSION

Cette étude préliminaire montre que les rôles respectifs des fourmis et du champignon dans la dégradation de la matière végétale peuvent varier selon les espèces. *Acromyrmex subterraneus* présente un spectre osidasique caractérisé par de fortes activités de l'amylase, de la maltase et de la saccharase alors que dans le champignon du jardin, les activités principales sont celles intervenant dans la dégradation des constituants pariétaux. À l'opposé, les ouvrières d'*A. crassispinus* ne semblent pas pouvoir dégrader les polysaccharides, rôle qui serait assuré par le champignon, en

particulier en ce qui concerne la dégradation de l'amidon. Les différences observées pourraient être la conséquence de contraintes écologiques propres à chacune des espèces. En effet, les nids d'*A. subterraneus* sont situés dans une zone de graminées (sous de grands arbres de type eucalyptus), tandis que les nids d'*A. crassispinus* occupent des zones différentes de la forêt tropicale secondaire, ce qui laisse supposer que ces deux espèces ont, dans des conditions naturelles, des régimes alimentaires différents. Il serait alors intéressant d'élargir cette étude à d'autres espèces ayant également des régimes alimentaires différents.

Un cas particulièrement intéressant est celui des larves des deux espèces. Non seulement elles présentent des activités enzymatiques toujours plus élevées que les ouvrières, mais leur capacité de dégradation des constituants pariétaux comme le xylane et surtout la laminarine, pose le problème de l'origine de leurs enzymes. Le champignon étant la principale source alimentaire pour les larves, ceci suggère une origine fongique des activités enzymatiques détectées chez les larves. La purification des enzymes larvaires et fongiques devrait permettre de tester cette hypothèse.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions la communauté Européenne pour l'aide financière (Marie Curie Fellowship, Fourth Framework Program, Training and Mobility of Researchers, Proposal n. ERB4001GT975111) accordée à Patrizia D'Ettoire, ainsi que le COFECUB (Coopération Universitaire Franco-Bésilienne) qui nous a permis de récolter les fourmis au Brésil.

#### RÉFÉRENCES

- Bacci Jr., M., M.M. Anversa and F.C. Pagnocca, 1995. Cellulose degradation by *Leucocoprinus gongylophorus*, the fungus cultured by the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Antonie van Leeuwenhoek* 67 : 385-386.
- Bass, M. and J.M. Cherrett, 1995. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Physiol. Entomol.* 20 : 1-6.
- Boyd, N.D. and M.M. Martin, 1975. Faecal proteinases of the fungus-growing ant *Atta Texana*: their fungal origin and ecological significance. *J. Insect Physiol.* 21 : 1815-1820.
- Cherrett, J.M., 1980. Possible reasons for the mutualism between leaf-cutting ants (Hymenoptera : Formicidae) and their fungus. *Biol. Ecol. Méditer.* 7 : 113-122.
- Febvay, G., M. Decharme and A. Kermarrec, 1984. Digestion of chitin by the labial glands of *Acromyrmex octospinosus* Reich (Hymenoptera : Formicidae). *Can. J. of Zool.* 62 : 229-234.
- Febvay, G. and A. Kermarrec, 1983. Enzymes digestives de la fourmi attine *Acromyrmex octospinosus* (Reich) : caractérisation des amylases, maltase et tréhalase des glandes labiales et de l'intestin moyen. *C.R. Acad. Sc. Paris* 296 : 453-456.
- Janssen, F.W. and H.W. Ruelius, 1975. Pyranose oxidase from *Polyporus obtusus*. *Methods in Enzy.* 41 : 170-171.
- Martin, M.M., M.J. Gieselmann and J.S. Martin, 1973. Rectal enzymes of attine ants.  $\alpha$ -Amylase and chitinase. *J. Insect Physiol.* 19 : 1409-1416.
- Rouland, C., C. Chararas and J. Renoux, 1986. Étude comparée des osidases de trois espèces de termites africains à régime alimentaire différent. *C.R. Acad. Sc. Paris* 302 : 341-345.
- Wetterer, J.K., 1994. Nourishment and evolution in Fungus-growing ants and their fungi. In : *Nourishment and Evolution in Insect Societies* (J.H. Hunt and C.A. Nalepa, Eds.), Westview, Boulder pp. 309-328.
- Williams, J., H. Villaroya and F. Petek, 1978. Galactosidase II, III and IV from seeds of *Trifolium repens*. *Biochem. J.* 175 : 1069-1077.