

LES TERMITES ET LE DODECATRIENOL

LADUGUIE N., ROBERT A., SALINI N. & BORDEREAU C.

Faculté des Sciences Gabriel-Laboratoire de Zoologie-UA CNRS 674-
6, Bd Gabriel - 21000Dijon - France

Résumé : Le dodécatriénol, déjà identifié chez plusieurs espèces de termites comme phéromone de piste et plus récemment comme phéromone sexuelle, induit un fort suivi de piste chez les ouvriers de *Reticulitermes santonensis* et de *Pseudacanthotermes spiniger*. Cet alcool polyinsaturé a été identifié en CPG-SM chez ces espèces et son rôle de phéromone de piste est confirmé. Le dodécatriénol est également présent chez les ailés de *R. santonensis* et il induit un comportement sexuel chez les mâles. Nous suggérons donc qu'il est le principal composé actif de la phéromone sexuelle. Chez cette espèce, comme chez *P. spiniger*, le dodécatriénol apparaît être à la fois le composant principal de la phéromone de piste et de la phéromone sexuelle. *Nasutitermes lujae* est également très sensible au dodécatriénol. Pourtant, cette molécule n'a pu être identifiée chez cette espèce. Le dodécatriénol que l'on trouve dans le bois dégradé par le champignon *Gloeophyllum trabeum* apparaît de plus en plus comme une molécule au rôle extrêmement important dans la biologie des termites. Le problème de la spécificité des phéromones de piste et des phéromones sexuelles chez les termites est discuté.

Mots-clés : termites, dodécatriénol, phéromone de piste, phéromone sexuelle

Abstract : Termites and dodecatrienol

Dodecatrienol, considered as trail pheromone of several termite species, was identified by GC-SM in workers of *Reticulitermes santonensis* and *Pseudacanthotermes spiniger* where it elicited high trail following behavior. This unsaturated alcohol was also found in alates of *R. santonensis* and it appeared to be the main compound of both sex and trail pheromones. *Nasutitermes lujae* was shown also very sensitive to dodecatrienol although this molecule was not present in this species. Dodecatrienol, which is found in wood decayed by *Gloeophyllum trabeum* appears to be more and more biologically important in termites. The specificity of trail and sex pheromones in termites is discussed.

Key words : termites, dodecatrienol, trail pheromone, sex pheromone

INTRODUCTION

Le ZZE-3,6,8-dodécatrién-1-ol (DTE-OH), l'un des huit isomères du dodécatriénol, est une molécule présente dans la nature, plus particulièrement dans le bois attaqué par le champignon *Gloeophyllum trabeum* (Esenther, 1961). Pour cette raison, lorsque Matsumura *et al.* (1968) l'ont mis en évidence chez un termite inférieur de la famille des Rhinotermitidae, *Reticulitermes virginicus*, Stuart (1969), Blum & Brandt (1972), Tschinkel & Close (1973) ont estimé qu'il s'agissait d'un attractant puissant d'origine alimentaire plutôt que d'une véritable phéromone. Mais Howard *et al.* (1976) ont montré qu'il s'agissait réellement de la phéromone de piste de cette espèce de termite. Des travaux assez récents ont aussi permis de mettre en évidence le DTE-OH chez d'autres Rhinotermitidae : *Reticulitermes speratus* (Yamaoka *et al.*, 1987) et *Coptotermes formosanus* (Tokoro *et al.*, 1989). Notre travail a consisté à analyser l'activité du dodécatriénol et à rechercher sa présence chez trois espèces de termites de modes de vie et de degrés évolutifs différents : *R. santonensis*, termite inférieur qui vit à l'intérieur même du bois dont il se nourrit; *Pseudacanthotermes spiniger*, termite supérieur champignoniste africain récoltant des matières végétales herbacées ou ligneuses;

Nasutitermes lujae, termite supérieur africain xylophage au nid arboricole.

MATERIEL ET METHODES

Le DTE-OH que nous avons utilisé est un produit de synthèse aimablement fourni par le Professeur R. Yamaoka de Kyoto.

Tests de suivi de piste

Le test de suivi de piste est un test en Y. L'extrait (concentration en ng de produit de synthèse ou en glande par cm de piste), d'un volume de 10 microlitres est déposé à l'aide d'une microseringue sur la base et l'une des branches du Y. Du solvant, qui sert de témoin, est déposé sur la base également et sur l'autre branche du Y. L'animal testé est déposé dans une arène de plexiglass à la base du Y. On mesure la distance qu'il parcourt en sachant que la base mesure 3cm, et les branches 7cm. Les tests, effectués en lumière rouge, sont répétés 30 fois. A chaque test, on change de papier et d'animal, ainsi que d'ordre de dépôt. On considère que l'extrait est actif si la distance moyenne parcourue est supérieure à 3, c'est-à-dire supérieure au point de l'embranchement, la réponse maximale étant de 10cm.

Test d'attraction sexuelle

Ces tests se font dans une boîte de Petri de 15cm de diamètre dans laquelle on dispose 2 morceaux de papier filtre à équidistance l'un de l'autre et des bords de la boîte. L'un de ces papiers est imprégné de solvant et sert de témoin. L'autre est imprégné de l'extrait à tester. On introduit alors 2 mâles dans la boîte. Il est en effet préférable de les tester par deux car les stimuli visuel et tactile ont un rôle important dans l'excitation sexuelle. Le test dure 5 minutes et on compare le temps passé sur l'un ou l'autre des papiers.

Analyse des extraits

La faible quantité de substance active présente dans un individu a nécessité l'utilisation d'extraits totaux de très nombreux termites. L'inconvénient est que ces extraits contiennent alors une très grande proportion de composés annexes qui doivent être éliminés au maximum avant de pouvoir procéder à l'analyse chimique en CPG-SM.

Nous avons utilisé la méthode classique de piégeage en colonne remplie (colonne Carbowax) suivie d'une analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (colonne CP Wax 58 CB).

L'extrait de départ est constitué d'ouvriers de termites laissés 24h dans du pentane à 4°C. Seuls des ouvriers nourris pendant 4 jours avec du papier filtre ont été utilisés.

Pour *Nasutitermes lujae*, il a été nécessaire d'utiliser une autre technique, inspirée de celle utilisée par Tokoro (1989) et qui consiste en une succession de fractionnements accompagnés de tests biologiques permettant d'isoler la fraction active. Les différents moyens de purification ont été les suivants : colonne de silice 60 avec comme éluants des mélanges de pentane et d'acétate d'éthyle, sep pack silice, avec comme éluants des mélanges de pentane et de dichlorométhane, et HPLC avec une colonne de silice et un éluant composé de 99% de dichlorométhane et 1% d'éthanol.

La fraction active finale a été analysée en CPG-SM au Laboratoire des arômes de l'INRA de Dijon.

RESULTATS

Activité du dodécatriénol de synthèse sur les ouvriers

Les trois espèces suivent une piste tracée avec le dodécatriénol. Chez *Reticulitermes santonensis* et chez *Pseudacanthotermes spiniger*, le seuil d'activité se situe à 10⁻⁴ng par centimètre de piste, une réponse optimale est obtenue pour 10⁻²ng/cm. A plus forte concentration, la moyenne diminue : ce type de réponse est classique pour les phéromones qui agissent généralement dans une gamme de concentrations précises. Chez *Nasutitermes lujae*, la situation est analogue mais le seuil d'activité est encore plus bas, il se situe à 10⁻⁵ ng/cm (Figure 1).

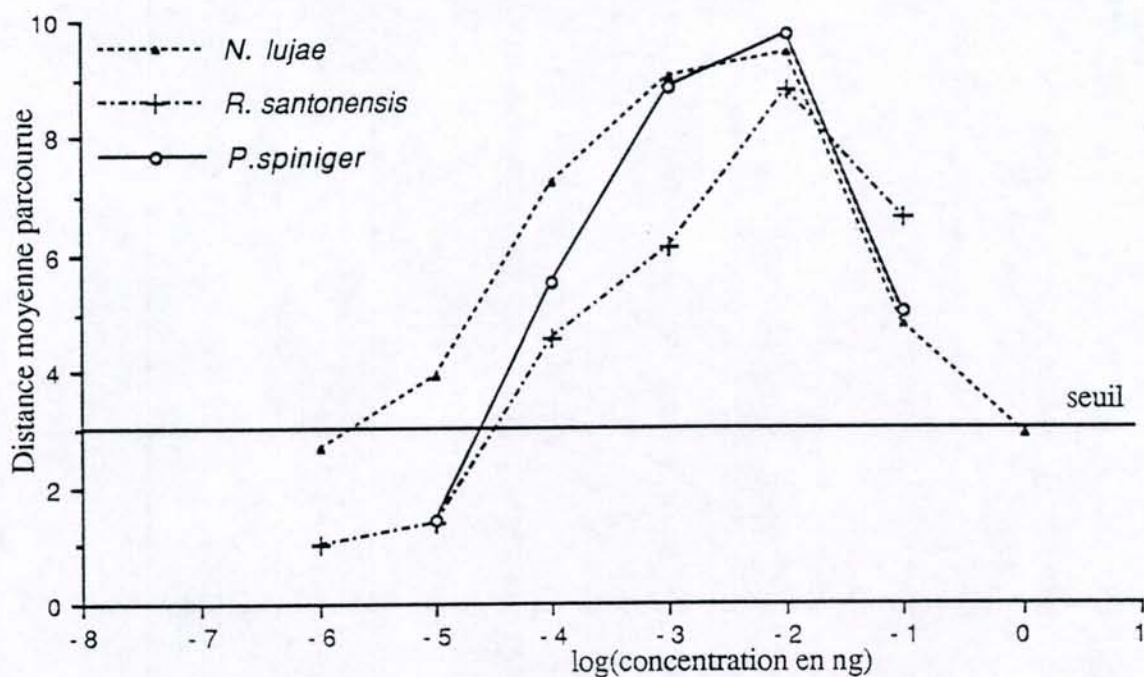


Figure 1 : Réponses des ouvriers de trois espèces de termites au dodécatriénol de synthèse.
 Figure 1 : Responses of the workers of three species of termites to synthetic dodecatrienol.

Recherche de dodécatriénol dans les extraits de termites

Etant donné l'extrême sensibilité des ouvriers des trois espèces étudiées au DTE-OH, nous avons recherché sa présence dans des extraits totaux d'ouvriers de termites. Chez *R. santonensis* (Figure 2) et *P. spiniger*, la CPG-SM a permis d'identifier le DTE-OH.

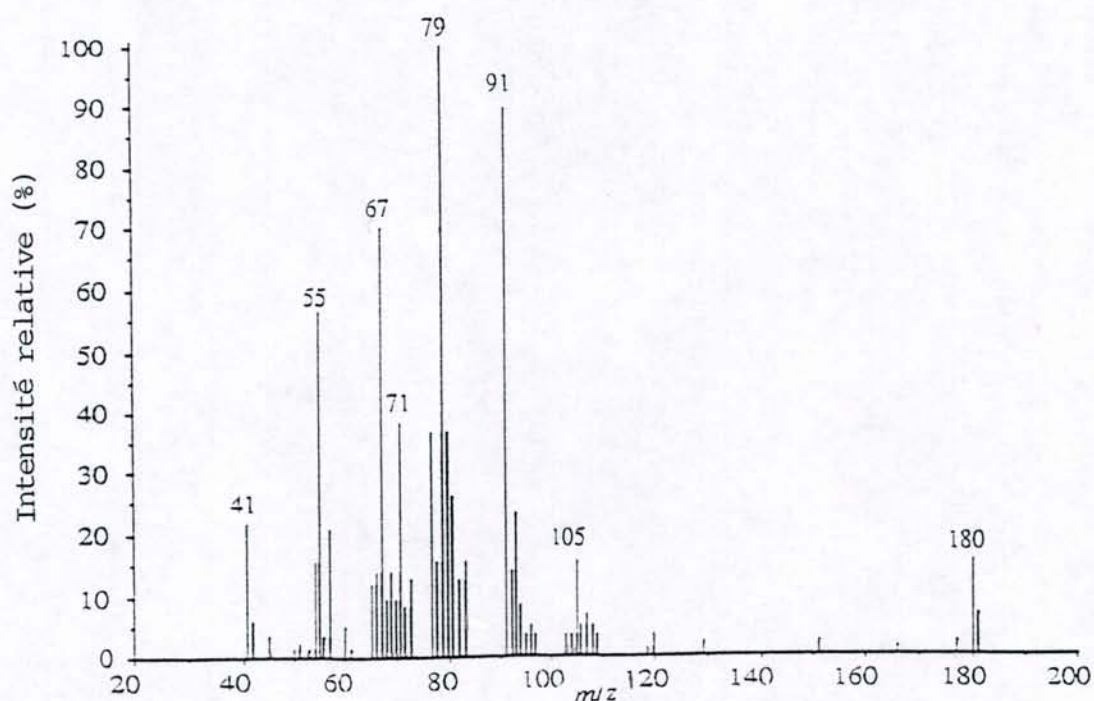


Figure 2 : Spectre de masse du dodécatriénol identifié chez les ouvriers de *R. santonensis*.
 Figure 2 : Mass-spectrum of dodecatrienol identified in workers of *R. santonensis*.

L'origine alimentaire de cette molécule est à écarter puisque les termites ont été nourris uniquement avec du papier Watmann 4 jours avant l'analyse et il a été vérifié que le tube digestif des individus n'induisait aucun suivi de piste.

Chez *N. lujae*, en revanche, le DTE-OH n'a pu être identifié. Pourtant la substance active pour le suivi de piste se retrouve dans les mêmes fractions actives que le DTE-OH au cours des différentes étapes de purification des extraits. Ceci permet de penser que la phéromone de piste de *N. lujae* est chimiquement proche du DTE-OH.

Estimation des quantités de dodécatriénol présentes chez les ouvriers.

En comparant les courbes de réponses au DTE-OH de synthèse et aux extraits de glande sternale, on peut estimer la quantité de DTE-OH à 100pg par individu chez *R. santonensis* (figure 3), et à 10pg par individu chez *P. spiniger* (figure 4). Or, les estimations faites en chromatographie sont de 1 à 10pg par ouvrier de *R. santonensis*. Cette différence peut avoir plusieurs causes, qui peuvent se cumuler. Les pertes dues au piégeage peuvent être plus importantes que prévu (généralement de l'ordre de 50 à 60%), et le DTE-OH synthétique peut contenir des impuretés qui auraient une action inhibitrice sur le suivi de piste. Une autre explication, biologique, consiste à considérer le DTE-OH comme le composé principal de la phéromone, accompagné d'autres composés synergiques dans la production sternale.

Estimation de la quantité de dodécatriénol chez un ouvrier
de *R. santonensis* de *P. spiniger*

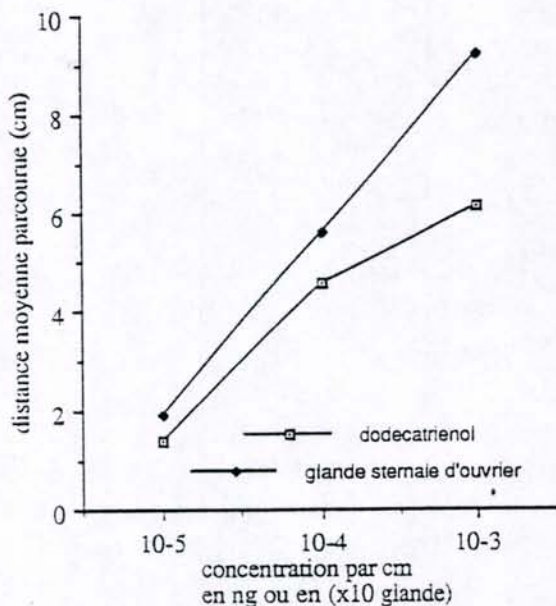


Figure 3

Comparaison des réponses des ouvriers de *R. santonensis* (Fig.3) et *P. spiniger* (Fig.4) au dodécatriénol de synthèse et à un extrait de leur glande sternale. Une bonne corrélation des courbes est obtenue pour une quantité de 0,1ng de dodécatriénol par glande d'ouvrier de *R. santonensis* et 0,01ng pour *P. spiniger*.

Comparison of worker responses to synthetic dodecatrienol and to sternal gland extract (*R. santonensis* : fig.3 and *P. spiniger* : fig.4). A good correlation is obtained for 0,1ng per worker of *R. santonensis* and 0,01ng per worker of *P. spiniger*.

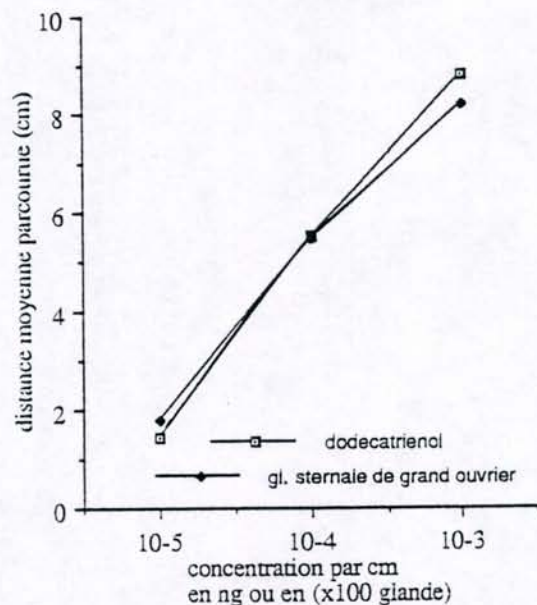


Figure 4

Spécificité

Pour tester la spécificité des phéromones de piste des 3 espèces étudiées, un choix a été proposé à chaque espèce, dans un test en Y, entre une piste de sa propre espèce et une piste de l'une des 2 autres. Les résultats ont montré que l'ouvrier de *P. spiniger* suit préférentiellement une piste de *R. santonensis* ou de *N. lujae*. Ces résultats peuvent s'expliquer au niveau quantitatif en ce qui concerne la piste de *R. santonensis*, qui doit être 10 fois plus concentrée. Le même phénomène est observé lorsqu'un ouvrier de *R. santonensis* choisit préférentiellement sa piste à celle de *P. spiniger*. Par contre, pour *N. lujae*, dont la piste ne contient pas de DTE-OH, on peut émettre l'hypothèse d'un autre produit plus attractif que la vraie phéromone.

Nous avons également testé le DTE-OH sur les grands ouvriers de plusieurs espèces arrivées ponctuellement au laboratoire (tableau 1).

Espèces non sensibles au DTE-OH :			
<i>Kaloterme flavicollis</i> <i>Macrotermes bellicosus</i> <i>Macrotermes subhyalinus</i> <i>Microtermes sp</i>			
Espèces sensibles au DTE-OH (classées selon leur seuil de sensibilité, en ng par cm) :			
10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
<i>Amitermes evuncifer</i> <i>Thoracotermes sp</i> <i>Astalotermes sp</i>	<i>Heterotermes sp</i> <i>Schedorhinotermes lamanianus</i> <i>Ancistrotermes cavithorax</i> <i>Noditermes sp</i> <i>Cephalotermes rectangularis</i> <i>Cubitermes fungifaber</i> <i>Basidentitermes sp</i>	<i>Microcerotermes sp</i> <i>Ophiotermes sp</i> <i>Cubitermes severus</i>	
		<th>10⁻⁵</th>	10 ⁻⁵
		<i>Nasutitermes diabolus</i>	

Tableau 1: Réponses et seuil de sensibilité de diverses espèces au dodécatriénol
Table 1: Responses and sensibility thresholds of various species to dodecatrienol

Pour la très grande majorité d'entre elles, le DTE-OH s'est révélé actif avec des seuils d'activité assez bas. On remarque également que les espèces sensibles appartiennent aussi bien aux termites inférieurs que supérieurs. Mais il ne faut pas généraliser l'activité ni le rôle du DTE-OH chez les termites : une sensibilité à cette molécule n'implique pas pour autant qu'elle ait un rôle biologique.

Phéromone sexuelle

Phéromone sexuelle et phéromone de piste ont la même origine : la glande sternale. Il faut noter également que la phéromone de piste est parfois aussi utilisée lors du comportement sexuel plus précisément lors de la promenade nuptiale.

Chez *R. santonensis*, la CPG-SM a permis de mettre en évidence le DTE-OH dans un extrait d'essaimage. La phéromone sexuelle étant émise par les femelles (Stuart, 1975), nous avons effectué des tests d'attraction sexuelle sur les mâles de *R. santonensis*. Les résultats (tableau 2) montrent que le DTE-OH de synthèse provoque une attraction et une forte excitation des mâles, comparables à celles obtenues avec un extrait de glande sternale femelle.

EXTRAIT (concentration)	TEMPS MOYEN (s) passé sur le papier imprégné d'extrait	TEMPS MOYEN (s) passé sur le papier imprégné de solvant	N
glande sternale de femelle (1 équivalent)	155±36	21±12	10
dodécatrienol (5ng)	173±34	37±14	10

Tableau 2 : Comparaison des temps (moyenne en secondes±SD) passés par les ailés mâles sur les papiers imprégnés de solvant (témoin) et d'extrait (glande sternale femelle ou dodécatriénol de synthèse).

Table 2 : comparison of times (seconds±SD) spent by male alates on control paper (solvant) and extract (female sternal gland or synthetic dodecatrienol).

DISCUSSION

Nous avons montré en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse que le dodécatriénol est présent chez les ouvriers de *R. santonensis* et *P. spiniger* et que la molécule de synthèse de dodécatriénol induit un fort suivi de piste chez ces deux espèces. On peut donc considérer cet alcool insaturé comme étant la phéromone de piste de *R. santonensis* et *P. spiniger*. Toutefois, étant donné la divergence observée dans les quantités de dodécatriénol estimées soit à partir des analyses chromatographiques, soit à partir des réponses aux tests biologiques, il est fort possible que le dodécatriénol ne soit qu'un des composants, probablement le plus important, de la phéromone de piste qui se présenterait donc sous forme d'un bouquet phéromonal, comme cela est fréquent chez les Insectes. Chez *Nasutitermes lujae*, le dodécatriénol n'est pas présent, mais la phéromone de piste lui est probablement très proche chimiquement puisqu'elle se comporte de manière identique face à plusieurs manipulations chimiques.

Le DTE-OH étant le composé actif majeur de la phéromone de piste de plusieurs espèces, il se pose le problème de la spécificité : existe-t-il, comme cela a déjà été suggéré pour d'autres espèces (Kaib *et al.*, 1982), un ou plusieurs composés secondaires permettant à une espèce de reconnaître sa propre piste. Pour les espèces que nous avons étudiées, la réponse est négative, puisque les ouvriers ne manifestent pas de préférence pour leur propre piste. Dans ce cas, l'isolement des espèces est réalisé par d'autres moyens que l'utilisation de médiateurs chimiques, comme la construction de barrières physiques, placages de terre ou galerie-tunnels.

Clément (1982) avait déjà noté le pouvoir attractif du dodécatriénol sur les sexués de *R. santonensis*, sans toutefois le mettre en évidence dans les extraits. Nous avons montré que le dodécatriénol est présent chez les ailés de *R. santonensis*, et qu'il apparaît être le composant majeur de la phéromone sexuelle de cette espèce. Chez une espèce voisine, *R. flavipes*, le n-tetradécyl-propanoate est la phéromone sexuelle (Clément *et al.*, 1986, 1989). Ces deux résultats montrent que les deux espèces sont vraiment séparées (phéromones sexuelles différentes) et ne forment pas une super-espèce comme le laisseraient supposer les résultats obtenus sur les hydrocarbures cuticulaires (Bagnères *et al.*, 1990).

Le dodécatriénol est également la phéromone sexuelle d'un termite supérieur champignoniste, *Pseudacanthotermes spiniger* (Bordereau *et al.*, 1991a). Là encore se pose le problème de la spécificité. Chez les termites, l'isolement reproducteur apparaît souvent basé sur des caractéristiques spatio-temporelles spécifiques des essaimages. C'est le cas par exemple au Congo pour deux espèces sympatriques de termites champignonistes (*Pseudacanthotermes militaris* et *P. spiniger*) qui possèdent le même composant majeur de phéromone sexuelle et qui peuvent s'attirer mutuellement, mais la première essaime en Avril et en début d'après-midi tandis que la seconde essaime en Mai et en fin d'après-midi.

(Bordereau *et al.*, 1991b).

Le dodécatriénol est donc un composant à la fois de la phéromone de piste et de la phéromone sexuelle. Cette intéressante dualité fonctionnelle s'explique d'une part par une différence de productivité entre neutres et essaimants et d'autre part par une différence de sensibilité entre les castes : alors que les fortes concentrations de dodécatriénol inhibent le suivi de piste chez les ouvriers, elles induisent une excitation sexuelle chez les essaimants mâles. Il n'existe pas de composés secondaires différenciant phéromone de piste et phéromone sexuelle, cela a déjà été suggéré pour *Trinervitermes bettonianus* (Quennedey and Leuthold, 1978). Chez *Pseudacanthotermes spiniger*, les extraits de glandes sternales d'essaimants induisent un comportement de suivi de piste tout à fait normal chez les ouvriers et, inversement, un extrait très concentré d'ouvriers induit l'excitation d'un mâle (Bordereau *et al.*, non publié). Seule la différence de concentration en dodécatriénol semble donc séparer phéromone sexuelle et phéromone de piste.

On voit ainsi qu'une grande économie génétique a été réalisée chez les Isoptères, à la fois au niveau glandulaire et au niveau phéromonal : une même molécule synthétisée par une même glande est à l'origine de plusieurs comportements dans différentes castes.

REFERENCES

- Blum M.S. and Brandt J.M., 1972. Social insect pheromones : their chemistry and function. *Am. Zool.*, 12 : 553-573.
- Bagnères A.G., Clément J.L., Blum M.S., Severson R.F., Joulie C. and Lange C., 1990. Cuticular hydrocarbons and defensive compounds of *Reticulitermes flavipes* (Kollar) and *R. santonensis* (Feytaud) - Polymorphism and chemotaxonomy. *J. Chem. Ecol.*, 16, 3213-3244.
- Bordereau C., Robert A., Bonnard O. and Le Quere J.-L., 1991a. (3Z,6Z,8E)-3,6,8-dodecatrien-1-ol: sex pheromone in a higher fungus-growing termite, *Pseudacanthotermes spiniger* (Isoptera, Macrotermitinae). *J. Chem. Ecol.*, 17 : 2177-2191.
- Bordereau C., Robert A., Bonnard O. and Le Quere J.-L., 1991b. Dispersal flights and sex pheromones in two species of fungus-growing termites, *Pseudacanthotermes spiniger* and *P. militaris*. 8th Annual Meeting International Society of Chemical Ecology, Dijon, France, July, 2-7, 1991.
- Clément J.L., 1982. Pheromones d'attraction sexuelle des Termites européens du genre *Reticulitermes* (Rhinotermitinae). Mécanismes comportementaux et isolements spécifiques. *Biology of Behaviour*, 7, 55-68.
- Clément J.L., Lloyd H., Nagnan P. et Blum M.S., 1986. n-Tetradecyl propanoate : la phéromone d'attraction sexuelle de *Reticulitermes flavipes*. *Actes Coll. Ins. Soc.*, 3, 87-95.
- Clément J.L., Lloyd H., Nagnan P. and Blum M.S., 1989. n-Tetradecyl propionate : identification as a sex pheromone of the eastern subterranean termite *Reticulitermes flavipes*. *Sociobiol.*, 15 : 19-24.
- Esenther G.B., Allen T.C., Casida J.E. and Shenefelt R.D., 1961. Termite attractant from fungus-infected wood. *Science*, 134 : 50.
- Howard R., Matsumura F. and Coppel H.C., 1976. Trail following pheromones of the Termitidae: approaches to their authentication and specificity. *J. Chem. Ecol.*, 2: 147-166.
- Kaib M., Bruinsma O. and Leuthold R.H., 1982. Trail following in termites: evidence for a multicomponent system. *J. Chem. Ecol.*, 8 : 1193-1205.
- Matsumura F., Coppel H.C. and Tai A., 1968. Isolation and identification of termite trail-following pheromone. *Nature*, 219 : 963-964.
- Quennedey A. and Leuthold R.H., 1978. Fine structure and pheromonal properties of the polymorphic sternal gland in *Trinervitermes bettonianus* (Isoptera, Termitidae). *Ins. Soc.* 25 : 153-162.

- Stuart A.M., 1969. Social behavior and communication. *In* Biology of termites. Krishna K. & Weesner F. Eds. Academic Press, vol.1: 193-232.
- Stuart A.M., 1975. Some aspects of pheromone involvement in the post-flight behaviour of the termites *Zootermopsis angusticollis* (Hagen) and *Reticulitermes flavipes* (Kollar). *In* Pheromones and defensive secretions in social insects: Noirot Ch., Howse P.E., Le Masne G., Eds., Université de Dijon. 219-223.
- Tokoro M., Tsunoda K. and Yamaoka R., 1989. Isolation and primary structure of trail pheromone of the termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae). *Wood Research*, 76: 29-38.
- Tokoro M., Yamaoka R., Hayashiyia K., Takahashi M. and Nishimoto K., 1990. Evidence for trail-pheromone precursor in the termite *Reticulitermes speratus* (Kolbe) (Rhinotermitidae : Isoptera) *J. Chem. Ecol.*, 16: 2549-2557.
- Yamaoka R., Tokoro M. and Hayashiya K., 1987. Determination of geometric configuration in minute amounts of highly unsaturated termite trail pheromone by capillary gas chromatography in combination with mass spectrometry and Fourier-transform infrared spectroscopy. *J. Chrom.*, 399: 259-267.