

Recherche et étude comparative des activités protéasiques des castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* (Termitidae, Macrotermitinae) et de son champignon symbiotique *Termitomyces* sp.

L. P. Kouamé^{1*}, P.A. Yapo², S.L. Niamké³ & A. Kamenan¹

Keywords: Termite- *Macrotermes subhyalinus*- Fungus comb- Symbiotic fungus- Proteasic activities

Résumé

Les extraits bruts des castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus*, leur champignon symbiotique *Termitomyces* sp. et leur meule sont incapables d'hydrolyser les acyl-pNA testés en milieu acide. Par contre, en milieu alcalin, certains d'entre eux sont hydrolysés, montrant ainsi que ces sources enzymatiques possèdent des activités protéasiques. Les acyl-pNA hydrolysés sont la Gly-pNA, la Leu-pNA, la Met-pNA, la Phe-pNA, la Pro-pNA, la Lys-pNA, l'Arg-pNA et l'Asp-pNA. Les activités protéasiques les plus élevées ont été obtenues avec la Leu-pNA et le BA-pNA chez l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus*. Il est donc plus actif que le soldat. Le petit soldat est plus actif que le grand soldat. Les activités protéasiques du champignon sont plus élevées que celles de la meule, son support de croissance. Les études de compétitions mutuelles entre les substrats les mieux hydrolysés par le champignon symbiotique et l'ouvrier ont montré que les activités trypsiques (Arg-pNA, Lys-pNA et BA-pNA) proviennent d'une même enzyme. Ce comportement enzymatique a été aussi observé au niveau de la Leu-pNA, la Met-pNA et l'Ala-pNA.

Summary

Research and Comparative Study of Proteasic Activities of Neutral Castes of Termite *Macrotermes subhyalinus* (Termitidae, Macrotermitinae) and its Symbiotic Fungus *Termitomyces* sp.

Crude extracts from neutral castes of the termite *Macrotermes subhyalinus*, its symbiotic fungus *Termitomyces* sp. and its comb are not able to hydrolyze acyl-pNA tested on acid medium. However, these substrates on alkaline medium are hydrolysed, indicating that these enzymatic sources possess proteolytic activities. Hydrolyzed acyl-pNA are Gly-pNA, Leu-pNA, Met-pNA, Phe-pNA, Pro-pNA, Lys-pNA, Arg-pNA and Asp-pNA. The highest proteolytic activities were obtained with Leu-pNA and BA-pNA with a *Macrotermes subhyalinus* termite worker. It is therefore more active than the soldier. Proteolytic activities were higher in small soldiers than in large ones. The proteolytic activities of the fungus are higher than those of the fungus comb, its growth backbone. Mutual competition studies among the best hydrolysed substrates by symbiotic fungus and worker have shown that trypsin activities (Arg-pNA, Lys-pNA and BA-pNA) are derived from the same enzyme. This enzymatic reaction has also been observed with Leu-pNA, Met-pNA and Ala-pNA.

Introduction

Les insectes supérieurs appartenant à la sous-famille des Macrotermitinae sont des termites champignonnistes. Ils cultivent dans leur nid un champignon de la classe des Basidiomycètes et du genre *Termitomyces*. Ce microorganisme se développe sur la meule qui est composée de fragments de bois, de feuilles et de chaumes de graminée malaxés par les pièces buccales et imbibés de salive d'ouvriers (5, 6). Ce cham-

pignon symbiotique donne sur la meule des mycotêtes constituées de filaments de conidiophore (4).

Dans la termitière, les castes neutres sont l'ouvrier, le petit soldat et le grand soldat. Ils se nourrissent de bois et autres matières végétales. C'est ainsi que le termite *Macrotermes subhyalinus* dans un écosystème semi-aride (Kajiado, Kenya) consomme à lui

¹Laboratoire de biochimie et technologie des aliments de l'Unité de formation et de recherche en sciences et technologie des aliments de l'Université d'Abobo-Adjamé, 02 BP 801, Abidjan 02, Côte d'Ivoire.

²Laboratoire de physiologie, pharmacologie et physiopathologie de l'Unité de formation et de recherche en sciences de la nature de l'Université d'Abobo-Adjamé, 02 BP 801, Abidjan 02, Côte d'Ivoire.

³Laboratoire de biotechnologie de l'Unité de formation et de recherche en biosciences de l'Université d'Abidjan-Cocody, 22 BP 42, Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

*Celui à qui toute correspondance doit être adressée. E-mail: kouame_patrice@yahoo.fr, Fax (225) 20 37 81 18 Tel: (225) -07-41-27-01.

Reçu le 14.02.03. et accepté pour publications le 30.03.04.

seul 20 à 30% de la totalité de l'herbe disponible. En période de disette, il peut subsister quelques temps grâce à sa réserve (8). Ces matières végétales, hydrolysées par les enzymes digestives de ces insectes, sont constituées essentiellement de cellulose, d'hémicellulose et de lignine. On y trouve une faible quantité de substances azotées. Le bois, par exemple, en contient seulement 0,03-0,1% (par rapport à la matière sèche) (2). C'est pour ces raisons que la plupart des travaux effectués pour la détermination du rôle de la meule dans la termitière, la compréhension du métabolisme digestif et des relations symbiotiques qui existent entre le termite et son champignon, sont axés sur les glycosidases (1, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17). Les castes neutres de termite, leur champignon symbiotique et leur meule ne possèdent-ils pas d'activités protéasiques? Si oui, quelles sont ces activités? Les ouvriers sont-ils plus actifs que les soldats comme cela avait été relevé par Rouland (13), Matoud (12) et Kouamé (7) chez les glycosidases?

C'est pour répondre à toutes ces préoccupations que nous nous proposons de rechercher quelques activités protéasiques présentes chez les castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus*, leur champignon symbiotique et leur meule, ensuite, de les comparer entre elles si elles existent effectivement et de définir les différents sites d'hydrolyse des substrats dans les extraits bruts enzymatiques à travers des études de compétitions mutuelles entre les substrats les mieux hydrolysés.

Matériel et méthodes

Matériel

1. Produits chimiques

Les substrats chromogéniques acyl-*paranitroanilides* (acyl-*pNA*): Gly-*pNA*, Ala-*pNA*, Val-*pNA*, His-*pNA*, BZ(Benzoyl)-Tyr-*pNA*, Leu-*pNA*, Ile-*pNA* Nac(N-acétyl)-Leu-*pNA*, Met-*pNA*, Pro-*pNA*, Phe-*pNA*, Lys-*pNA*, Arg-*pNA*, Asp-*pNA* et (Cys-*pNA*)₂ proviennent de chez BACHEM. Glu-*pNA* et BA(N α -Benzoyl-DL-Arginine)-*pNA* sont des produits de chez SIGMA. Tous les autres produits chimiques utilisés sont de qualité analytique.

2. Provenance du termite, du champignon symbiotique et de la meule

La meule provient d'un nid du campus de l'Université de Cocody (Abidjan) où les castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* sont récoltées. Les mycotêtes du champignon symbiotique sont récoltées directement à partir de cette meule. Ces matériels biologiques sont stockés au congélateur à -20° C.

Méthodes

1. Préparation de l'extrait brut enzymatique

Trois grammes de matériel biologique (mycotête ou meule débarrassée de toutes les mycotêtes ou castes neutres de termite) sont lavés à l'eau distillée, essorés sur papier filtre puis placés dans un récipient disposé dans un bac à glace. Ils sont ensuite broyés dans 10 ml de NaCl 0,9% (p/v) à l'aide d'un micro-broyeur Ultra-Turrax (type T25). Le broyat obtenu est centrifugé pendant 15 minutes à 13000 tours/minute dans une centrifugeuse réfrigérée, à une température comprise entre 4 et 5° C. Le surnageant obtenu constitue l'extrait brut enzymatique.

2. Mesure des activités protéasiques

Dans les conditions standards, la détermination des activités protéasiques sur les substrats acyl-*paranitroanilide* a été faite à 37° C pendant 10 minutes dans un mélange réactionnel (1 ml) contenant 950 μ l de substrat 1 mM préparé dans le tampon phosphate 100 mM pH 8,0 (ou dans le tampon acétate 100 mM pH 5,0) et 50 μ l d'extrait brut enzymatique. La quantité de *paranitroaniline* libéré est détectée au spectrophotomètre UV-visible Kontron (Unikon 860) thermostaté à 412 nm. L'activité enzymatique (U) est définie comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse l'hydrolyse d'un nanomole de substrat par minute à 37° C dans les conditions standards.

3. Compétitions mutuelles entre les substrats acyl-*pNA* les mieux hydrolysés par l'ouvrier et le champignon

Les expériences de compétitions mutuelles faisant intervenir dans chaque cas, un mélange de deux substrats acyl-*pNA* mieux hydrolysés (1 mM pour chaque substrat), ont été effectuées à 37° C dans du tampon phosphate 100 mM pH 8,0. Les valeurs (unités arbitraires) calculées dans le cas théorique de sites distincts sont obtenues par la somme de deux activités acyl-*pNA*. Les valeurs dans le cas d'un site commun sont déterminées par l'équation de Dixon et Webb (3).

4. Dosage des protéines

Les protéines ont été dosées selon la méthode de Lowry *et al.* (9). Le sérum albumine bovine a été utilisé comme protéine de référence.

Résultats et discussion

Résultats

1. Les acyl-*pNA* non hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques

Lorsque le tampon acétate 100 mM pH 5,0 est utilisé pour la préparation du milieu réactionnel, aucune activité acyl-*pNA* n'a été obtenue. Avec le tampon phos-

phate 100 mM pH 8,0; ce sont seulement l'Ile-pNA, le Nac-Leu-pNA, l'His-pNA, la (Cys-pNA)₂, la Val-pNA, le BZ-Tyr-pNA et le Glu-pNA qui ne sont pas hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques des castes neutres, du champignon et de la meule. Toutes les activités acyl-pNA ont été obtenues en milieu alcalin.

2. Les acyl-pNA à acyl basique (BA-pNA, Arg-pNA et Lys-pNA) hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques

Les substrats chromogéniques acyl-pNA tels que le BA-pNA, l'Arg-pNA et la Lys-pNA sont utilisés généralement pour le dosage d'activité trypsique. Les castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus*, leur champignon symbiotique représenté par leur mycotête et leur meule, hydrolysent ces différents substrats. Seul l'ouvrier possède une bonne activité trypsique, le champignon symbiotique *Termitomyces* sp., la meule et les autres castes neutres possèdent de faibles activités trypsiques par rapport à celles de l'ouvrier. Le champignon symbiotique a des activités Arg-pNA et Lys-pNA inférieures à celles du petit soldat. Ce qui n'est pas le cas pour le substrat BA-pNA (Figure 1).

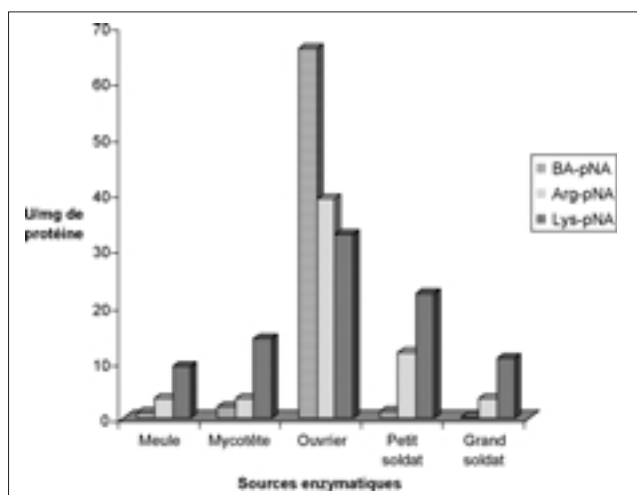


Figure 1: Etude comparative des activités BA-pNA, Arg-pNA, et Lys-pNA du champignon, des castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* et de la meule. Les dosages d'activités protéasiques ont été faits en milieu alcalin comme décrits dans la partie «Matériels et méthodes».

3. Les acyl-pNA à acyl aliphatique (Leu-pNA, Ala-pNA et Gly-pNA) hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques

Parmi ces trois substrats chromogéniques, seule la Leu-pNA est la plus hydrolysée par les castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus*. Ce substrat acyl-pNA est même le plus hydrolysé par les différentes sources enzymatiques utilisées parmi tous les substrats synthétiques chromogéniques testés. Le champignon symbiotique a une activité Leu-pNA inférieure à celle du petit soldat. L'ouvrier a les activités

Leu-pNA et Ala-pNA les plus élevées. Ce qui n'est pas le cas pour l'activité Gly-pNA où celle du champignon est la plus élevée tandis que les castes neutres n'en possèdent pas (Figure 2).

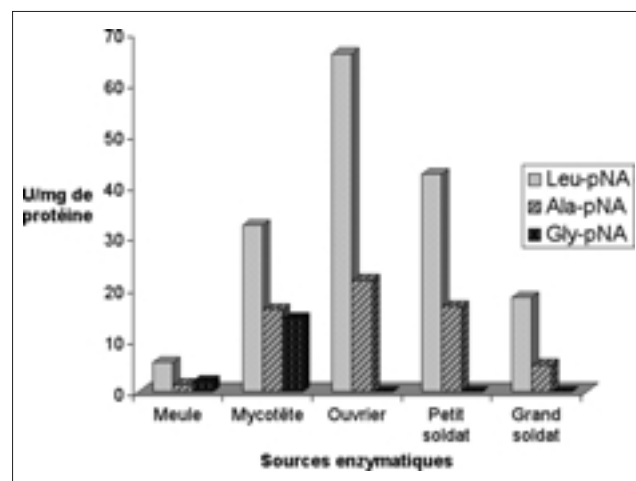


Figure 2: Etude comparative des activités Leu-pNA, Ala-pNA et Gly-pNA du champignon, des castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* et de la meule. Les dosages d'activités protéasiques ont été faits en milieu alcalin comme décrits dans la partie « Matériels et méthodes ».

4. Les acyl-pNA à acyl aromatique (Pro-pNA et Phe-pNA) hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques

Nous avons constaté que le substrat Phe-pNA est difficilement hydrolysé par les castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus*. Chez le champignon symbiotique, cette activité n'est pas intéressante. Nous avons noté cependant que l'activité Pro-pNA est plus élevée que celle de la Phe-pNA au niveau de toutes les sources enzymatiques testées. Le champignon symbiotique a l'activité Pro-pNA la plus élevée. Chez les castes neutres, nous avons noté que l'ouvrier est plus actif que le petit soldat qui, à son tour, est plus actif que le grand soldat (Figure 3).

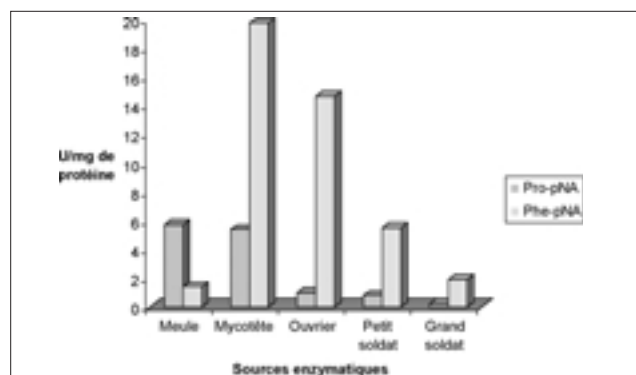


Figure 3: Etude comparative des activités Pro-pNA et Phe-pNA du champignon, des castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* et de la meule. Les dosages d'activités protéasiques ont été faits en milieu alcalin comme décrits dans la partie «Matériels et méthodes».

5. Les autres acyl-pNA hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques (Asp-pNA et Met-pNA)

Les soldats du termite *Macrotermes subhyalinus* n'hydrolysent pas le substrat Asp-pNA. Nous avons noté chez l'ouvrier, le champignon et son support de croissance, la meule, une très faible activité Asp-pNA. Par contre, au niveau du substrat Met-pNA, nous avons obtenu une bonne activité chez les castes neutres et le champignon. Cependant, les activités Met-pNA de l'ouvrier et du petit soldat sont supérieures à celle du champignon symbiotique (Figure 4).

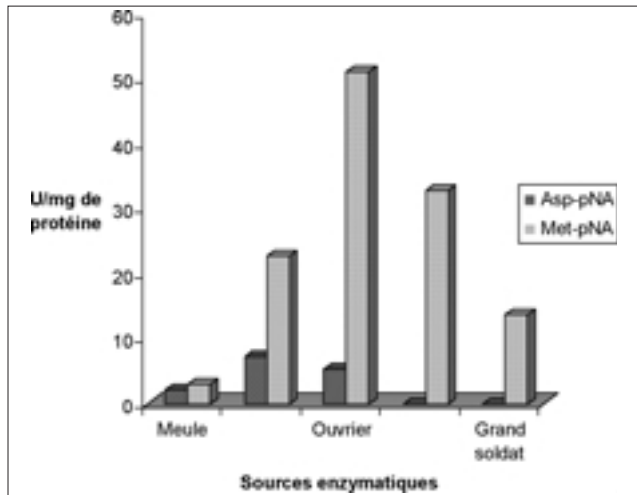


Figure 4: Etude comparative des activités Asp-pNA et Met-pNA du champignon, des castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* et de la meule. Les dosages d'activités protéasiques ont été faits en milieu alcalin comme décrits dans la partie «Matériels et méthodes».

6. Compétitions mutuelles entre substrats acyl-pNA fortement hydrolysés par l'ouvrier et son champignon

Les substrats acyl-pNA fortement hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* et de son champignon symbiotique *Termitomyces* sp. sont la Leu-pNA, l'Ala-pNA, Met-pNA, BA-pNA, l'Arg-pNA, la Lys-pNA et la Phe-pNA. L'étude de compétitions mutuelles entre ces différents substrats au niveau de chaque source enzymatique (champignon et ouvrier), nous a donné les résultats consignés dans le tableau 1. Les résultats obtenus avec les deux sources enzymatiques sont identiques.

Discussion

Les castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus*, leur champignon symbiotique et leur meule ne sont pas capables d'hydrolyser les substrats chromogéniques acyl-pNA testés en milieu acide. Par contre, en milieu alcalin, certains d'entre eux sont clivés par les protéases de ces mêmes sources enzymatiques ce qui nous permet de penser qu'il n'existe pas chez ces matériels biologiques de protéases acides capables d'hydrolyser ces différents substrats à pH 5.0. Il existe des protéases alcalines capables d'hydrolyser certains de ces substrats. Parmi ceux qui sont clivés par ces différentes sources enzymatiques, nous avons constaté que l'ouvrier possède des activités protéasiques plus élevées que celles des soldats. Chez ces derniers, les petits sont plus actifs que les

Tableau 1

Compétitions mutuelles entre les substrats acyl-pNA fortement hydrolysés par l'ouvrier et le champignon

Substrats	Leu-pNA	Ala-pNA	Met-pNA	BA-pNA	Arg-pNA	Lys-pNA	Phe-pNA	
Leu-pNA		-	+	-	-	-	-	
Ala-pNA	-		-		-	-	-	
Met-pNA	+	-			-	-	-	
BA-pNA	-	-	-		+	+	-	Champignon
Arg-pNA	-	-	-	+		+	-	
Lys-pNA	-	-	-	+	+		-	
Phe-pNA	-	-	-	-	-	-		
								Ouvrier

+ et - signifient respectivement hydrolyser par un site commun et aux moins deux sites distincts d'hydrolyse dans l'extrait brut enzymatique.

Les dosages des activités protéasiques ont été faits en milieu alcalin comme décrits dans la partie «Matériel et méthodes».

grands. Ces résultats s'apparentent à ceux trouvés chez les espèces de termites de la sous famille des *Macrotermitinae* au niveau des glycosidases (7, 12, 13). Ces différences d'activités enzymatiques peuvent être dues à la présence de substances toxiques défensives chez les soldats. Ces substances sont des quinones (18). En se basant sur cette hypothèse, nous pouvons dire que ces composés toxiques exercent une forte inhibition sur les activités trypsiques révélées par l'Arg-pNA et le BA-pNA et sur l'activité Asp-pNA. En effet, avec l'ouvrier, nous avons une activité trypsique très intense, ce qui n'est pas le cas chez les soldats surtout chez le grand soldat dont le rôle essentiel dans la termitière est de défendre la population (6). Les activités enzymatiques de l'ouvrier sont généralement supérieures à celles du champignon lorsque les deux sources enzymatiques possèdent les mêmes activités sauf dans les cas des activités Phe-pNA et Asp-pNA. L'étude de compétitions mutuelles entre les substrats acyl-pNA exprimant l'activité trypsique, c'est-à-dire l'Arg-pNA, la Lys-pNA et le BA-pNA nous a montré tant chez le champignon que chez l'ouvrier que ces 3 substrats sont hydrolysés par un site commun. Ce qui nous fait penser à l'existence d'une seule enzyme responsable de ces activités hydrolytiques dans chaque extrait brut enzymatique.

Les substrats Gly-pNA et Pro-pNA sont hydrolysés par le champignon symbiotique, tandis que l'ouvrier n'hydrolyse pas le Gly-pNA et clive faiblement la Pro-pNA. Ces résultats indiquent que les enzymes responsables de ces activités hydrolytiques sont présentes chez le champignon symbiotique mais absentes chez

les castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus*. Le champignon n'est donc pas capable de sécréter dans les tubes digestifs des castes neutres du termite, les enzymes responsables de ces activités protéasiques.

Les différentes sources enzymatiques testées hydrolysent fortement le substrat Leu-pNA. Cependant, elles sont sans effet sur l'Ile-pNA et le Nac-Leu-pNA qui sont des substrats obtenus à partir du Leu-pNA. En effet, ces substrats sont obtenus à la suite de substitution de groupements chimiques tels que le méthyle et l'acétyle sur la leucine. L'enzyme responsable de l'activité Leu-pNA ne reconnaît pas la leucine lorsqu'elle est substituée.

La présence d'activité Met-pNA obtenue au niveau des différentes sources enzymatiques testées est très prometteuse. Cette enzyme, si elle est très spécifique du résidu méthionyle, va permettre une certaine innovation dans l'hydrolyse des liaisons peptidiques où se trouve engagée la méthionine. En effet, pour hydrolyser ce type de liaison peptidique, on a recours le plus souvent au bromure de cyanogène (CNBr) qui est un produit très toxique et dont la manipulation recommande beaucoup de précautions. L'étude de compétitions mutuelles entre les substrats leu-pNA et Met-pNA, nous a montré que dans les différents extraits bruts enzymatiques, ces deux activités protéasiques seraient produites par la même enzyme. Ce qui ne ruine totalement pas notre espoir, car une purification suivie de caractérisation physico-chimique de cette enzyme, pourra nous situer sur les conditions d'utilisation de ces potentialités hydrolytiques.

Références bibliographiques

1. Abo-khatwa N., 1978, Cellulase of fungus growing termites: a new hypothesis on its origin. *Exp.* 34, 559-560.
2. Cowling E.B. & Merrill W., 1966, Nitrogen in wood and its role in wood deterioration. *Can. J. Botany*, 44, 1539-54.
3. Dixon M. & Webb E.C., 1979, *Enzymes*, 3rd Ed. pp 72-75, London: Longman Group Limited.
4. Grasse P.P., 1970, *Précis de zoologie I: Invertébrés*. Ed. Masson C^{ie}, 1400 pp.
5. Grasse P.P., 1982, *Termitologia. I: Anatomie, physiologie, reproduction des termites*, 613 pp. Ed. Masson C^{ie}, Paris.
6. Grasse P.P., 1984, *Termitologia. II: Fondation des sociétés, construction*. 613 pp. Ed. Masson Cie, Paris.
7. Kouamé L.P., 1994, Purification et études physico-chimiques de deux β -glycosidases du termite *Macrotermes subhyalinus* (Termitidae, Macrotermitinae), Thesis d'Université d'Abidjan.
8. Lepage M.G., 1981, L'impact des populations récoltantes de *Macrotermes michaëlseni* (Sjostedt) dans un écosystème semi-aride I: l'activité de récolte et son déterminisme. *Insect. Soc.* 28, 3, 297-308.
9. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J., 1951, Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Biochem.* 193, 265-275.
10. Martin M.M. & Martin J.S., 1978, Cellulose digestion in midgut of the fungus growing termite *Macrotermes natalensis*: the role of acquired digestive enzymes. *Sciences*, 199, 1453-1455.
11. Martin M.M. & Martin J.S., 1979, The distribution and origins of cellulolytic enzymes of the higher termite *Macrotermes natalensis* *Physiol. Zool.* 52, 11-21.
12. Matoub M., 1993, La symbiose termite-champignon chez *Macrotermes bellicosus* (Termitidae, Macrotermitinae). Thesis d'Université Paris XII Val de Marne, Paris.
13. Rouland C., 1986, Contribution à l'étude des osidases digestives de plusieurs espèces de termites africains. Thesis d'Université Paris XII Val-de-Marne, Paris.
14. Rouland C., Mora Ph. & Renoux J., 1987, Essai d'interprétation de la symbiose digestive chez *Macrotermes mulleri* (Termitidae, Macrotermitinae). *Act. Coll. U.I.E.I.S.* 4, 111-118.
15. Rouland C., Renoux J. & Petek, 1988, Purification and properties of two xylanases from *Macrotermes mulleri* (Termitidae, Macrotermitinae) and its symbiotic fungus *Termitomyces* sp. *Insect. Biochem.* 18, 709-715.
16. Rouland C., Brauman A., Kéléké S., Labat M., Mora Ph. & Renoux J., 1989, Endosymbiosis and ectosymbiosis in the fungus growing termites, in: *Microbiology in poecilotheism* (Edited by Lesel R.), PP 79-82. Elsevier Sciences, Amsterdam.
17. 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.* 99A, 657-663.

L.P. Kouamé, Ivoirien, Docteur en Biochimie, Maître-Assistant à l'Université d'Abobo-Adjamé, Côte d'Ivoire.

P.A. Yapo, Ivoirien, Docteur en hématologie-biologie moléculaire, Maître-Assistant à l'Université d'Abobo-Adjamé, Côte d'Ivoire.

S.L. Niamké, Ivoirien, Docteur en Biochimie, Assistant à l'Université de Cocody, Côte d'Ivoire.

A. Kamenan, Ivoirien, Professeur de Biochimie à l'Université d'Abobo-Adjamé, Côte d'Ivoire.