

UNIVERSITE PARIS EST

ECOLE DOCTORALE SCIENCE DE LA VIE ET DE LA SANTE

N° attribué par la bibliothèque

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS EST

Par

Herbert Joseph GUEDEGBE

**Diversité, Origine et Caractérisation de la Mycoflore des Meules de
Macrotermitinae (Isoptera, Termitidae)**

Spécialité

Ecologie Microbienne

Soutenue le 25 Septembre 2008 devant le jury composé de :

Rapporteur	Robin Duponnois (IRD)
Rapporteur	Pascal Hounnandan (Université d'Abomey-Calavi)
Directeur de thèse	Corinne Rouland-Lefèvre (IRD)
Examineur	Evelyne Garnier-Zarli (Université Paris Est)
Examineur	Céline Roose-Amsaleg (Université Paris VI)

À mes parents
À ma famille
À mes amis
À Samir

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire d'Ecologie des Sols Tropicaux (LEST) de l'UMR IRD 137 Biosol. J'exprime donc en tout premier lieu ma profonde gratitude à Madame Corinne Rouland-Lefèvre, Directrice du LEST pour avoir accepté de diriger ce travail malgré ses multiples occupations et pour l'enthousiasme dont elle a fait preuve tout au long de cette thèse.

Je remercie également Monsieur Pascal Houngnandan qui m'a ouvert les portes de son laboratoire d'écologie microbienne, offert de nombreuses facilités lors des missions d'échantillonnage, conseillé sur ma thèse en général et surtout pour avoir accepté d'en être rapporteur.

Mes sincères remerciements vont ensuite à l'Institut de Recherche pour le Développement qui m'a octroyé une bourse de thèse de Doctorat à travers son programme de soutien de Doctorants. Un remerciement particulier à Laure Kpenou du DSF pour ses multiples conseils et pour son entière disponibilité.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur Robin Duponnois pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse ainsi qu'à Mesdames Evelyne Garnier-Zarli & Céline Roose-Amsaleg pour avoir accepté de porter dans leur domaine respectif, un regard sur ce travail.

Mes sincères remerciements à Michel Diouf pour avoir remarquablement bien guidé mes premiers pas en biologie moléculaire et pour sa rigueur scientifique; à Edouard & Philippe pour les nombreuses discussions que nous avons eu pendant mes travaux de thèse.

Je remercie tous les membres du LEST dont Louise, Nuria, Jocelyne, Anne, Annabelle, Jérôme, Pascal, Patrick, Suzanne,... (liste non exhaustive) pour avoir participé chacun à sa façon, à l'avancée de ma thèse.

Merci aux thésards et stagiaires du LEST avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à échanger notamment Anouar, Fatima, Thomas, Simon,... sans oublier le 'collège' Asiatique (yong tao, Aanan,...) et Africain (Bakary, Kam-rigne, Ignace,...). Un merci particulier à Roll Goma pour sa grande curiosité scientifique.

Aux nombreuses personnes que j'ai rencontrées au cours de ces années de thèse notamment lors des missions d'échantillonnage et que je n'ai pas nommément citées, je vous remercie pour votre précieuse aide.

A mes proches qui m'ont soutenu dans certains longs moments de doute et à qui j'ai dédié ce travail, soyez assurés de mon éternelle reconnaissance. Une pensée particulière à Cécilia pour son incommensurable soutien et surtout pour sa pression constante pour que je puisse enfin finir cette thèse. Voilà, c'est fait !!! A Simbi pour s'être occupée sans relâche et sans faille de notre petite boule d'énergie, bien souvent voire tout le temps au détriment de sa vie professionnelle et personnelle, je dis un infini Merci.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION GENERALE	5
1.1 Etat des connaissances	6
1.1.1 Généralités	6
1.1.2 La sous-famille des Macrotermitinae	7
1.1.2.1 Répartition géographique	7
1.1.2.2 Association symbiotique Macrotermitinae/ <i>Termitomyces</i>	8
1.1.2.3 Macrotermitinae et production de peptides antimicrobiens	12
1.1.3 Matériel lignocellulosique et biodégradation fongique	12
1.1.4 Interactions fongiques	17
1.1.5 Principales approches utilisées en écologie microbienne	18
1.1.5.1 Méthodes d'étude de la mycoflore cultivable	19
1.1.5.2 Analyse moléculaire des communautés fongiques	20
1.2 Objectifs, hypothèses et plan de la thèse	23
2. MATERIEL & METHODES	26
2.1 Matériel	27
2.1.1 Espèces de termites champignonnistes utilisées	27
2.1.2 Brève description des localités de prélèvement	28
2.1.3 Matériel prélevé et techniques de prélèvement	29
2.2 Méthodes	30
2.2.1 Isolement des morphotypes fongiques des meules	30
2.2.2 Extraction de l'ADN à partir des souches fongiques pures	30
2.2.3 Extraction de l'ADN génomique total des meules	31
2.2.4 Contrôle et purification de l'ADN extrait	32
2.2.5 Amplification de l'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR)	32
2.2.6 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)	34
2.2.7 Blast et placement taxonomique des séquences	34
2.2.8 Analyse enzymatique	34
2.2.8.1 Test API ZYM	35
2.2.8.2 Productions enzymatiques	36
2.2.8.2.1 Préparation des extraits bruts	36
2.2.8.2.2 Détermination des activités polysaccharidasiques	36
2.2.8.2.3 Dégradation des composés phénoliques	36
2.2.9 Essais antifongiques	37
2.2.9.1 Préparation des suspensions salivaires et digestives	37
2.2.9.2 Extraction au méthanol des carpophores de <i>Termitomyces</i>	38
2.2.9.3 Méthode de diffusion sur disque	38

2.2.9.4 Production de composés volatiles	38
2.2.10 Analyse phylogénétique	39
2.2.10.1 Alignement des séquences nucléotidiques	39
2.2.10.2 Méthodes d'analyse et logiciels utilisés	39
2.2.11 Traitement statistique des données	40
2.2.12 Récapitulatif des principales méthodes utilisées	40
3. RESULTATS	41
Chapitre III.1 Diversité taxinomique et fonctionnelle de la mycoflore cultivable	42
III.1.1 Distribution de la mycoflore non symbiotique des meules	43
III.1.2 Dégradation de substrats et production d'enzymes extracellulaires	49
Chapitre III.2 Analyse moléculaire des communautés fongiques des meules	67
III.2.1 Diversité génétique des meules révélée par PCR-DGGE	68
III.2.2 La méthode SuPER appliquée à l'étude de la mycoflore des meules	72
Chapitre III.3 Phylogénie et spécificité des <i>Xylaria</i> associés aux meules	83
Chapitre III.4 Etude préliminaire de l'inhibition de la mycoflore des meules	95
4. CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES	103
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	108
LISTE DES MANUSCRITS REDIGES	125

1. Introduction Générale

1.1 Etat des connaissances

1.1.1 Généralités

Les ingénieurs écologiques (sensu Jones et *al.*, 1994) sont des organismes produisant des structures biogéniques de nature organo-minérales avec lesquelles ils modifient directement ou indirectement l'accessibilité et la disponibilité des ressources pour les autres organismes. Avec les vers de terre et les fourmis, les termites constituent un des plus importants représentants de ce groupe (Lavelle et *al.*, 1997 ; Lavelle & Spain, 2001). La termitosphère, système biologique majeur, est considérée comme le volume de sol et de ressources organiques influencé par les termites, soit directement soit à travers leurs associations obligatoires ou facultatives avec des microorganismes.

Les termites sont des insectes sociaux appartenant à l'ordre des Isoptères, répartis en castes fonctionnelles bien définies (ouvriers, soldats et reproducteurs). Les ouvriers fourragent, construisent et entretiennent les nids mais sont également chargés de l'alimentation des autres individus. Les soldats (absents chez certaines familles comme les Apicotermittinae) défendent les colonies tandis que les ailés reproducteurs (rois et reines) sont responsables de la dispersion et de la reproduction (Eggleton, 2006). Les termites sont classés en 7 familles incluant des termites inférieurs (Mastotermitidae, Hodotermitidae, Termopsidae, Kalotermitidae, Rhinotermitidae et Serritermitidae) et des termites supérieurs qui sont les Termitidae et qui représentent un peu plus de 75% des 1800 espèces de termites connues (Kumari et *al.*, 2006). Contrairement aux autres termites, ces derniers ne possèdent pas de flagellées dans leur tube digestif. Cette caractéristique est corrélée à une plus grande diversification des habitudes alimentaires ainsi qu'à quelques changements majeurs au niveau des associations symbiotiques (Eggleton & Tayasu, 2001 ; Eggleton, 2006). La considérable diversité structurale des nids est la résultante des différences évolutives, des dimensions des colonies, des habitudes alimentaires et de l'établissement d'un microclimat particulier adapté à chaque espèce (Abe & Higashi, 2001).

Longtemps considérés essentiellement comme nuisibles à cause des dégâts qu'ils engendrent (estimation annuelle de 20 milliards de dollars; Su, 2002), les termites ont néanmoins un rôle écologique très important car influençant la pédogenèse ainsi que les propriétés physico-chimiques et les fonctions du sol. Cet impact a été largement synthétisé par plusieurs travaux (Lee & Wood, 1971 ; Wood & Sands, 1978 ; Holt & Lepage, 2000 ; Lavelle & Spain, 2001 ; Bignell, 2006).

Dans les zones de savanes sub-sahéliennes par exemple, ils constituent l'essentiel de la macrofaune tellurique active pendant la saison sèche et contribuent au turn-over de la matière organique de façon globalement comparable à celle des mammifères et des feux de brousse en assurant 20% de la minéralisation du carbone (Bignell & Eggleton, 2000). En outre, étant particulièrement sensibles (en terme de diversité, d'abondance et de biomasse) aux modifications de leur environnement, les termites sont potentiellement de bons indicateurs de la qualité des sols (Bignell & Eggleton, 2000 ; Jones & Eggleton, 2000).

L'influence majeure des termites sur les écosystèmes est non seulement due à leur distribution dans des biotopes variés, à leur organisation sociale mais surtout à leur association symbiotique avec des bactéries, protozoaires ou champignons (Higashi & Abe, 1996). En effet, leur régime alimentaire étant majoritairement constitué de débris végétaux riches en lignine et cellulose mais pauvres en azote (Kato et *al.*, 2002), ces derniers afin de pouvoir utiliser ce matériel végétal, ont au cours de leur histoire évolutive été obligés de développer des stratégies au nombre desquelles apparaissent les symbioses digestives (Breznak & Brune, 1994 ; Nalepa, 1994). En effet, les termites possèdent une flore intestinale spécialisée contenant des bactéries, des archées, des levures et probablement des champignons leur permettant de se nourrir de matières végétales lignocellulosiques difficilement dégradables (Kumari et *al.*, 2006). Le rôle de la flore microbienne symbiotique serait principalement de sécréter des enzymes non disponibles chez l'insecte hôte et sans lesquelles ce dernier ne pourrait survivre (Bignell, 2000). La symbiose la plus performante est réalisée par les termites de la sous-famille des Macrotermitinae (ou termites champignonnistes). Les Macrotermitinae sont en effet capables de recycler 95% de la production annuelle de litière (Collins, 1981) et ont une influence fonctionnelle 5 à 6 fois plus élevée que celle des autres termites (Bignell & Eggleton, 2000). De ce fait, ces termites supérieurs suscitent un intérêt scientifique particulier.

1.1.2 La sous-famille des Macrotermitinae

1.1.2.1 Répartition géographique

Les Macrotermitinae sont une sous-famille de termites supérieurs abondants dans les écosystèmes Africains et Asiatiques (Eggleton, 2000). L'origine de ce groupe de termites semblait difficile à déterminer car ces derniers présentent des similarités avec des termites inférieurs, notamment au niveau de la structure intestinale jadis considérée comme un bon indicateur phylogénétique (Donovan et *al.*, 2000 ; Bignell, 1994).

Ainsi, les premiers travaux sur leur distribution géographique ont été ceux d’Emerson (1955) montrant que les termites champignonnistes provenaient d’Afrique à l’Oligocène puis progressivement ils se seraient répartis en Asie du Sud et du Sud-Est. Une étude plus récente (Aanen & Eggleton, 2005) permet maintenant d’avoir une idée plus précise de l’origine géographique et la distribution des Macrotermitinae. Ces deux chercheurs ont révélé à partir de 49 espèces correspondant à 10 des 11 genres connus de termites champignonnistes et couvrant la majorité des aires écologiques de ce groupe, que les Macrotermitinae proviennent des forêts humides d’Afrique à partir desquelles ils ont colonisé de façon répétitive les savanes Africaines. Puis, concernant les migrations hors d’Afrique, il y en aurait eu au moins 4 en Asie et une à Madagascar (figure 1).

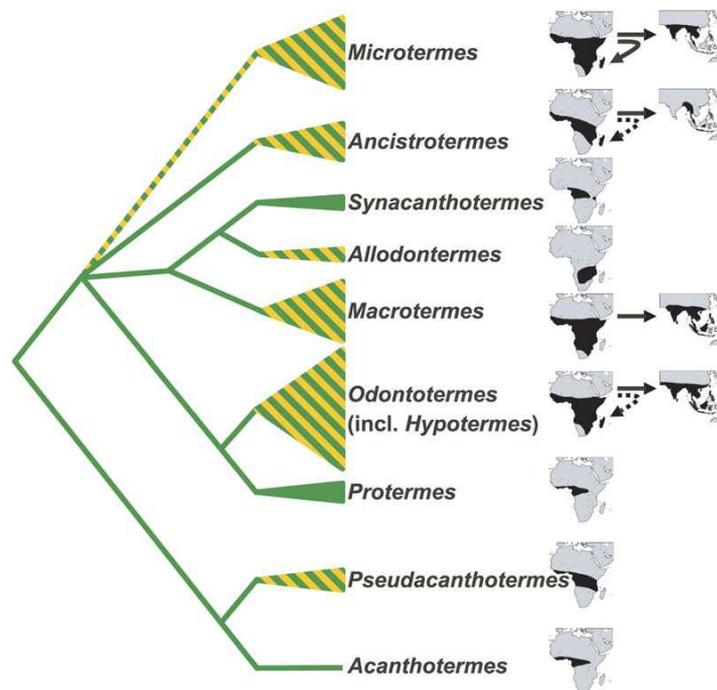


Figure 1 : Représentation simplifiée de l’origine biogéographique des termites champignonnistes (selon Aanen & Eggleton, 2005). L’absence de rayure indique une origine ancestrale forestière et les rayures une origine ancestrale ambiguë. Les triangles indiquent les types d’habitats colonisés. L’absence de rayures pour forestier et les rayures pour à la fois forestier et savanien. L’origine africaine des genres *Ancistrotermes* et *Odontotermes* Malgaches est incertaine et représentée par des pointillés.

1.1.2.2 Association symbiotique Macrotermitinae/*Termitomyces*

Les termites de la sous-famille des Macrotermitinae ont une relation symbiotique avec un champignon basidiomycète du genre *Termitomyces* (Rouland-Lefèvre, 2000 ; Rouland-Lefèvre et al., 2002 ; 2006 ; Rouland-Lefèvre & Bignell, 2001).

Contrairement aux associations existant chez la plupart des autres termites qui sont plutôt des endosymbioses avec des archées, amibes, levures, spirochètes, actinomycètes ou flagellées, les termites Macrotermitinae ont quant à eux, une exosymbiose avec un champignon qu'ils cultivent sur une structure spéciale construite à l'intérieur de leur nid et appelée meule à champignons. Les meules sont construites grâce aux ouvriers adultes qui récoltent des débris végétaux présents à l'extérieur des nids et les rapportent à l'intérieur où les jeunes ouvriers les mastiquent et les ingèrent puis, après un court transit intestinal, les fèces qui en résultent servent à fabriquer le substrat de croissance du *Termitomyces* symbiotique. Les jeunes ouvriers ingèrent également les mycotêtes de *Termitomyces* riches en azote. Ce supplément d'azote constituerait un apport nutritionnel important et les aiderait d'une part dans le développement des glandes labiales pour l'approvisionnement des larves et des reproducteurs et d'autre part dans le recyclage de la matière végétale via les enzymes contenues dans les mycotêtes (Hongoh et *al.*, 2006 ; Rouland-Lefèvre, 2000). L'origine fécale de la meule est restée longtemps inconnue et sujette à polémique. Après Josens (1971), l'on a su que le matériel végétal subissait un transit intestinal où il était prédégradé avant d'être utilisé pour la construction des meules. Ainsi, Grassé (1978) distinguait deux fèces, l'un primaire utilisé pour la fabrication de la meule et l'autre final qui est produit après la digestion réelle des termites (figure 2).

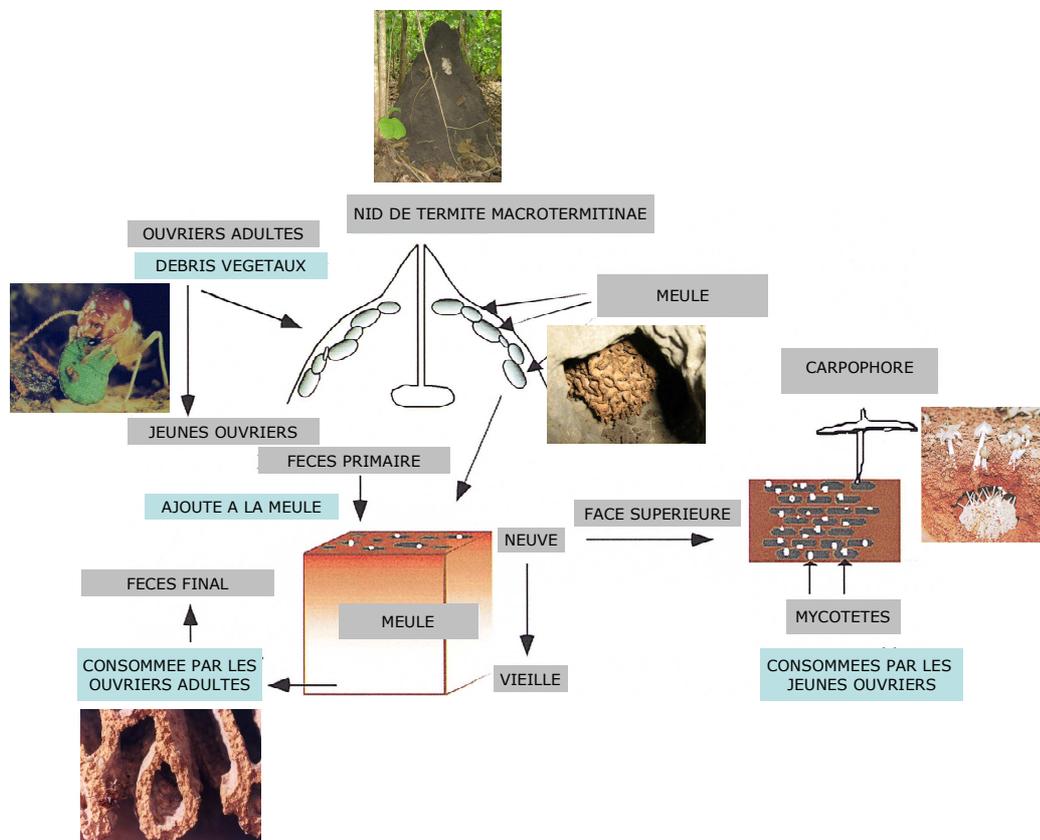


Figure 2 : Schématisation de la relation entre les Macrotermitinae et les champignons *Termitomyces*

Les variations visibles observées au niveau de la dimension et de l'aspect des meules permettent généralement de différencier les genres de Macrotermitinae de même que les *Termitomyces* associés. Ainsi, globalement trois types de meules sont observés. Le premier (type I) de forme alvéolaire, clair à la base et sombre au sommet qui est spécifique des genres *Macrotermes*, *Odontotermes* et *Protermes* ; le type II sphérique ou globulaire, plus ou moins solide et de faible diamètre est caractéristique des meules de *Microtermes* et *Ancistrotermes* ; et le type III majoritairement caractéristique des genres *Acanthotermes* et *Pseudacanthotermes* est formé de lamelles verticales, de couleur marron mais blanchissant progressivement avec l'âge de la meule (Wood & Thomas, 1989 ; Rouland-Lefèvre, 2000 ; Rouland-Lefèvre & Bignell, 2001).

L'association Macrotermitinae/*Termitomyces* est définie comme étant une symbiose obligatoire. Ce mutualisme est largement basé sur le fait que le *Termitomyces* aide les termites Macrotermitinae dans le recyclage du matériel végétal via son complexe enzymatique performant et en retour, ces derniers mettent en place un environnement extrêmement favorable à la croissance du champignon symbiotique et veillent à la pérennité de ce dernier en assurant sa propagation lors d'établissement de nouveaux nids (Thomas, 1987a et b ; Wood & Thomas, 1989 ; Rouland-Lefèvre & Bignell, 2001). Les deux partenaires de cette symbiose ont adapté leur cycle de vie afin d'assurer la transmission effective du champignon symbiotique à chaque nouvelle colonie de Macrotermitinae.

Il est clairement établi que les termites acquièrent leur champignon symbiotique à la fois horizontalement et verticalement (Rouland-Lefèvre et al., 2002 ; Aanen et al., 2002). Pour la majorité des espèces, après fructification du *Termitomyces*, les spores ingérées par les ouvriers à travers l'alimentation sont inoculées dans les matières fécales servant à la construction de la première meule à champignon. Concernant les autres Macrotermitinae dont le *Termitomyces* associé ne fructifie pas, la transmission du symbiote est effectuée par les ailés reproducteurs qui ingèrent les spores du champignon symbiotique avant de quitter le nid parental. Rouland-Lefèvre (2000) se basant sur les capacités fonctionnelles des *Termitomyces* distingue deux catégories: les 'spécialistes' qui sont associés à un genre spécifique de Macrotermitinae et les 'généralistes' qui peuvent avoir des connexions avec plusieurs genres différents. Cette distinction est appuyée par les résultats des récents travaux de De Fine Licht et al. (2007). Ces derniers ont montré qu'en échangeant les champignons symbiotiques de deux Macrotermitinae sympatriques *Macrotermes natalensis* et *Odontotermes badius* respectivement associés à un *Termitomyces* 'spécialiste' et un autre 'généraliste', la survivance de *M. natalensis* se trouve significativement réduite contrairement à celle de *O. badius*.

Bien qu'en présence des termites le basidiomycète symbionte soit l'unique souche fongique visible, plusieurs observations des meules abandonnées ou extraites des termitières révèlent la présence d'autres champignons dont majoritairement un champignon du genre *Xylaria* (figure 3) (Grassé, 1937 ; Sands, 1969 ; Heim, 1977 ; Batra & Batra, 1979 ; Wood & Thomas, 1989).



Figure 3 : Observation des hampes de *Xylaria* sur des meules de Macrotermitinae

Le genre *Xylaria* (famille des *Xylariaceae*, classe des Pyrénomycètes) est caractérisé par la formation de hampes (Lee et *al.*, 2000) et contient des champignons communément retrouvés à l'intérieur des tissus végétaux et de ce fait, endophytes de plusieurs plantes tropicales (Rodrigues & Samuel, 1990 ; Petrini, 1991 ; Rodrigues & Petrini, 1997). Les espèces endophytes peuvent être des pathogènes, des mutualistes et/ou des saprophytes latents (Carroll, 1991 ; Fischer & Petrini, 1992). Une des difficultés majeures dans l'étude des *Xylaria* est la difficulté à identifier et à classer les taxons de ce genre. Ceci provient principalement du fait que la couleur, les dimensions voire l'aspect général des hampes varient énormément avec le stage de développement et la localité, mais aussi qu'il est très difficile d'observer les sites de germination des ascospores (Whalley, 1996 ; Lee et *al.*, 2000 ; Rogers et *al.*, 2005).

Il existe par conséquent un manque cruel de données scientifiques concernant les *Xylaria*. La nature de l'association *Xylaria*/Macrotermitinae ainsi que la diversité des *Xylaria* associés aux Macrotermitinae restent par exemple toujours inconnues. Ces derniers étant considérés par certains auteurs comme étant des saprophytes ou par d'autres comme des partenaires de la symbiose à l'instar des *Termitomyces*. Bien qu'un parallèle ait été effectué avec les champignons du genre *Escovopsis* qui sont des parasites spécialisés des meules de fourmis champignonnistes et ayant évolué avec les fourmis hôtes (Mueller & Gerardo, 2002), seule une caractérisation moléculaire pourrait clarifier la relation entre les *Xylaria* qui se développent sur les meules et les termites de la sous-famille des Macrotermitinae (Rogers et *al.*, 2005).

1.1.2.3 Macrotermitinae et production de peptides antimicrobiens

Les deux types de défense qu'ont les insectes contre les pathogènes sont les mécanismes cellulaires (phagocytose ou encapsulation) et humoraux (synthèse de substances antimicrobiennes à large spectre) (Lamberty et *al.*, 1997 ; Lee et *al.*, 2003). Dans le dernier cas, plus de 700 Peptides Antimicrobiens (AMPs) ont ainsi été caractérisés (<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/antimic.html>) dont environ la moitié chez les insectes. Les AMPs constituent une alternative naturelle aux antibiotiques chimiques et un potentiel certain en cas d'applications biotechnologiques (synthèse de Marshall & Arenas, 2003). Toutefois, contrairement aux termites supérieurs du genre *Nasutitermes* qui ont été très largement étudiés ainsi que certains termites inférieurs appartenant aux *Réticulitermes*, une seule espèce de Macrotermitinae a été identifiée comme sécrétant des AMPs. En effet, Lamberty et *al.* (2001) ont chez *Pseudacantotermes spiniger*, isolés deux AMPs appelés spinigérine et termiticine. Les différents tests antifongiques et antibactériens réalisés ont révélé que le premier est potentiellement actif contre les bactéries, une levure *Candida albicans* et des champignons filamenteux tels que *Trichoderma viride*, *Neurospora crassa* et *Fusarium culmorum*, tandis que le second (isolé des granules hématocytaires et des glandes salivaires) est principalement antifongique et affecte peu les bactéries Gram+ (Lamberty et *al.*, 2001 ; Da Silva et *al.*, 2003). Cependant, par opposition à la plupart des AMPs isolés chez les insectes et uniquement sécrétés par le système immunitaire en réponse à une infection microbienne, la spinigérine et la termiticine sont constamment présentes chez le termite *P. spiniger* (Lamberty et *al.*, 2001).

La détection d'AMPs chez les Macrotermitinae est d'autant plus importante qu'il est suspecté que la présence du *Termitomyces* sur la meule, champignon à croissance pourtant très lente, serait favorisée par le termite via la sécrétion de substances fongostatiques inhibant les potentiels compétiteurs (Thomas 1987; Wood & Thomas, 1989 ; Rouland-Lefèvre, 2000 ; Rouland-Lefèvre & Bignell, 2001). Toutefois, l'on sait encore peu de choses sur les mécanismes potentiellement impliqués dans la symbiose Macrotermitinae/*Termitomyces*.

1.1.3 Matériel lignocellulosique et biodégradation fongique

La plus grande quantité du carbone organique terrestre provient des résidus végétaux qui contiennent différentes concentrations de cellulose, d'hémicelluloses, de lignine et de protéines.

La cellulose (34-62%), les hémicelluloses (14-36%) et la lignine (18-39%) sont les trois constituants majeurs des membranes végétales (Fengel & Wegener, 1984 ; Paul & Clark, 1996). Les espèces animales étant faiblement équipées pour dégrader les composés pariétaux, les agents de décomposition sont les microorganismes principalement les champignons. La dégradation de la matière végétale et la formation de matière organique ayant déjà été synthétisée par plusieurs travaux (Wilson, 1991 ; Stevenson, 1994), nous ne reprendrons ici que les caractéristiques principales ainsi que les capacités fonctionnelles de certains champignons d'intérêt.

La cellulose est un homopolysaccharide composé d'unités β -D-glucopyranose liées entre elles par une liaison β -(1-4) glucosidique (Kögel-Knabner, 2002). Les molécules de cellulose sont agrégées en microfibrilles formant des fibrilles cristallines (Paul & Clark, 1996). Le degré de polymérisation des chaînes de cellulose varie entre 500 et 25000 (Kuhad et al., 1997). En plus de son rôle biologique dans le cycle du carbone, la cellulose constitue une source alternative de carburants, entraînant ainsi un intérêt accru pour les organismes capables de la décomposer. Ainsi, les cellulases des champignons du genre *Trichoderma* ont par exemple été très étudiées de même que celles d'autres genres telluriques comme *Chaetomium* (cellulases thermotolérantes), *Penicillium* et *Fusarium*. L'hydrolyse de la cellulose fait intervenir trois enzymes agissant en synergie à savoir les endogluconases, les exogluconases (cellobiohydrolases) et les β -glucosidases aussi appelées cellobiases (Paul & Clark, 1996 ; Kumari et al., 2006). Un autre carbohydrate, l'amidon, constitue le réservoir alimentaire des plantes et contient deux polymères de glucose: l'amylose et l'amylopectine. Plusieurs champignons sont capables d'hydrolyser l'amidon en produisant des enzymes extracellulaires notamment les α et β -amylases (Paul & Clark, 1996). L' α -amylase dégrade l'amylose et l'amylopectine en plusieurs unités de glucose tandis que la β -amylase réduit l'amylose en maltose. L'amylopectine quant à elle est réduite en un mélange de maltose et de dextrans.

Les hémicelluloses sont des molécules chimiquement complexes qui incluent différents hétéropolysaccharides dont le plus important est le xylane (König et al., 2006). Elles sont formées de sucres neutres, d'acide uronique et de groupes acétyles, différant selon leur origine (Joseleau, 1980 ; Kumari et al., 2006). A cause de leur nature amorphe et du faible degré de polymérisation (environ 70-120), les hémicelluloses sont dégradées plus facilement que la cellulose. Toutefois, même si à l'état pur elles sont facilement hydrolysées, dans la nature elles sont plus difficilement dégradées car complexées avec d'autres molécules (polysaccharides, protéines, composés aromatiques,...). En plus donc des enzymes requises pour hydrolyser la cellulose, d'autres sont nécessaires pour dégrader complètement les hémicelluloses.

Ainsi, les 'endo-hémicellulases' hydrolysent les hémicelluloses en petites molécules d'oligosaccharides qui sont par la suite dégradées en sucres monomériques et en acides acétiques par les 'exo-hémicellulases' (Paul & Clark, 1996 ; synthèse de Kuhad et *al.*, 1997). Spécifiquement, la dégradation complète du xylane requiert l'action de plusieurs enzymes dont principalement les endo-1,4- β -xylanases et β -xylosidases qui sont très utilisées dans l'industrie papetière.

La lignine est après la cellulose, le plus important composé organique naturel sur terre et cette dernière protège la matrice cellulose/hémicellulose formant les végétaux. La lignine est un polymère aromatique naturel de poids moléculaire élevé (>100 kDa, Kastner, 2000) qui résulte de la polymérisation des sous-unités de phényles propanoïdes. L'unité structurale de base de la lignine est soit formée d'un anneau aromatique lié à un groupe méthoxyle (alcool coniférylique) donnant la lignine guaiacyle des gymnospermes, ou liée à deux groupements méthoxyles (alcool sinapylique) formant la lignine syringuile typique des angiospermes. La lignine des plantes herbacées est composée en majorité de monomères phényles propanoïdes, sans groupements méthoxyles (alcool coumarylique). Cette molécule complexe et récalcitrante sert de liant entre les membranes cellulaires et tout en diminuant la perméabilité des tissus, confère aux plantes leur rigidité (Eriksson et *al.*, 1990).

La lignine étant plus réfractaire à l'attaque microbienne que les hydrates de carbone qu'elle entoure, seule une flore particulière notamment la mycoflore peut en assurer la minéralisation et l'humification. La couleur du substrat résiduel indique le type de dégradation (Paul & Clark, 1996). Ainsi, les champignons de pourriture blanche ou 'white rot fungi' qui dégradent la matière lignocellulosique en laissant un résidu fibreux blanc (Paul & Clark, 1996) sont surtout des basidiomycètes. Ces derniers colonisent très vite la matière végétale et dégradent simultanément la cellulose et les hémicelluloses ainsi que la lignine qui est alors rapidement métabolisée (Kirk & Farrell, 1987). A cause de cette aptitude fonctionnelle très intéressante, le complexe enzymatique de nombreux champignons de pourriture blanche a été très largement étudié (espèce modèle *Phanerochaete chrysosporium*, Blanchette, 1991 ; Zhao et *al.*, 1995 ; 1996a et b) de même que celui du *Termitomyces* qui est membre de ce groupe (Rouland et *al.*, 1988 ; 1991 ; Matoub et Rouland, 1995 ; Mora et *al.*, 1998 ; Mora et Lattaud, 1999 ; Hyodo et *al.*, 2000 ; 2003 ; Ghosh et *al.*, 2002 ; Taprab et *al.*, 2005). Plusieurs enzymes extracellulaires sont impliquées dans la dépolymérisation de la lignine à savoir Lignine Peroxidase (LiP), Manganèse Peroxidase (MnP) et Laccases. Il a par exemple été retrouvé chez *Termitomyces albuminosus*, une nouvelle Manganèse Peroxidase potentiellement impliquée dans la dégradation de la lignine (Ohkuma et *al.*, 2001).

Dans la relation Macrotermitinae/*Termitomyces*, plusieurs auteurs suggèrent que le champignon a un rôle actif dans la dégradation des composés phénoliques réfractaires comme la lignine et dans la diminution du ratio C/N des débris végétaux avant leur ingestion par les termites, améliorant ainsi la qualité de l'alimentation de ces derniers. Les Macrotermitinae utiliseraient donc les capacités enzymatiques de leur symbionte dans la dégradation de leur nourriture riche en composés lignocellulosiques ou pouvant contenir des molécules comme les phénols, tannins et terpénoïdes présents en grande quantité dans le bois (Fengel & Wegener, 1984). La dégradation de ces composés aromatiques par la flore symbiotique en plus de fournir aux termites hôtes des molécules plus facilement assimilables comme source de carbone, constitue également une détoxification car ces composés sont connus pour être nuisibles aux insectes (König et al., 2006).

Le *Termitomyces* secrèterait aussi des enzymes telles que des cellulases et des xylanases qui pourraient fonctionner en synergie et de façon complémentaire à celles endogènes du tube digestif du termite (hypothèse des enzymes acquises, voir synthèse de Rouland-Lefèvre, 2000). Toutefois, ce rôle fonctionnel du *Termitomyces* dans la symbiose et particulièrement l'origine fongique de certaines enzymes retrouvées chez le termite hôte reste assez controversé (Bignell et al., 1994). Ce dernier semble être extrêmement dépendant des espèces de Macrotermitinae et des enzymes étudiées (tableau 1).

Par ailleurs, de nombreux auteurs ont récemment mis en avant le potentiel des ascomycètes dans la dégradation des composés phénoliques (Battestin et al., 2007 ; Kluczek-Turpeinen et al., 2007 ; Lopez et al., 2007). Des espèces appartenant au genre *Aspergillus* ont par exemple de grandes capacités de dégradation de la lignine (Shah et al., 2005), une MnP alcaline très intéressante pour l'industrie car ayant un unique optimum pH (11-12,5) a même été isolée chez *A. terreus* (Kanayama et al., 2002). Plusieurs études ont également montré que certains ascomycètes produisaient des laccases (Palonen et al., 2003 ; Tetsch et al., 2005 ; Pointing et al., 2005 ; Lopez et al., 2007) et qu'ils pouvaient même dégrader significativement plus la lignine que la cellulose (Vane et al., 2005 ; Liers et al., 2006). Liers et al. (2006) ont révélé par exemple que les espèces de *Xylaria* utilisées dans leurs travaux minéralisent la lignine de façon comparable à certains basidiomycètes décomposeurs de litières (cas d'*Agrocybe praecox*). Cependant, malgré le fait que des ascomycètes peuvent dégrader de façon équivalente voire plus importante la lignine que les champignons de pourritures blanches, très peu d'études ont concerné leur potentiel lignocellulolytique (Lopez et al., 2007).

Tableau 1: Rôle potentiel du *Termitomyces* dans la symbiose digestive de plusieurs espèces de Macrotermitinae (De Fine et al., 2007)

<i>Termitomyces</i> associés	Dégradation de la lignine	Pas de dégradation de la lignine	Cellulases acquises	Xylanases acquises	Pas de cellulase acquise	Références
<i>Macrotermes natalensis</i>	✕		✕			Rohrmann, 1978 ; Martin & Martin, 1977 ; 1978
<i>Macrotermes ukuzii</i>	✕					Rohrmann, 1978 ; Rohrmann & Rossman, 1980
<i>Macrotermes gilvus</i>	✕					Hyodo et al., 2000
<i>Macrotermes annandalei</i>	✕					Hyodo et al., 2003
<i>Macrotermes carbonarius</i>	✕					Hyodo et al., 2003
<i>Macrotermes muelleri</i>	✕					Hyodo et al., 2003
<i>Odontotermes badius</i>	✕					Cmelik & Douglas, 1970
<i>Macrotermes subhyalinus</i>			✕		✕	Abo-Khatwa, 1978 ; Veivers et al., 1991 ; Bignell et al., 1994
<i>Macrotermes mülleri</i>			✕	✕		Rouland et al., 1988a ; Rouland et al., 1988b
<i>Odontotermes sp1</i>		✕				Hyodo et al., 2003
<i>Odontotermes formosanus</i>		✕				Hyodo et al., 2003
<i>Odontotermes takensis</i>		✕				Hyodo et al., 2003
<i>Hypotermes makhamensis</i>		✕				Hyodo et al., 2003
<i>Ancistrotermes pakistanicus</i>		✕				Hyodo et al., 2003
<i>Pseudacantotermes militaris</i>		✕				Hyodo et al., 2003
<i>Macrotermes bellicosus</i>				✕		Matoub & Rouland, 1995 ; Rouland et al., 1991
<i>Odontotermes</i> nr. <i>Pauperans</i>				✕		Rouland et al., 1991
<i>Macrotermes barneyi</i>					✕	Crosland et al., 1996
<i>Macrotermes michaelsoni</i>					✕	Veivers et al., 1991 ; Bignell et al., 1994

La plupart des travaux sur les enzymes extracellulaires produites par des champignons ont en effet concerné majoritairement les basidiomycètes (Pelaez et *al.*, 1995 ; De Koker et *al.*, 2000 ; Ferreira-Gregorio et *al.*, 2006 ; Lin et *al.*, 2006). Le système enzymatique des ascomycètes devrait davantage être étudié tant à cause de leur implication dans le recyclage de la matière végétale en milieu naturel que pour leur potentiel industriel (synthèse de Xu, 2005).

1.1.4 Interactions fongiques

L'étude des interactions est capitale pour expliquer les changements observés au niveau de la structure des communautés microbiennes (Badalyan et *al.*, 2004). Les interactions fongiques par exemple, s'effectuent principalement par trois mécanismes intervenant indépendamment ou simultanément à savoir : le parasitisme (nutrition au détriment de l'espèce hôte), l'antibiose (production de métabolites inhibiteurs ou antibiotiques) et la compétition (diminution ou indisponibilité des ressources ou de l'espace) (Janisiewicz & Roitman, 1988 ; Whipps & Lumsden, 1991 ; Winiewski et *al.*, 1991 ; Celar, 2000 ; Santos et *al.*, 2000). La compétition a été définie par les écologistes comme étant 'les effets négatifs qu'un organisme a sur un autre en consommant ou contrôlant l'accès à une ressource disponible en quantité limitée' (Keddy, 1989) et l'antibiose comme 'les mécanismes induits par des métabolites spécifiques comme des enzymes, des composés volatiles et des antibiotiques'. Sur milieu gélosé, la compétition en tant que phénomène n'est toutefois pas différenciable de l'antibiose (Lockwood, 1988).

Les interactions compétitives peuvent être résumées en interactions directes et indirectes (Griffin, 1994 ; Dix & Webster, 1995). Elles sont indirectes quand elles ont lieu sans intervention chimique ou sans la présence d'un stimulus. C'est par exemple une souche fongique qui supprime tous les nutriments présents dans la zone entre elle et une seconde souche, empêchant ainsi cette dernière d'accéder à l'aire déjà colonisée. Cette interaction est particulièrement importante quand les demandes énergétiques sont inégales, l'un des compétiteurs ayant un besoin plus élevé pour la ressource en compétition. Des interactions directes peuvent également avoir lieu toujours sans contact entre les différents protagonistes, par la sécrétion de métabolites secondaires (antibiotiques volatiles et/ou diffusibles) qui peuvent inhiber ou détruire à distance les compétiteurs. Les phénomènes de contact parfois accompagnés par la production d'antibiotiques concernent principalement la lyse des hyphes d'une souche fongique par une autre.

La compétition pour l'espace ou les nutriments joue un rôle fondamental dans la distribution, la succession et la l'abondance de la mycoflore (Widden, 1997). Les phénomènes de compétition fongique se déroulent souvent en deux phases: la première caractérisée par une bonne dispersion, une sporulation rapide, une extension mycélienne et une capacité à utiliser rapidement les ressources disponibles, et la seconde par la sécurisation et la défense du territoire conquis contre d'éventuels challengers via le mycoparasitisme ou la production de composés antibiotiques (Boddy, 2000). La compétition dépend cependant de plusieurs facteurs notamment des conditions environnementales (température, pH, pression atmosphérique), du substrat, du statut nutritionnel ainsi que la nature intrinsèque des isolats c'est-à-dire leur aptitude naturelle à coloniser ou à protéger un substrat (Cano & Bago, 2005).

L'étude des interactions fongiques permet également l'exploitation de la mycoflore pour contrôler des pathogènes dans des environnements naturels ou semi-naturels. Des levures sont par exemple couramment utilisées dans le contrôle biologique, ce dernier étant défini comme l'utilisation d'agents vivants pour contrôler aussi bien les insectes nuisibles que les pathogènes des plantes (McLaughlin et al., 1990 ; Petersson & Schnurer, 1995 ; Badalyan et al., 2004 ; Bleve et al., 2006 ; Zhao et al., 2008). Des deutéromycètes ont aussi un potentiel prometteur dans le biocontrôle ; *Beauveria* et *Metarhizium* contre les moustiques, *Coniothyrium* contre les pourritures des racines et *Trichoderma* contre divers champignons phytopathogènes (Paul & Clark, 1996).

Les biotopes naturels de la mycoflore sont caractérisés par une quantité limitée de nutriments facilement assimilables (sucres simples et amino-acides), entraînant donc une compétition pour ces ressources (Blakeman, 1978). En cas d'interaction avec d'autres organismes pour l'accession aux nutriments, un champignon produisant des antibiotiques a un avantage considérable car étant plus compétitif (Lumsden et al., 1990 ; Celar, 2003). Dans ce cadre, pour expliquer sur la meule le développement du *Termitomyces* symbiotique généralement à croissance très lente, il est aussi suspecté que ce dernier pourrait réguler la colonisation fongique des meules en produisant des substances inhibitrices (synthèse de Wood & Thomas, 1989). Toutefois, aucune étude ne s'est encore intéressée aux interactions entre le champignon symbiotique et les autres communautés fongiques des meules.

1.1.5 Principales approches utilisées en écologie microbienne

Au-delà de la simple visualisation des microorganismes, l'écologie microbienne vise leur détection, leur énumération, mais aussi la connaissance de leur morphologie, leur physiologie, leur fonction et leur rôle écologique.

Dans cette optique, plusieurs méthodes d'investigation sont utilisées notamment les techniques nécessitant une phase de culture préalable et celles dites de 'fingerprinting moléculaire' basées sur l'analyse des acides nucléiques. De nombreux travaux de qualité ayant déjà synthétisé, comparé et mis en avant les biais et avantages inhérents à la plupart des techniques (Muyzer & Ramsing, 1995 ; Vaneechoutte, 1996 ; Muyzer & Smalla, 1998 ; Hill et *al.*, 2000 ; Preston-Mafham et *al.*, 2002 ; Nannipieri et *al.*, 2003 ; Avis et *al.*, 2006 ; Nichols, 2007 ; Ritz, 2007), nous ne reprendrons donc brièvement ici que les principaux traits des méthodes les plus utilisées.

1.1.5.1 Méthodes d'étude de la mycoflore cultivable

Les techniques de culture sont largement utilisées dans l'étude quantitative et qualitative de la diversité fongique. Cultiver un champignon implique le transfert de ses propagules dans un milieu nutritif permettant sa croissance. Une large variété de milieux de culture (standards ou modifiés par l'acidification ou l'addition d'antibiotiques) et de conditions d'incubation peut être utilisée (Frankland et *al.*, 1991 ; Paul & Clark, 1996). D'autres approches comme les systèmes BIOLOG ou API en utilisant les capacités de la flore fongique à croître sur différents types de substrats carbonés permettent de caractériser des microorganismes inconnus en les regroupant par aptitudes fonctionnelles à l'aide d'analyses multivariées et d'indices de similarité (Paul & Clark, 1996). Adaptée des précédents systèmes utilisant des substrats déshydratés, une technique dénommée CLPP (Community Level Physiological Profiling, Garland & Mills, 1991) permet d'inoculer directement une suspension microbienne, évitant ainsi l'étape de l'isolement sur milieu.

Toutefois, ces méthodes d'analyse sont limitées par plusieurs facteurs notamment la composition du milieu, les conditions réactionnelles (température, pH, oxygène, lumière, salinité), les différences physiologiques existant entre les microorganismes ainsi que la possible adhésion de ces derniers aux particules inorganiques qui ne permettent pas l'isolement et l'énumération de l'ensemble des microorganismes d'un échantillon (Urzi et *al.*, 2003). Aussi, il existerait d'une part une variation (de l'ordre de 100-1000 fois) entre le nombre de CFUs (Colony Forming Units) provenant des cultures et le comptage direct en microscopie et d'autre part seulement 1-10% de la diversité microbienne d'un échantillon serait accessible via les méthodes classiques d'isolement sur milieux (Johnsen et *al.*, 2001). Des techniques comme la CLPP étant dépendantes des substrats présents, celles-ci ne permettent donc que la détermination d'une micro-écologie de la fraction microbienne cultivable des échantillons (Preston-Mafham et *al.*, 2002). Des changements peuvent également s'opérer au niveau des communautés microbiennes durant l'incubation (Smalla et *al.*, 1998) et la contribution de la mycoflore est très peu mesurée à cause de la croissance lente des champignons (Haack et *al.*, 1995).

Cependant, malgré les biais potentiels associés aux techniques de culture, celles-ci sont néanmoins très importantes car permettent l'isolement de taxons fongiques utilisés pour des études écologiques, biochimiques, physiologiques et pour la création d'amorces nucléotidiques servant à la détection génétique de la diversité *in situ* (Urzi et al., 2003 ; Ward, 2006 ; Ritz, 2007). La connaissance du potentiel fonctionnel des *Termitomyces* dans la symbiose digestive a par exemple été possible grâce à ces techniques (Rouland et al., 1991 ; Matoub & Rouland, 1995) qui ont également permis d'étudier les modifications fonctionnelles de la mycoflore des placages de Macrotermitinae (Diouf et al., 2006). Les isolats cultivés peuvent également servir en laboratoire pour simuler des phénomènes s'opérant en milieu naturel. Aussi, les isollements sur milieux peuvent être de meilleurs outils d'évaluation environnementale car le pourcentage de microorganismes isolés d'un échantillon peut être 'écologiquement dépendant' c'est-à-dire lié à la santé physiologique des communautés (Ellis et al., 2003).

En essayant de faire correspondre au maximum les conditions *in vitro* à celles *in vivo*, de nouvelles stratégies de cultures tendent à limiter les principaux biais que sont la non cultivabilité de tous les microorganismes et le fait que ces derniers puissent avoir des réactions non naturelles sur des milieux synthétiques (Nichols, 2007). Ainsi, des milieux de culture à base d'éléments naturels (eau de mer pour isoler des microorganismes par exemple) (Connon & Giovannoni, 2002 ; Cho & Giovannoni, 2004), la modification du temps d'incubation (Stevenson et al., 2004) et l'utilisation des chambres de croissance permettant une 'culture microbienne *in situ*' car les microorganismes sont chimiquement maintenus en contact avec leur environnement initial (Kaeberlein et al., 2002 ; Schering et al., 2006), augmentent considérablement la détection de la diversité microbienne et favorisent l'isolement de nombreux microorganismes inconnus ou non cultivés à ce jour.

1.1.5.2 Analyse moléculaire des communautés fongiques

La création de banques de clones a été une première alternative aux méthodes de cultures en fournissant des informations phylogénétiques détaillées sur de nombreuses communautés microbiennes (Kent & Triplett, 2002). Toutefois, pour l'étude des modifications spatiales et temporelles des populations nécessitant un très grand nombre d'échantillons, le clonage apparaît laborieux et très coûteux et donc inadapté (Muyzer & Smalla, 1998). Ainsi, des méthodes dites de 'fingerprinting moléculaire' ont été développées afin de permettre l'étude de la structure génétique des communautés microbiennes, sans une connaissance préalable du génome. L'avènement de ces méthodes d'empreintes génétiques a permis de détecter de nombreuses communautés fongiques non cultivables ou non encore cultivées, en évitant l'étape de culture et contournant ainsi les principales limites des techniques traditionnelles d'isolement.

Le terme 'fingerprinting moléculaire' désigne des techniques permettant la caractérisation des communautés microbiennes à travers l'analyse du patron électrophorétique des acides nucléiques (Urzi et *al.*, 2003). Les acides nucléiques (ADN et ARN) sont des constituants majeurs des cellules vivantes et constituent d'excellentes signatures moléculaires (Paul & Clark, 1996). Etant plus facilement extrait que l'ARN, l'ADN est plus couramment utilisé. Avec la découverte de la DNA polymérase qui copie l'ADN durant la division cellulaire, de nombreuses techniques telles que D/TGGE (Muyzer et *al.*, 1993 ; Heuer et *al.*, 1997 ; Wartell et *al.*, 1998 ; Muyzer & Smalla, 1998 ; Heuer et *al.*, 2001), A/RISA (Fisher & Tripplett, 1999 ; Ranjard et *al.*, 2000), SSCP (Orita et *al.*, 1989 ; Lee et *al.*, 1996 ; Schwieger & Tebbe, 1998), T-RFLP (Liu et *al.*, 1997) sont utilisées. Ces techniques ont en commun deux principales étapes que sont l'extraction des acides nucléiques (voir synthèse de Roose-Amsaleg et *al.*, 2001) et l'amplification par Polymerase Chain Reaction (voir synthèse de Wilson, 1997).

La RISA (Ribosomal Inter Space Analysis) consiste en une amplification de l'IGS (Intergenic Spacer) ou de l'ITS (Internal Transcribed Spacer) à l'aide d'un couple d'amorces suivie par une électrophorèse. L'automatisation de cette technique (ARISA) permet une comparaison quantitative des communautés étudiées. Jouquet et *al.* (2005) ont montré en utilisant l'ARISA que les termites champignonnistes influençaient la structure des communautés microbiennes des sols et que cette incidence était non seulement fonction de l'espèce de Macrotermitinae considérée mais également de la nature du milieu. Toutefois, en plus du fait que la longueur des espaceurs ne soit pas forcément liée à la distance génétique mais également du faible nombre de séquences contenues dans les bases de données, cette technique n'est pas très adaptée pour inférer des relations phylogénétiques (Treusch & Schleper, 2006).

L'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) est une méthode dans laquelle les produits PCR sont hydrolysés à l'aide d'enzymes de restriction, puis les fragments résultants sont séparés sur un gel d'agarose. Cette méthode est basée sur le principe selon lequel les sites de restriction sont conservés en fonction de leur patron phylogénétique. Toutefois, compte tenu du grand nombre de fragments observés notamment dans le cadre d'analyse d'échantillons complexes, cette technique a été modifiée en T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism). L'innovation repose sur le fait que les produits d'amplification sont marqués par fluorescence à leur extrémité à l'aide d'amorces, puis après digestion enzymatique et électrophorèse, seuls les fragments terminaux sont détectés permettant ainsi une lecture de la taille des fragments générés ainsi que de l'intensité de fluorescence.

Cette dernière méthode n'est cependant pas sans biais notamment au niveau de sa résolution relativement faible puisque des organismes phylogénétiquement proches ont souvent des profils identiques (Treich & Schleper, 2006). Aussi, l'enzyme de restriction peut favoriser la détection préférentielle d'un groupe de microorganismes en termes de richesse spécifique (Kuske et *al.*, 2002).

La SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) est une technique qui avant son application en écologie microbienne par Schwieger & Tebbe (1998), servait uniquement à détecter les mutations. L'amplification est réalisée avec un couple de primers dont l'extrémité 5' de l'amorce anti-sens contient un groupement phosphate. En conditions non dénaturantes, l'ADN double brins est traité avec une enzyme qui digère le brin phosphorylé. Les différences de conformation sont alors décelées par électrophorèse sur un gel d'acrylamide. Cette technique est également limitée par sa sensibilité moyenne mais aussi par le fait qu'une bande unique observée sur le profil électrophorétique peut contenir plusieurs organismes éloignés phylogénétiquement (Schwieger & Tebbe, 1998).

Très utilisée en écologie microbienne, la D/TGGE (Denaturing/Temperature Gradient Gel Electrophoresis) exploite les différences de stabilité de l'ADN double-brin en présence d'un gradient linéaire de dénaturants chimiques (urée et formamide) pour la DGGE et de température pour la TGGE. Des fragments d'ADN de même longueur mais avec des différences de séquences peuvent ainsi être séparés. Après l'amplification, l'ADN double-brin migre progressivement sur un gel de polyacrylamide jusqu'au niveau de son domaine de fusion le moins stable où il est partiellement dénaturé et arrête donc de migrer. La DGGE appliquée avec succès dans l'étude des communautés fongiques des placages de plusieurs espèces de Macrotermiteae, a permis de déceler une diversité taxonomique plus importante en comparaison des autres techniques utilisées (Diouf et *al.*, 2005). Aussi, afin d'optimiser la sensibilité de détection, un gradient d'acrylamide peut être couplé au gradient de dénaturants (Double-Gradient Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DG-DGGE, Cremonesi et *al.*, 1997). Toutefois, certains travaux ont noté qu'une bande DGGE peut ne pas correspondre à un taxon unique (Nübel et *al.*, 1996 ; Muyzer & Smalla, 1998 ; Heuer et *al.*, 2001).

Il ressort donc de ce qui précède qu'aussi bien les techniques traditionnelles d'isolement que les méthodes moléculaires présentent toutes des biais et qu'aucune par conséquent ne pourra déterminer complètement la diversité taxonomique d'un échantillon. Ainsi, seule une approche polyphasique associant plusieurs techniques complémentaires pouvant tenir compte à la fois de la fraction cultivable que de celle non cultivable, permettra d'appréhender de façon exhaustive la diversité microbienne. Une telle approche a donc été utilisée dans ce travail.

1.2 Objectifs, Hypothèses et Plan de la thèse

La recherche scientifique actuelle sur les termites couvre plusieurs aspects notamment l'écologie, la sociobiologie, l'évolution mais également la microbiologie. Dans le dernier cas, l'accent est actuellement mis sur la diversité réelle de la flore microbienne associée aux structures des termites.

A cause du mutualisme existant chez les termites de la sous-famille des Macrotermitinae, l'étude des communautés fongiques des meules présente un intérêt certain davantage pour mieux comprendre les mécanismes intervenants dans cette symbiose très rare dans le règne animal que pour des besoins plus classiques d'étude de la diversité fongique.

La diversité fongique est en outre estimée à 1,5 millions d'espèces dont seulement 5-10% ont déjà été décrites, ceci dû entre autre à de nombreux habitats non explorés et à des limitations méthodologiques. En outre, le constat actuel concernant la mycoflore est que cette dernière reste très peu étudiée en comparaison à la flore bactérienne surtout en zone tropicale. L'avènement des techniques moléculaires ces dernières années et le développement croissant des banques de séquences permettent maintenant une analyse beaucoup plus précise des communautés fongiques. La région génomique ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ADNr par exemple apparait comme une cible de choix pour l'étude des champignons et l'utilisation d'outils moléculaires comme la DGGE couplée aux techniques conventionnelles d'isolement peut permettre une meilleure détection de la diversité fongique.

- *Avec une approche polyphasique associant plusieurs techniques complémentaires, nous déterminerons la diversité taxonomique et la structure génétique de la mycoflore des meules.*

Aussi, le rôle écologique de la flore fongique des meules n'ayant jamais été étudié à l'exception de celui des *Termitomyces*, l'implication fonctionnelle de la mycoflore non symbiotique des meules est donc encore totalement méconnue. Afin donc de décrire une niche écologique, plusieurs approches méthodologiques incluant notamment le screening enzymatique, sont couramment utilisées.

- *Les aptitudes enzymatiques de la mycoflore non symbiotique des meules seront évaluées afin d'appréhender leur rôle fonctionnel dans la symbiose.*

Des études phylogénétiques ont permis de mettre en évidence que l'association entre le *Termitomyces* et les Macrotermitinae est une symbiose parfaite.

Toutefois, bien que le *Termitomyces* soit le seul champignon visible, lorsque les meules sont abandonnées un autre champignon appartenant au genre *Xylaria* est communément associé aux nids de Macrotermitinae. La nature de cette association n'a par contre jamais encore été étudiée.

- *La spécificité de la relation entre les Xylaria associés aux nids de Macrotermitinae et leurs hôtes a par conséquent été abordée dans ce travail.*

Une des principales zones d'ombre dans la symbiose *Termitomyces*/Macrotermitinae concerne les mécanismes favorisant la culture du champignon symbiotique dans un environnement pourtant très compétitif. Bien que plusieurs hypothèses aient été émises pour expliquer ce phénomène notamment la possible sécrétion de substances antifongiques par l'un des partenaires de la symbiose, la probable régulation fongique des meules a fait l'objet de très peu d'études.

- *Les interactions fongiques pouvant s'opérer dans la symbiose des Macrotermitinae ont donc été étudiées.*

Le cadre conceptuel de cette thèse a été structuré autour de 4 hypothèses de travail et des 10 questions qui en découlent.

H1. Les meules de Macrotermitinae ont une mycoflore spécifique.

Question 1: Quelles sont les communautés fongiques cultivables et non cultivables rencontrées dans les meules?

Question 2: La diversité fongique des meules est-elle comparable à celle du sol environnant?

Question 3: La mycoflore des meules est-elle caractéristique de l'espèce de termite hôte?

H2. La diversité taxonomique des meules de Macrotermitinae est liée à des différences fonctionnelles

Question 4: Quel est le profil physiologique des souches fongiques issues des meules?

Question 5: Certains phylotypes fongiques sont-ils potentiellement impliqués dans la symbiose?

H3. Les Xylaria retrouvés sur les meules sont spécifiques aux Macrotermitinae et ont coévolué avec les termites hôtes.

Question 6: Existe-il une espèce de *Xylaria* caractéristique d'un genre de termite ou un *Xylaria* peut-il se développer sur des meules construites par plusieurs genres différents?

Question 7: Existe-il une espèce de *Xylaria* spécifique à une région géographique?

Question 8: En cas de coévolution termite/*Xylaria*, celle-ci est-elle applicable à toutes les espèces?

H4. Les ouvriers de Macrotermitinae sont par leurs sécrétions salivaires responsables de la spécificité de la flore fongique des meules.

Question 9 : Par quels mécanismes les termites inhibent-ils la croissance des champignons saprophytes et favorisent le développement du *Termitomyces sp*?

Question 10 : Peut-il y avoir une action antifongique du *Termitomyces sp* sur les autres champignons des meules?

Après une introduction générale incluant un état des connaissances sur le sujet et les objectifs sous-tendant la présente étude, suivie par le Matériel & Méthodes qui décrit l'ensemble du matériel biologique et des techniques utilisés, nous exposons et discutons une première série de résultats sur la diversité fongique et le rôle fonctionnel de la mycoflore cultivable des meules. Après isolement des taxons cultivables puis comparaison avec la mycoflore environnante, les capacités enzymatiques de certains phylotypes ont été déterminées à travers les enzymes extracellulaires produites ainsi que leur capacité à utiliser les principaux polysaccharides et des acides dérivés de la lignine comme seule source de carbone. Les activités décelées ont ensuite été comparées à celles des champignons symbiotiques correspondants par une analyse de similarité. Dans le chapitre suivant, nous utilisons une technique moléculaire relativement bien connue (PCR-DGGE) puis nous modifions et adaptons à notre problématique un autre outil récemment mis en place chez les bactéries (SuPER PCR-DGGE) afin d'étudier la structure génétique des communautés fongiques des meules. Cette diversité fongique révélée par les différentes techniques a été comparée puis les variations observées de même que l'implication dans la symbiose des taxons identifiés sont discutées dans le même chapitre. Nous présentons ensuite le résultat des analyses phylogénétiques des *Xylaria* associés aux meules, inférées à partir des séquences ITS de l'ADNr et discutons de leur association avec les termites champignonnistes ainsi que de la probable affiliation des *Xylaria* dans un sous-genre spécifique ou un autre genre de champignon. Enfin, la dernière partie des résultats concerne les essais préliminaires effectués afin de déterminer la production d'éventuelles substances antifongiques par un des partenaires de la symbiose. Le présent mémoire se termine par une conclusion générale et des perspectives de recherche découlant des principaux résultats obtenus.

2. Matériel & Méthodes

2.1 Matériel

2.1.1 Espèces de termites champignonnistes utilisées

Sur les 11 genres de Macrotermitinae existants (Aanen & Eggleton, 2005), les meules construites par 5 genres ont été utilisées dans le cadre de ce travail. Il s'agit des meules de *Macrotermes*, *Microtermes*, *Ancistrotermes*, *Pseudacantotermes* et de *Odontotermes*. Ces meules présentent des variations au niveau de la dimension et de l'aspect en fonction du genre de Macrotermitinae et incluent les trois principaux types de meules connus (Rouland-Lefèvre, 2000 ; Rouland-Lefèvre & Bignell, 2001). Sur l'ensemble des espèces considérées, 7 proviennent de colonies de laboratoire et 12 ont été collectées en milieu naturel. Le tableau 2 présente la liste des espèces de Macrotermitinae dont les meules ont été utilisées, leur origine géographique ainsi que quelques observations sur les échantillons prélevés.

Tableau 2: Espèces de termites champignonnistes utilisées dans cette thèse

	Termites champignonnistes	Localité	Observations [†]	Matériel prélevé
1	<i>Macrotermes barneyi</i>	-	colonie d'élevage, $n=1$	meule, sol
2	<i>Macrotermes bellicosus</i>	-	colonie d'élevage, $n=1$	meule, sol, ouvriers
3	<i>Macrotermes annandalei</i>	-	colonie d'élevage, $n=1$	meule, sol
4	<i>Microtermes sp.</i>	-	colonie d'élevage, $n=1$	meule, sol
5	<i>Odontotermes hainanensis</i>	-	colonie d'élevage, $n=1$	meule, sol
6	<i>Pseudacantotermes spiniger</i>	-	colonie d'élevage, $n=2$	meule, sol
7	<i>Pseudacantotermes militaris</i>	-	colonie d'élevage, $n=2$	meule, sol
8	<i>Macrotermes subhyalinus</i>	Burkina-Faso	milieu naturel, $n=1$	meule
9	<i>Macrotermes bellicosus</i>	Burkina-Faso	milieu naturel, $n=1$	meule
10	<i>Microtermes sp.</i>	Burkina-Faso	milieu naturel, $n=2$	meule
11	<i>Odontotermes sp1.</i>	Bénin	milieu naturel, $n=3$	meule
12	<i>Odontotermes sp2.</i>	Bénin	milieu naturel, $n=3$	meule
13	<i>Macrotermes bellicosus</i>	Bénin	milieu naturel, $n=3$	meule, ouvriers
14	<i>Microtermes pusillus</i>	Bénin	milieu naturel, $n=3$	meule
15	<i>Macrotermes annandalei</i>	Vietnam	milieu naturel, $n=1$	meule
16	<i>Macrotermes carbonarius</i>	Vietnam	milieu naturel, $n=1$	meule
17	<i>Odontotermes sp.</i>	Vietnam	milieu naturel, $n=1$	meule
18	<i>Macrotermes gilvus</i>	Thaïlande	milieu naturel, $n=2$	meule
19	<i>Odontotermes sp.</i>	Thaïlande	milieu naturel, $n=1$	meule
20	<i>Macrotermes subhyalinus</i>	Cameroun	milieu naturel, $n=1$	meule
21	<i>Odontotermes pauperans</i>	Côte d'Ivoire	milieu naturel, $n=1$	meule
22	<i>Macrotermes bellicosus</i>	Togo	milieu naturel, $n=2$	meule, ouvriers, carpophores
23	<i>Ancistrotermes cavithorax</i>	Togo	milieu naturel, $n=1$	meule
24	<i>Macrotermes subhyalinus</i>	Tchad	milieu naturel, $n=1$	meule

[†] n = nombre de colonies

14 et 12 espèces ont été respectivement utilisées pour évaluer la diversité taxonomique de la mycoflore des meules via des techniques de culture et par biologie moléculaire. 15 espèces de Macrotermitinae ont servi pour l'étude phylogénétique des *Xylaria*, 3 espèces pour l'analyse enzymatique et compte tenu de la plus grande taille des ouvriers de *Macrotermes bellicosus*, seule cette dernière espèce a été collectée pour les tests d'antibiose. Les meules des espèces de termites champignonnistes utilisées ont été collectées lors de plusieurs séries de récolte en Afrique et en Asie. Certains échantillons notamment pour la phylogénie des *Xylaria* nous ont été transmis.

2.1.2 Brève description des localités de prélèvement

- Bénin (forêt classée de la Lama)

La réserve forestière de la Lama se situe dans la dépression de la Lama au Bénin, à environ 80 km de la côte atlantique Nord ($6^{\circ}55.8'$ à $6^{\circ}58.8'N$ et $2^{\circ}4.2'$ à $2^{\circ}10.8'E$; altitude 40-80 m au dessus du niveau de la mer). Les sols de la forêt classée de la Lama sont des vertisols de texture argilosableuse. Le réseau hydrographique est exclusivement composé de mares et de marigots saisonniers. Le climat est de type guinéen, de transition entre le climat guinéen bimodal et le climat soudanien humide unimodal. Les précipitations annuelles sont en moyenne de 1100 mm. La température moyenne annuelle varie entre $25^{\circ}C$ et $29^{\circ}C$. L'humidité atmosphérique reste fort élevée, même en saison sèche (brouillard nocturne).

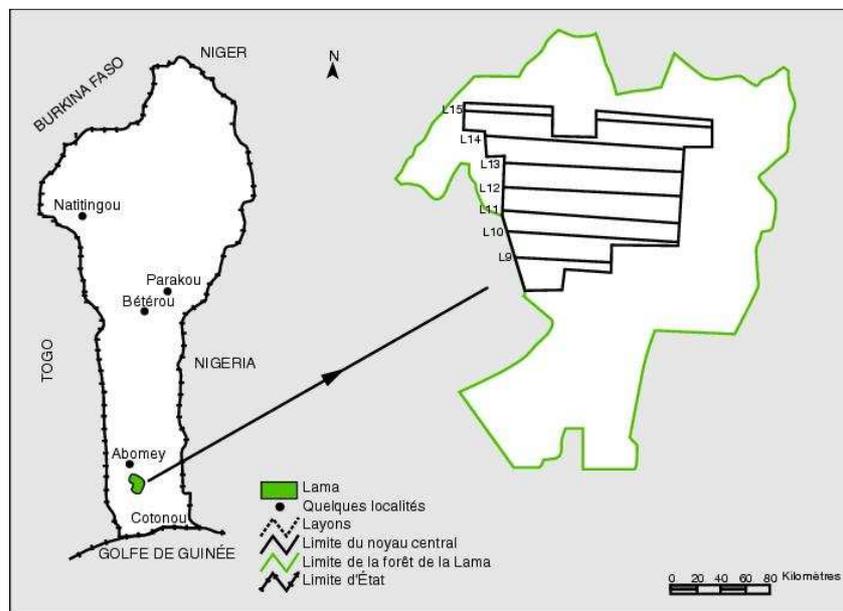


Figure 4: Carte de la forêt classée de la Lama

La réserve couvre une superficie de 160 km^2 dont une partie considérée comme aire protégée – le noyau central – et une autre constituée de plantations forestières de *Senna siamea*, d'*Acacia auriculiformis* et de *Tectona grandis*. Les meules de 4 termites champignonnistes ont été collectées dans le noyau central à savoir *Macrotermes bellicosus*, *Macrotermes pusillus* et deux espèces d'*Odontotermes* (sp1 et sp2).

- Burkina-Faso, Togo, Cameroun, Côte d'Ivoire et Tchad

Au Burkina-Faso, les meules des espèces de *Macrotermes subhyalinus*, *M. bellicosus* et *Macrotermes sp.* ont été collectées dans la région de Banfora (Sud-Burkina). Les meules des espèces de Macrotermitinae provenant du Togo à savoir *Macrotermes bellicosus* et *Ancistrotermes cavithorax* ont été collectées sur le site de l'université nationale de Lomé.

Les meules d'*Odontotermes pauperans* proviennent de la savane de Lamto en Côte d'Ivoire. Des meules de *Macrotermes subhyalinus* ont également été collectées au Tchad (SONASUT – Sarh) et au Cameroun (SOSUCAM – Bandjok).

- Vietnam et Thaïlande

Les meules de *Macrotermes annandalei* et de *Macrotermes carbonarius* ont été collectées à Hanoï tandis qu'une espèce non identifiée de *Odontotermes* provient de la province de Da Lat au Vietnam. Des meules de *Macrotermes gilvus* et de *Odontotermes sp.* ont également été collectées en Thaïlande.

- Colonies de Laboratoire

Plusieurs meules issues de termitières d'élevage ont été incluses dans ce travail. Il s'agit de celles de *Macrotermes bellicosus*, *Macrotermes barneyi*, *Pseudacantotermes spiniger*, *Macrotermes annandalei*, *Microtermes sp.*, *Pseudacantotermes militaris* et *Odontotermes hainanensis* provenant des élevages de l'ex UMR CNRS Communication Chimique (Université de Dijon). Les élevages sont constitués de plusieurs bacs indépendants (espèces différentes) ou reliés entre eux afin de permettre des contacts entre termites issues des mêmes colonies. Des facteurs tels que l'humidité relative et la température de la salle sont contrôlés et optimisés.

2.1.3 Matériel prélevé et techniques de prélèvement

Les meules constituent le matériel biologique principal de cette thèse. Lors de l'échantillonnage, les termitières des Macrotermitinae sélectionnées sont excavées puis les meules sont prélevées et soit placées dans des boîtes stériles pour une mise en culture ultérieure, soit conservées dans de l'éthanol absolu à -20°C. Pour les besoins de l'étude, seules des meules actives ont été collectées, les termites encore présents sur les meules sont donc stérilement et manuellement enlevés. Dans certain cas, du sol environnant à la termitière a également été prélevé. Tous les prélèvements sont issus de 3 répétitions et ont été mixés afin de former des échantillons composites. Pour l'isolement des *Xylaria*, les meules sont maintenues dans des boîtes stériles légèrement humidifiées afin de favoriser l'érection des hampes. Après 2-5 jours d'incubation à température ambiante, les hampes formées sont stérilement prélevées, lavées à plusieurs reprises avec de l'eau distillée puis conservées dans de l'éthanol absolu à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN. Les glandes salivaires ont été obtenues après dissection des termites ouvriers vivants de *M. bellicosus* sous une loupe binoculaire en conditions stériles. Ces dernières sont immédiatement utilisées ou conservées à froid (+4°C) dans du liquide physiologique stérile.

2.2 Méthodes

2.2.1 Isolement des morphotypes fongiques des meules

Afin d'augmenter la probabilité d'isoler un maximum de souches fongiques plusieurs milieux de culture ont été utilisés. Les phylotypes fongiques sont donc isolés sur des milieux SDA (Sabouraud Dextrose Agar), PDA (Potato Dextrose Agar) et OA (Oatmeal Agar) additionnés d'un antibiotique (chloramphénicol 50 mg.l⁻¹), selon la technique des suspensions-dilutions. 5 g de meule sont homogénéisés, puis stérilement suspendus dans 50 ml de solution dispersante (1,2 g de bactopeptone, 6 g de pyrophosphate de sodium, qsp 1 L d'eau distillée) préalablement autoclavée. Après 30 min d'agitation et sans laisser décanter, des dilutions décimales (jusqu'à 10⁻⁵) sont effectuées à partir de cette suspension initiale. 200 µl de chaque dilution sont ensuite ensemencés dans des boîtes de pétri (Ø=9cm) contenant environ 15 ml d'un des 3 milieux de culture (avant solidification). 3 répétitions sont effectuées par dilution et les boîtes de pétri sont scellées, incubées à 30°C puis vérifiées chaque jour. Après 3-10 jours d'incubation (2 semaines sur milieu OA), les souches fongiques sont séparées sur la base des différences morphologiques (taille, pigments, texture, opacité) et repiquées plusieurs fois jusqu'à l'obtention de cultures pures.

2.2.2 Extraction de l'ADN à partir des souches fongiques pures

L'extraction de l'ADN du mycélium des souches pures a été ensuite effectuée selon une méthode d'extraction directe développée au cours de cette thèse. Cette technique d'extraction consiste en une lyse physique et chimique suivies des phases d'extraction au phénol et de précipitation au PEG (Poly Ethylène Glycol). Environ 200 à 250 mg de mycélium récent (d'une culture de 3 jours) sont broyés dans des tubes Eppendorfs de 2 ml contenant 500 µl de tampon CTAB 2% (CTAB, NaCl 5M, EDTA 0,5M, Tris HCl pH 8) et des billes de zirconium. Ensuite, le broyat est agité pendant 2 min à l'aide d'un beadbeater (Retsch® MM 200, Germany) réglé à 50 Hz. Cette étape est suivie d'une incubation à 68°C pendant 30 min. Une nouvelle agitation est effectuée au beadbeater pendant 1 min puis les tubes sont centrifugés à 12000 g pendant 4 min et à 4°C. Un volume de Phénol Chloroforme Isoamyl (25:24:1) est ensuite ajouté au surnageant, puis le tout est homogénéisé lentement pendant 5 min. Le mélange est à nouveau centrifugé (12000 g, 4 min, 4°C) et 600 µl de la phase aqueuse sont placés dans un 'Phase Lock Gel Tube' (préalablement centrifugé à 12000 g pendant 30 s). Un volume de Chloroforme Isoamyl (24 :1) y est ajouté, puis les tubes sont lentement homogénéisés avant d'être centrifugés à nouveau (12000 g, 4 min, 4°C).

500 µl de la phase aqueuse sont ensuite prélevés puis placés dans un Eppendorf de 1,5ml. La précipitation s'effectue avec 2 volumes de Poly Ethylène Glycol (PEG 30%, NaCl 1,6M). Une nouvelle homogénéisation est effectuée, suivie par une centrifugation à 12000 g pendant 30 min et à 4°C. Après récupération de la phase supérieure, le culot contenant l'ADN est lavé dans 500 µl d'éthanol 70°C à froid, puis centrifugé à 12000 g pendant 4 min, à 4°C. Le culot est ensuite séché à température ambiante (pendant 5 min) puis suspendu dans 25 µl de tampon TE 1X.

2.2.3 Extraction de l'ADN génomique total des meules

L'ADN total des meules a été extrait selon la méthode de Porteous et *al.* (1997) légèrement modifiée pour être adaptée à nos échantillons. 0,5 g de meule sont placés dans des tubes Eppendorf de 2 ml contenant 1 ml de solution de lyse stérile (NaCl 0,25M ; EDTA 0,1M, pH 8), 80 µl de Guanidine isothiocyanate 5M, 90 µl de SDS 20% et des billes de zirconium stériles. Les suspensions ainsi obtenues sont homogénéisées 2 fois pendant 2 min à l'aide d'un beadbeater (Retsch® MM 200, Germany) réglé à 25Hz. Cette étape est alternée avec une incubation à 68°C pendant 5 minutes. Les tubes sont ensuite placés à 68°C pendant 1 heure puis refroidis dans un bain d'eau froide. L'ADN est récupéré dans 600 µl de surnageant après centrifugation à 13000 g (12057 rpm) pendant 15 min. 75 µl d'Acétate de potassium 5M et 250 µl de polyéthylène glycol (PEG) 40% sont ajoutés à l'ADN obtenu après la lyse cellulaire.

La précipitation s'effectue à 4°C pendant 1 à 3 heures, suivie d'une centrifugation à 13000 g pendant 15 min. Après la récupération de la phase supérieure, le culot est à nouveau suspendu dans 900 µl de CTAB 2% (1,4M NaCl ; 0,1M EDTA ; 2% CTAB) qui permet de complexer les acides nucléiques. Ensuite, 900 µl de chloroforme sont ajoutés pour la déprotéinisation après incubation pendant 15 min à 68°C. Le mélange est agité doucement puis centrifugé à 13000 g pendant 10 min à température ambiante. La phase aqueuse contenant l'ADN est récupérée dans un tube Eppendorf. L'ADN est concentré par plusieurs phases de précipitation. Une première phase se fait par précipitation dans 600 µl d'isopropanol à -20°C pendant 30 min. Après une centrifugation à 13000 g pendant 15 min à 4°C, le surnageant est éliminé et une deuxième précipitation est effectuée dans 450 µl d'acétate d'ammonium à 2,5M et 1 ml d'éthanol 95°. L'ADN est à nouveau précipité à -20°C pendant 1 à 3 heures, puis le mélange est centrifugé pendant 15 min à 13000 g et 4°C. Le culot est récupéré, lavé dans 1 ml d'éthanol 70° puis centrifugé à 13000 g pendant 5 min. Le culot est séché, puis resuspendu dans 15 µl du tampon TE 1X.

2.2.4 Contrôle et purification de l'ADN extrait

La pureté de l'ADN extrait est vérifiée au spectrophotomètre à 230, 260 et 280 nm à l'aide d'un NanoDrop (ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer), les protéines absorbant à 280 nm, les composés humiques et phénoliques à 230 nm et l'ADN à 260 nm. Ce dernier est purifié lorsque des composés humiques et d'autres contaminants sont également co-extraits. La purification s'effectue à l'aide des kits Spin Column S-400 HR (Amersham). Brièvement, les colonnes de purification sont vortexées afin d'homogénéiser la résine puis centrifugées à deux reprises (3000 rpm, 1 min, 4°C) libérant ainsi le tampon initialement présent dans les colonnes. L'ADN est ensuite déposé au centre et en surface de la résine puis après une nouvelle centrifugation (3000 rpm, 2 min, 4°C), le contenu pur des colonnes est récupéré dans un tube Eppendorf. L'ADN ainsi purifié est quantifié au NanoDrop puis dilué dans de l'eau déionisée stérile à une concentration d'environ 50 ng/μl.

2.2.5 Amplification de l'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR)

L'amplification est effectuée avec de la *Taq Polymérase Ready-To-Go* (Amersham Pharmacia) dans 25 μl du milieu réactionnel contenant 0,25 μM de chaque primer (figure 5) et 50 ng d'ADN matrice. L'amplification est réalisée à l'aide d'un thermocycleur (Eppendorf) et les conditions (températures et nombre de cycles) dépendent des couples d'amorces utilisés (tableaux 3a et 3b). L'amplification est contrôlée en déposant 5 μl de produit PCR dans les puits d'un gel d'agarose à 1,5% suivi d'une migration à 100 V pendant 60 min. Le gel est ensuite coloré 15 min au BET (bromure d'éthidium), rincé dans de l'eau distillée pendant 15 min également puis photographié sous UV.

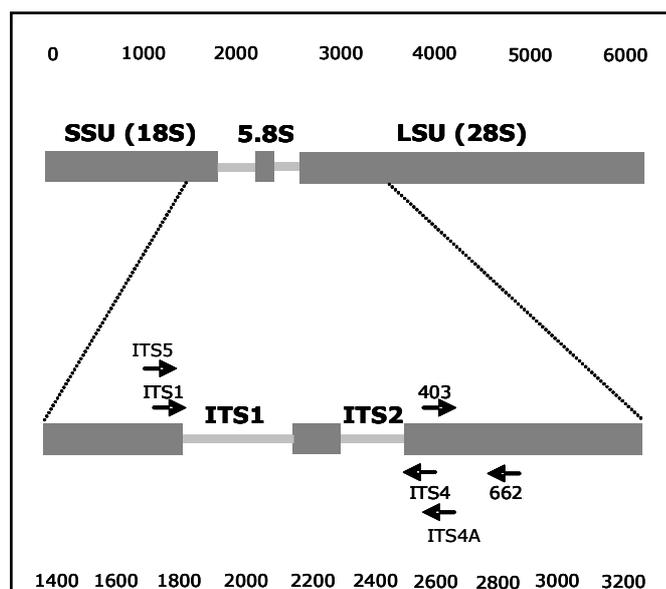


Figure 5: Diagramme montrant la position des sites d'hybridation des amorces ITS1, ITS4, ITS4A, ITS5, 403F et 662R ainsi que la longueur des amplicons générés par les différentes combinaisons des primers.

Tableau 3a: Primers utilisés pour l'amplification des régions 28S et ITS de l'ADNr de la mycoflore des meules

Nom du primer	Direction du primer	Séquence du primer (5' → 3')								Source						
ITS1	sens	TCC	GTA	GGT	GAA	CCT	GCG	G		White et al. (1990)						
ITS4	anti-sens	TCC	TCC	GCT	TAT	TGA	TAT	GC		White et al. (1990)						
ITS5	sens	GGA	AGT	AAA	AGT	CGT	AAC	AAG	G	White et al. (1990)						
ITS4A	anti-sens	GCG	CCG	TTA	CTG	GGG	CAA	TCC	CTG	Larena et al. (1999)						
403	sens	GTG	AAA	TTG	AAA	GGG	AA			Sandhu et al. (1995)						
662*	anti-sens	GAC	TCC	TTG	GTC	CGT	GTT			Sandhu et al. (1995)						
GC Clamp		CCC	CCG	CCG	CGC	GCG	GCG	GGC	GGG	GCG	GGG	GCA	CGG	GCC	G	Vainio & Hantula (2000)

*GC clamp attaché à l'extrémité 5' de la séquence du primer (Sheffield et al., 1989)

Tableau 3b: Conditions d'amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR)

Locus ciblé	Couples de primers	Etapes d'amplification	Température (°C)	Temps (min)	Nombre de cycles
28S rDNA	403/662	Dénaturation initiale	94	5	35
		Dénaturation	94	0,5	
		Hybridation	50	1	
		Elongation	72	2	
		Elongation finale	72	10	
ITS rDNA	ITS5/ITS4A	Dénaturation initiale	94	5	35
		Dénaturation	94	1	
		Hybridation	64	1	
		Elongation	72	3	
		Elongation finale	72	10	
ITS rDNA	ITS1/ITS4	Dénaturation initiale	95	5	30
		Dénaturation	94	1	
		Hybridation	60	1	
		Elongation	72	1	
		Elongation finale	72	10	

2.2.6 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

Après l'amplification, les produits PCR sont séparés sur un gel d'acrylamide 8% (acryl-bisacrylamide gel ; 37,5 :1) contenant un gradient linéaire de dénaturants chimiques (30-70%) constitué par de l'urée et du formamide désionisé (100% de dénaturant correspond à une concentration de 7M d'urée et de 40% de formamide). La migration est réalisée dans une cuve d'électrophorèse Dcode™ Universal Mutation Detection System (BioRad) contenant un tampon TAE (40 mmol l⁻¹ Tris-acétate, 1 mmol l⁻¹ EDTA pH 8) 0,5X. Celle-ci s'effectue d'abord à 20 Volts pendant 10 min puis à 150 Volts pendant 5-6 heures, la température étant réglée à 60°C. Le gel est ensuite maintenu pendant 20 min dans du BET, rincé pendant 15 min dans de l'eau milliQ, puis photographié sous UV à l'aide du Transilluminator (GelDoc 2000, BioRad Inc, Italy). Les profils DGGE sont ensuite analysés grâce au logiciel Quantity One. Les bandes d'intérêt sont sélectionnées, découpées, éluées dans un Eppendorf de 1,5 ml contenant 40 µl d'eau milliQ à 4°C pendant 24 heures. Chaque bande est ensuite réamplifiée selon le même protocole décrit précédemment, puis repassée en DGGE pour vérifier leur pureté. Cette dernière étape est répétée jusqu'à ce que la pureté des isolats soit effective.

2.2.7 Blast et placement taxonomique des séquences

Les ITS fongiques isolés ainsi que les bandes DGGE d'intérêt sont ensuite séquencés afin de déterminer leur position taxonomique. Le séquençage a été effectué par Génome Express (Laboratoire de Grenoble) et les séquences obtenues sont comparées à celles déjà répertoriées dans la banque de gènes du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) à l'aide de l'option 'BLAST search'. Le navigateur taxonomique du serveur NCBI a permis de retrouver l'affiliation des souches fongiques. Les pourcentages de similarité sont ensuite déterminés entre les séquences isolées au cours de cette étude et les séquences les plus proches répertoriées dans GenBank. Ces séquences ne sont considérées comme similaires que lorsqu'elles ont un pourcentage d'homologie au moins égal à 97,5%. L'ensemble des séquences est ensuite aligné à l'aide du programme ClustalW (Thompson et *al.*, 1994) via l'interface de BioEdit (Hall, 1999). L'algorithme de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) a permis de représenter l'affiliation phylogénétique de l'ensemble des séquences à l'aide du logiciel MEGA 4 (Tamura et *al.*, 2007).

2.2.8 Analyse enzymatique

Les activités enzymatiques ont été évaluées par deux méthodes. D'une part, le système API-ZYM a été utilisé et d'autre part les enzymes produites après dégradation de plusieurs sources carbonées ont été dosées par spectrophotométrie.

2.2.8.1 Test API ZYM

Le système API ZYM (Biomérieux, France) contient un ensemble de 20 microcupules dans lesquels en plus d'un contrôle, 19 substrats déshydratés correspondant à 19 enzymes ont été inclus (tableau 4).

Tableau 4: Liste des enzymes et substrats hydrolysés testés à l'aide du système API ZYM

No.	Enzymes	Substrats hydrolysés	pH
I	Contrôle		
II	Alcaline phosphatase	2-Naphtalophosphate	8,5
III	Esterase (C-4)	2-Naphtalobutyrate	6,5
IV	Esterase lipase(C-8)	2-Naphtalocapronate	7,5
V	Lipase (C-14)	2-Naphtalomiristilate	7,5
VI	Leucine arylamidase	L-Leucylo-2-naphtaloamide	7,5
VII	Valine arylamidase	L-Valine-2-naphtaloamide	7,5
VIII	Cystine arylamidase	L-Cystine-2-naphtaloamide	7,5
IX	Trypsine	N-benzyl-DL-arginine-2 naphtaloamide	8,5
X	Chymotrypsine	N-glutarate-phenylalanine 2-naphtaloamide	7,5
XI	Acide phosphatase	2-Naphtalophosphate	5,4
XII	Naphthol-AS-BI phosphohydrolase	Naphthol-AS-BI phosphate	5,4
XIII	α -Galactosidase	6-Br-2-naphtalo- α -D galactopirane	5,4
XIV	β -Galactosidase	2-Naphtalo- β -D- galactopirane	5,4
XV	β -Glucuronidase	Naphthol-AS-BI- β -D- Glucuronide	5,4
XVI	α -Glucosidase	2-Naphtalo- α -D- glucopirane	5,4
XVII	β -Glucosidase	6-Br-2-naphtalo- β - glucopirane	5,4
XVIII	N-acetyl- β - glucosaminidase	1-Naphtalo-N-acetyl- β -D- glucosylamide	5,4
XIX	α -Mannosidase	6-Br-2-naphtalo- α -D mannopirane	5,4
XX	α -Fucosidase	2-Naphtalo- α -L-fucopirane	5,4

Les souches fongiques sont pré-cultivées sur du milieu PDA puis repiquées sur un milieu sporulant Czapeck Dox (30 g Sucrose, 2 g NaNO₃, 1 g K₂HPO₄, 0,5 g MgSO₄ 7H₂O, 0,5 g KCl, 0,01 g FeSO₄, Agar 20 g, qsp 1L). La suspension de spores est obtenue en grattant à l'aide d'une spatule, les spores issues du milieu Czapeck Dox dans une solution de Tween 80 (0,01%). La concentration de cette solution stock est obtenue au spectrophotomètre, ajustée à 5.0 au standard de McFarland puis 65 μ l est introduit dans chaque cupule. Après incubation à 37°C pendant 4 heures, une goutte du réactif ZYM A (Tris-hydroxyméthylaminométhane, hydrochloric acid 37%, sodium lauryl sulphate, H₂O) et une goutte du réactif ZYM B (Fast Blue BB, 2-méthoxyéthanol) ont été ajoutées.

Après 5 min à température ambiante, une coloration est observée en cas de réaction positive. L'intensité de la coloration est ensuite comparée à l'aide d'une grille de couleur fournie par le fabricant. Pour les besoins de l'étude, seule la présence ou l'absence de réactions positives a été enregistrée.

2.2.8.2 Productions enzymatiques

2.2.8.2.1 Préparation des extraits bruts

Le milieu synthétique de Raulin a été utilisé pour la production enzymatique. Des disques de mycélium actif (culture de 3 jours) ont été transférés du milieu PDA dans des erlenmeyers de 250 ml, contenant 50 ml du milieu de Raulin et 0,5% de chaque substrat polysaccharidique (amidon, xylane, cellulose) ou 40 mM des différents acides phénoliques (tannique, ferrulique, syringique et gallique). Les erlenmeyers sont ensuite incubés pendant 15 jours dans un incubateur rotatif (150 rpm, 29°C). Les extraits bruts sont finalement obtenus après filtration du milieu de culture à l'aide d'un papier Whatman suivi d'une centrifugation du filtrat pendant 3 min (13000 g, 4°C). Pour chaque source de carbone, 3 répétitions ont été effectuées ainsi qu'un témoin non inoculé.

2.2.8.2.2 Détermination des activités polysaccharidasiques

Les activités polysaccharidasiques ont été évaluées avec la méthode de Somogyi (1945) et Nelson (1944) modifiée par Williams et *al.* (1978). Le milieu réactionnel est composé de 100 µl de solution enzymatique, 100 µl de substrat et 50 µl du tampon McIlvain à pH 4,4 (McIlvain, 1921). Les conditions de réaction standards sont 20 min à 37°C et la réaction est arrêtée par l'addition de 500 µl du réactif de Somogyi. Les tubes sont ensuite placés dans un bain bouillant pendant 20 min. La quantité de sucres réducteurs libérés durant la réaction a été quantifiée après l'addition de 250 µl du réactif de Nelson et 4 ml d'eau distillée. La densité optique a été mesurée au spectrophotomètre à 650 nm. Toutes les activités sont exprimées en Unit (U) par ml et 1U est défini comme la quantité d'enzymes requise pour libérer 1 µg de sucres réducteurs par minute.

2.2.8.2.3 Dégradation des composés phénoliques

La dégradation des composés aromatiques par certains isolats a été déterminée par colorimétrie en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et selon la technique décrite par Slinkard et *al.* (1977). Brièvement, 1 ml du filtrat de culture a été dilué avec 46 ml d'eau distillée, puis 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu a été ajouté au mélange.

L'ensemble est ensuite homogénéisé vigoureusement. Après 3 min, 3 ml de Na₂CO₃ (2%) sont ajoutés puis le mélange est laissé pendant 2 heures, sous agitations régulières. L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 760 nm contre des contrôles (sans enzymes) et le pourcentage de dégradation a été estimé par $(\Delta_{A760} \text{ Contrôle} - \Delta_{A760} \text{ échantillon}) / (\Delta_{A760} \text{ Contrôle}) \times 100$.

2.2.9 Essais antifongiques

Afin de déterminer les effets inhibiteurs des termites (sécrétions salivaires) et du *Termitomyces* (extrait méthanolique, filtrat de culture et mycélium actif) sur les principaux saprophytes des meules, des tests antifongiques ont été effectués sur milieux gélosés. 2 cultures actives de *Termitomyces* ont été commandées à DSMZ (banque de microorganismes, Allemagne) et utilisées dans nos essais (Figure 6). Il s'agit de DSMZ-1625 (*Termitomyces albuminosus*, syn. *Cartilagineus*) et DSMZ-4276 (*Termitomyces* sp. isolé des meules de *Macrotermes michaelsenii*). La première souche est assimilée à un *Termitomyces* 'spécialiste' tandis que la seconde est plutôt 'généraliste'.



Figure 6 : Culture de *Termitomyces albuminosus* (A) Souche active DSMZ-1625, (B) Culture sur Malt Extract Peptone Broth (MEPB), (C) Mycélium actif sur Malt Extract Peptone Agar.

2.2.9.1 Préparation des suspensions salivaires et digestives

100 glandes salivaires et 80 tubes digestifs obtenus stérilement après dissection des ouvriers de termites *M. bellicosus*, sont broyés dans 1ml d'eau milliQ stérile.

Le mélange est ensuite centrifugé à 12000 rpm pendant 5 min à 4°C puis filtré à l'aide d'un filtre millipore (0,2 µM). Le surnageant résultant constitue les suspensions salivaires et digestives utilisées pour les essais.

2.2.9.2 Extraction au méthanol des carpophores de *Termitomyces*

Les espèces de *Termitomyces* utilisées sont *T. medius*, *T. striatus*, *T. microcarpus* et une non identifiée (*Termitomyces sp.*). Les carpophores sont séchés dans une salle réfrigérée, puis moulus à l'aide d'un ultra-thurax et conservés à température ambiante jusqu'à l'extraction. Celle-ci s'est faite selon la méthode décrite par Masoko et al. (2007). Dans un tube Eppendorf, 1 g de la fine poudre obtenue est mélangé à 10 ml du solvant (méthanol). Après une vigoureuse homogénéisation pendant 5 min à l'aide d'un beadbeater (Retsch® MM 200, Germany) réglé à vitesse maximale, le mélange est centrifugé à 3500 rpm pendant 10 min. Le surnageant est ensuite récupéré dans un tube approprié, puis le processus est répété 3 fois pour permettre une extraction exhaustive. Les extraits sont ensuite combinés et le solvant d'extraction évaporé.

2.2.9.3 Méthode de diffusion sur disque

La méthode utilisée est celle de Bauer et al. (1966). Des disques de papier filtre Whattman (Ø=6mm) sont imprégnés de la suspension de glandes salivaires, de l'extrait méthanolique ou du filtrat de culture du *Termitomyces* puis placés à une extrémité des boîtes de pétri, qui sont ensuite laissées à température ambiante pendant 12 h pour permettre une meilleure diffusion des métabolites autour du disque. Du mycélium actif (culture de 3 jours) est inoculé à l'extrémité opposée. Dans certains cas, le mycélium actif est remplacé par une suspension de spores du même champignon. 100 µl de la suspension de spores est donc directement incorporé dans des boîtes de pétri contenant du milieu PDA (milieu encore tiède). Les boîtes de pétri sont ensuite légèrement remuées afin d'homogénéiser le mélange, puis laissées pour solidification. Le diamètre des zones d'inhibition indiquant l'activité antifongique est mesuré après incubation à 28°C pendant environ 2-3 jours. 3 répétitions sont effectuées par traitement et de la nystatine (2 mg/ml) est utilisée comme témoin positif. Plusieurs combinaisons sont effectuées à savoir MT vs. SA, CT vs. SA et FT vs. SA où MT représente le mycélium actif du *Termitomyces*, SA le mycélium actif des souches saprophytes, CT l'extrait méthanolique du *Termitomyces* et FT le filtrat de culture du *Termitomyces*.

2.2.9.4 Production de composés volatiles

L'inhibition des souches non symbiotiques par des composés volatiles produits par le *Termitomyces* a également été évaluée selon la méthode de Dick & Hutchinson (1966).

Les saprophytes sont cultivés sur milieu PDA (ou SDA) pendant 2-5 jours puis les couvercles des boîtes de pétri sont enlevés et remplacés par des boîtes de pétri inversées et contenant un mycélium actif du *Termitomyces* (pré-cultivé pendant 72 heures). Les témoins sont réalisés dans des conditions similaires, sauf que les boîtes de pétri supérieures n'étaient pas inoculées. Trois répétitions sont effectuées par souche et les boîtes de pétri sont incubées à 28°C pendant toute la durée de l'expérimentation.

2.2.10 Analyse phylogénétique

2.2.10.1 Alignement des séquences nucléotidiques

Pour inférer toute phylogénie à l'instar de celle des *Xylaria* associés aux meules de Macrotermitinae, toutes les séquences doivent être au préalable alignées. Cette étape est primordiale car d'elle dépend en partie (en plus de l'algorithme de construction phylogénétique sélectionné) la topologie de l'arbre obtenu. Les séquences sélectionnées ont été alignées à l'aide du programme ClustalX (Thompson et al., 1997) et les options par défaut. La matrice résultante a été ensuite manuellement vérifiée puis optimisée afin d'obtenir le meilleur alignement. En amont, plusieurs alignements avaient au préalable été obtenus avec d'autres logiciels tels que ClustalW (Thompson et al., 1994) avec aussi bien les options par défaut qu'en modifiant le nombre de gaps. Toutefois, la comparaison de toutes les matrices obtenues avec les différents programmes nous a permis de ne retenir que le meilleur alignement.

2.2.10.2 Méthodes d'analyse et logiciels utilisés

L'alignement sélectionné a été utilisé pour l'obtention de la matrice de similarité et en cas de stricte homologie entre les séquences, seul un exemplaire de chaque homologue est conservé pour la reconstruction phylogénétique (Aïnouche & Bayer, 1999 ; Rouland-Lefèvre et al., 2002). La méthode de reconstruction phylogénétique utilisée est celle de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). L'arbre a été obtenu à l'aide du package PHYLIP (Felsenstein, 1991) avec les options par défaut. Tous les gaps issus de l'alignement ont été traités comme des caractères et les valeurs des bootstraps sont issues de 1000 replicats.

L'algorithme UPMGA utilisé sous PAUP (Swofford, 1993) a également permis une seconde analyse avec le logiciel UniFrac (Lozupone et al., 2005) afin de corréliser l'origine géographique des échantillons à la différenciation génétique observée et par conséquent de déterminer l'impact éventuel de l'environnement sur la phylogénie. Ce logiciel a l'avantage contrairement à la plupart des logiciels de phylogénie connus, de tenir compte à la fois de l'origine et du degré de divergence/similarité entre les séquences.

Ainsi sous UniFrac, un test statistique (P test), une matrice de distance environnementale et une analyse en composante principale ont permis de comparer d'une part les *Xylaria* issus des meules aux endophytes des plantes et d'autre part, les souches isolées des meules de Macrotermitinae entre elles.

2.11 Traitement statistique des données

Des analyses de variance (ANOVA) ont été réalisées avec le logiciel R (version 2.5.1) afin de comparer les différentes données obtenues. Le test Tukey HSD a été utilisé pour toutes les comparaisons multiples au seuil de 5%. Une analyse de similarité a également été réalisée avec le package ADE-4 du même logiciel afin de caractériser les souches fongiques en fonction de leurs aptitudes enzymatiques et d'hierarchiser les différences observées.

2.12 Récapitulatif des principales méthodes utilisées

Le tableau 5 présente l'ensemble des techniques principalement utilisées dans cette thèse. Toutefois, lorsque des mises au point spécifiques ou des tests préliminaires ont été effectués, ces derniers sont présentés dans les résultats.

Tableau 5: Récapitulatif des principales analyses effectuées dans cette thèse

Méthodes	Cf. chapitres
Isolement fongiques sur milieux solides	3.1
Cultures en milieux liquides	3.1
Screening enzymatique	3.1
Dosages par spectrophotométrie	3.1
Extraction d'ADN et amplification par PCR	3.1, 3.2 et 3.3
Electrophorèse en gradient de dénaturants	3.2
Suicide Polymérase Endonuclease Restriction	3.2
Construction phylogénétique	3.2 et 3.3
Essais antifongiques (composés diffusibles et volatiles)	3.4

3. Résultats

CHAPITRE III.1 DIVERSITE TAXINOMIQUE ET FONCTIONNELLE DES COMMUNAUTES FONGIQUES CULTIVABLES DES MEULES

La première étape de ce travail a consisté à isoler et identifier les morphotypes fongiques des meules et du sol environnant aux termitières à l'aide de techniques de cultures afin de déterminer s'il existait une association spécifique de certains taxons.

III.1.1 Diversité fongique des meules

Sur les différents milieux de culture, 32 souches ont pu être isolées et différenciées en fonction de leur morphotype. Les séquences ITS de ces souches ont été obtenues par amplification à l'aide des amorces universelles ITS1 et ITS4 (White et al., 1990). Les produits d'amplification varient approximativement entre 430 et 580 paires de bases avec une moyenne de 520 pb.

32 phylotypes dont 3 non classés ont pu être différenciés dans cette étude sur la base de leurs séquences nucléotidiques (tableau 6). Le blast des séquences obtenues dans nos travaux avec les séquences répertoriées dans GenBank révèle que la majorité des isolats provient du phylum des Ascomycètes (dont 8 n'ont pu être identifiés à l'échelle de l'espèce) et seulement deux Zygomycètes ont été détectés. Parmi ces isolats, 18 et 12 espèces ont été respectivement isolées des meules et du sol environnant des colonies de laboratoire, tandis que 7 espèces fongiques proviennent des meules issues des colonies prélevées en milieu naturel.

Afin de déterminer la présence de souches fongiques spécifiques des meules, deux niveaux de comparaisons ont été effectués : d'une part, les communautés fongiques des meules ont été comparées à celles du sol environnant et d'autre part la mycoflore des meules issues des colonies de laboratoire a été comparée à celle d'échantillons collectés en milieu naturel. Afin de faciliter l'interprétation, les phylotypes significatifs (isolés au moins deux fois dans un unique environnement ou provenant de plusieurs environnements différents) ont été groupés par abondance relative des genres (figure 7). Sur la base des phylotypes isolés, 16 genres ont été identifiés: *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Pichia*, *Porosphaerella*, *Chaetomium*, *Arthrographis*, *Cordyceps*, *Scopulariopsis*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Oidiodendron*, *Umbelopsis* et *Cunninghamella*. Concernant la prévalence des phylotypes significatifs (figure 7), le genre majoritairement isolé des meules d'élevage est *Trichoderma* (30,76%) tandis que l'abondance relative des genres suivants varie entre 11 et 15%: *Fusarium*, *Chaetomium*, *Acremonium* et *Scopulariopsis*. Dans le sol environnant, le genre le plus abondant est aussi *Trichoderma*, cependant retrouvé en quantité beaucoup plus importante (66,67%). Contrairement aux deux premiers cas, dans les meules collectées en milieu naturel, bien que le genre *Trichoderma* ait été également retrouvé, le plus important est *Pichia* (50%) suivi par les phylotypes fongiques appartenant au genre *Aspergillus* (29%).

Tableau 6 : Phylotypes fongiques associés aux meules et au sol environnant de plusieurs espèces de termites champignonnistes

Phylotypes fongiques (No. Accession)	Séquences similaires dans GenBank	Colonies d'élevage														Colonies en milieu naturel						
		Meules							Sol environnant							Meules						
		Mba	Mb	Ma	Oh	Ps	Pm	Mi	Mba	Mb	Ma	Oh	Ps	Pm	Mi	Mb1	Od1	Od2	Mp	Ms	Mi	Mb2
Ascomycota																						
<i>Trichoderma virens</i> EU816386	<i>T. virens</i> EF442081 / 100%	+			+				+					+								
<i>T. aureoviride</i> EU816400	<i>T. aureoviride</i> AF194015 / 100%													+								
<i>T. atroviride</i> EU816385	<i>T. atroviride</i> EF417482 / 100%	+																				
<i>T. harzianum</i> EU816387	<i>Trichoderma harzianum</i> EF596951 / 100%	+		+			+					+	+		+	+						
<i>T. asperellum</i> EU816405	<i>T. asperellum</i> EU021220 / 99%																		+		+	
<i>Hypocrea lutea</i> EU816393	<i>Hypocrea lutea</i> AB027384 / 99%													+								
<i>Aspergillus aculeatus</i> EU816404	<i>Aspergillus aculeatus</i> EU326206 / 99%																		+			
<i>A. niger</i> EU816403	<i>A. niger</i> AB369898 / 98%																				+	
<i>A. flavus</i> EU816407	<i>A. flavus</i> EF409787 / 99%																		+	+	+	
<i>A. sclerotiorum</i> EU816398	<i>A. sclerotiorum</i> AY373866 / 100%				+									+		+						
<i>Penicillium fellutatum</i> EU816399	<i>Penicillium fellutatum</i> AY373914 / 100%																		+			
<i>P. citreonigrum</i> EU816390	<i>P. citreonigrum</i> AY373908 / 99%	+				+																
<i>Paecilomyces sp.</i> EU139245	<i>Paecilomyces sp.</i> DQ682588 / 99%			+		+																
<i>P. variotii</i> EU816406	<i>Paecilomyces variotii</i> AY353332 / 99%																		+	+		
<i>Fusarium sp.</i> EU816384	<i>Fusarium sp.</i> EU256468 / 100	+					+			+												
<i>Pichia guilliermondii</i> EU816401	<i>Pichia guilliermondii</i> DQ088676 / 99																	+	+	+	+	
<i>Porosphaerella cordanophora</i> EU139944	<i>P. cordanophora</i> AF178563 / 99%			+																		
<i>Chaetomium funicola</i> EU139246	<i>Chaetomium funicola</i> AJ279450 / 98%						+	+														
<i>Arthrographis sp.</i> EU139247	<i>Arthrographis cuboidea</i> AB213444 / 90%							+														

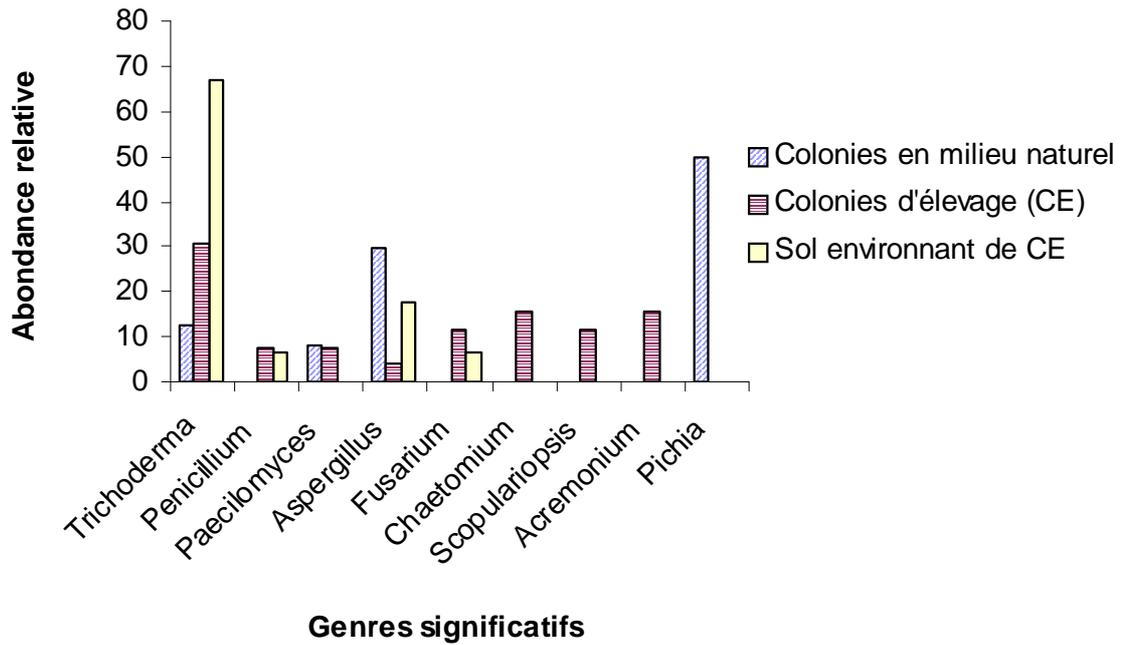


Figure 7: Abondance relative des phylotypes significatifs (groupés par genre) isolés des meules et du sol environnant de plusieurs espèces de Macrotermitinae

Parmi les phylotypes isolés au cours de ces travaux, seuls *Trichoderma* et *Aspergillus* sont communs à tous les environnements. Toutefois, même si *T. harzianum* a été retrouvé aussi bien au niveau des meules que du sol environnant des colonies de laboratoire, c'est *T. asperellum* qui a été isolé des meules collectées en milieu naturel. Dans les colonies de laboratoire, plusieurs souches ne sont retrouvées qu'au niveau des meules. Il s'agit principalement de *Porosphaerella cordanophora*, *Scopulariopsis sp.* et des deux zygomycètes *Umbelopsis isabellina* et *Cunninghamella blakesleena*.

En milieu naturel, les souches isolées sont toutes différentes de celles obtenues sur les meules de colonies d'élevage et présentent une différenciation géographique : *Pichia guillermondii* a été exclusivement isolé des meules collectées au Bénin (Mb1, Od1, Od2 et Mp) tandis que *Paecilomyces variotii* n'a été détecté que dans les meules originaires du Burkina-Faso (Ms, Mi et Mb2)

Discussion

Cette première partie de l'étude des phylotypes cultivables, vise à détecter la présence de communautés fongiques résidentes. Les résultats ont permis de mettre en évidence la présence de champignons filamenteux dans les meules des termites champignonnistes.

16 genres ont été isolés parmi lesquels *Trichoderma*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Scopulariopsis*, *Acremonium* et *Pichia* se sont révélés être les plus abondants. Ainsi la majorité de la mycoflore cultivable des meules appartient au phylum des Ascomycètes incluant plus de 50% des champignons connus (Guarro et al., 1999).

Trichoderma, *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* ont été isolés des meules et du sol environnant, suggérant une absence de spécialisation pour les meules et donc par conséquent aucune relation spécifique avec les termites champignonnistes. Ce résultat est supporté par le blast des phylotypes appartenant aux genres précédents qui montre que les séquences ITS1-5.8S-ITS2 les plus proches dans GenBank proviennent de multiples environnements comme le sol, l'air ou les plantes. De plus, d'après Domsch et al. (1993), les champignons appartenant aux genres *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* sont les plus fréquents dans les sols. Ainsi, ces champignons filamenteux ne résident pas en permanence dans les meules mais sont transportés dans celles-ci sous forme mycélienne ou sous forme de spores via l'alimentation des termites ou en adhérant à leur corps.

L'existence d'un 'gradient d'âge' - la partie supérieure de la meule est plus neuve que la partie inférieure qui est ensuite consommée par les termites (Rouland-Lefèvre, 2000) - entraîne un perpétuel turn-over qui peut également expliquer les différences observées dans la répartition des phylotypes fongiques entre les différentes espèces de termites champignonnistes. Nos résultats sont congruents avec ceux de Das et al. (1962) et de Thomas (1987) qui ont également fait état de la présence de ces 4 genres de champignons dans les meules.

Contrairement à l'espèce *Scopulariopsis chartarum* qui a été trouvée dans des meules construites par des termites appartenant à des genres différents, il est intéressant de noter que les champignons *Chaetomium funicola* et *Acremonium cyanophagus* n'ont été isolés qu'à partir des meules provenant des colonies de laboratoire de termites du genre *Pseudacanthotermes* (*militaris* ou *spiniger*) indiquant ainsi une relation peut-être privilégiée avec ce type de meules. En effet, les meules constuites par les deux espèces de *Pseudacanthotermes* ont la même structure mais sont par contre très différentes de celles des autres genres de Macrotermitinae (Rouland-Lefèvre, 2000). Cependant, la présence de ces champignons dans la meule n'avait jamais été au préalable révélée.

Concernant les genres *Paecilomyces* et *Pichia* dont le premier a été retrouvé dans les deux types de meules (élevage et milieu naturel) et le second présent en abondance dans les meules collectées au Bénin, ces champignons pourraient eux aussi avoir une association particulière avec les meules.

Le genre *Paecilomyces* est ubiquiste et est donc retrouvé dans plusieurs environnements incluant le sol, le compost et le bois (Kluczeck-Turpeinen et al., 2007). Les espèces appartenant à ce genre sont par toutefois connues pour être des parasites d'insectes (Siddiqui & Mahmood, 1996) et ont même déjà été isolées des tubes digestifs de termite (Rajagopal et al., 1979). Enfin, ce genre fait également partie de ceux décrits comme présents dans les meules par Thomas (1987).

Le genre *Pichia* dont l'espèce *P. guilliermondii* a été l'unique phylotype isolé des meules de 4 espèces de Macrotermitinae collectées en milieu naturel au Bénin (12 colonies), suggère une possible sélection de cette souche par les termites, ceci en relation avec les propriétés antifongiques de cette levure. En effet, Petersson & Schnürer (1995) ont montré que la croissance et la sporulation de 17 champignons filamenteux incluant les principaux genres telluriques (*Trichoderma*, *Aspergillus* et *Penicillium*) étaient inhibées par deux levures notamment *P. guilliermondii* et *P. anomala*. Ainsi, les termites ouvriers peuvent favoriser le maintien sur la meule de telles souches qui les aideraient à éliminer les champignons saprophytes du sol. Cette hypothèse implique néanmoins la possibilité pour le termite de collecter spécifiquement certains taxons ou de ne pas les inhiber lorsqu'ils sont potentiellement bénéfiques comme les souches appartenant aux genres *Paecilomyces* et *Pichia*. En fait, avec la découverte de peptides antimicrobiens (termiticine et spinigerine) chez le termite *Pseudacantotermes spiniger* (Lamberty et al., 2001), il est fort probable que ce soit plutôt la seconde action (non inhibition) qui intervienne. En effet, chez les fourmis champignonnistes, Bot et al. (2002) ont révélé la capacité des fourmis hôtes à cibler spécifiquement certains microorganismes en ajustant la concentration des composés inhibiteurs contenus dans leurs glandes métagléales. Ce comportement hygiénique pourrait être observé dans des symbioses similaires.

Lors de la formation des meules, les termites affectent donc les communautés fongiques environnantes. Ces résultats sont comparables à ceux de plusieurs autres études sur les communautés fongiques des structures biogéniques de termites qui mettent en évidence dans lesdites structures, la présence de champignons communément retrouvés dans les sols ou dans l'environnement immédiat (Holt & Lepage, 2000 ; Diouf et al., 2006).

Il importe toutefois de noter le caractère non exhaustif de l'isolement par les techniques culturales. Aucun *Termitomyces* ou *Xylaria* n'a par exemple été obtenu à partir des suspensions-dilutions sur les différents milieux de culture et ce même sur du milieu OA pourtant largement utilisé dans l'étude des *Xylaria* (Bayman et al., 1998 ; Guarro et al., 2006). Ainsi, les milieux de culture bien que non sélectifs peuvent avoir favorisé la croissance de certains champignons. En effet, la plupart des champignons retrouvés en culture sont à croissance très rapide contrairement au champignon symbiotique qui est lui à croissance très lente (Wood & Thomas, 1989).

III.1.2 Dégradation de substrats et production d'enzymes extracellulaires

Cette seconde partie de l'étude des phylotypes fongiques cultivables visait principalement à déterminer le pattern d'utilisation des substrats carbonés par certaines souches fongiques isolées des meules de Macrotermitinae, afin de corréler le profil enzymatique obtenu à leur rôle fonctionnel potentiel. Le dendrogramme de similarité construit à partir de l'utilisation des polysaccharides et des composés phénoliques a distingué deux catégories de champignons colonisant les meules. Le premier groupe révélé par l'analyse de similarité contient la majorité des champignons filamenteux ne pouvant par ailleurs utiliser des substrats aromatiques comme seule source de carbone. En conséquence, ces champignons sont incapables de pénétrer des cellules vivantes et sont probablement des saprophytes latents, présents dans la meule sous forme sporulée et ne proliférant que lorsqu'elles sont abandonnées.

Le second groupe est constitué par des phylotypes à fortes capacités fonctionnelles tels que les espèces des genres *Termitomyces* et *Paecilomyces*. En se basant sur la similarité des activités enzymatiques détectées chez ces deux phylotypes, ces derniers peuvent potentiellement avoir des fonctions similaires dans la meule à travers la dégradation des composés récalcitrants (principalement la lignine) présents dans le matériel végétal utilisé pour la construction des meules. Les champignons du genre *Paecilomyces*, pourraient également affecter la croissance du champignon symbiotique en ayant des besoins similaires pour ces ressources. Ceci peut partiellement expliquer le faible nombre de taxons isolés des meules probablement dû à l'inhibition des souches compétitives.

**Patterns of Substrate Degradation by Some
Microfungi from Fungus-growing Termite Combs
(Isoptera: Termitidae: Macrotermitinae)**

by

Herbert Guedegbe^{1,2}, Pascal Houngnandan², Jocelyne Roman¹
& Corinne Rouland-Lefevre^{1*}

ABSTRACT

To investigate the functional role of microfungi occurring in fungus-growing termite combs, we performed fungal isolation from combs of three fungus-growing termite species and screened the capacity of different isolates to use various substrates including carbohydrates and lignin derivatives. Seven strains were isolated in this study and Blast of ITS sequences revealed that all belonged to the Ascomycete phylum. A great variation in substrate utilization was found among microfungi and dendrogram analysis based on the different enzymes released clearly distinguished two main groups of microfungi. The first contained the majority of the isolates which were mainly characterized by xylanase and amylase productions, whereas cellulase was generally not secreted. This, combined with the inability to utilize complex substrates such as tannic, gallic, ferulic and syringic acids, suggested that species of this group were probably latent saprobes and not specifically involved in fungus-growing termite symbiosis. The second group contained one phylotype belonging to genus *Paecilomyces* which was capable of degrading most of the tested substrates to a higher extent. This latter strain exhibited similar enzymatic activities to the symbiotic cultivars and we therefore discussed the probable implication of *Paecilomyces* spp in material degradation of the combs' lignocellulose.

Keywords: Microfungi, Substrate utilization, Lignin derivatives, Fungus comb

¹Laboratoire d'Ecologie des Sols Tropicaux, Institut de Recherche pour le Développement, 32 avenue Henri Varagnat 93143 Bondy Cedex, France

²Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Faculté des Sciences Agronomiques (FSA), Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 526 Recette Principale Cotonou, Benin.

*Author for correspondence. E-mail: rouland@bondy.ird.fr

INTRODUCTION

Fungus-growing termites (Isoptera, Termitidae, subfamily Macrotermitinae) are higher termites found in natural African and Asian areas, and which have developed an exosymbiosis with a white-rot fungus of the *Termitomyces* genus. This relationship is a true mutual association because termites make within their nest a favorable environment which promotes the growth of the fungus, and in turn, the symbiotic fungus and the substrate where it is able to grow (the so-called fungus comb or fungus garden) serves as food for the termites (Rouland-Lefevre 2000; Rouland-Lefevre *et al.* 2006). Due to their vegetal origin, combs contain high amounts of lignocellulose material, and many studies have revealed that *Termitomyces* fungi are involved in degrading recalcitrant molecules such as lignin and its derivatives (Matoub & Rouland 1995; Mora & Rouland 1994; Rouland *et al.* 1991; Taprab *et al.* 2005).

The available literature on fungus-growing termite symbiosis suggests that termites control the microbiota of the fungus comb and exclude alien strains by secreting antibiotic compounds or by physical activity including weeding (Batra & Batra 1979; Thomas 1987c). However, despite these hygienic behaviors to maintain the comb as a monoculture of the symbiotic fungus, some microfungi are frequently found in the combs (Wood & Thomas 1989). To our knowledge, no attempt has been made to assess the beneficial impact of these microfungi on the symbiosis and thus, their functional role remains unknown.

In order to provide an insight into the fundamental ecological role of a fungal community, members of this community were screened for their ability to use various substrates as a source of fixed carbon (Carroll & Petrini 1986; Konopka *et al.* 1998). Using this approach, it was expected that patterns of substrate utilization by microfungi occurring on Macrotermitinae combs would correlate with their functional role. In addition, most of the past studies on extracellular enzymes released during lignocellulose degradation were principally conducted with white-rot species (De Koker *et al.* 2000; Ferreira-Gregorio *et al.* 2006; Lin *et al.* 2006; Niranjane *et al.* 2007 Pelaez *et al.* 1995) and as a consequence, the enzymatic capacities of other fungi remain largely unknown. Nevertheless, close attention should also be given to microfungi since species of this group are recently reported to efficiently break down

carbohydrate substrates and complex carbon sources (Battestin *et al.* 2007; Kluczek-Turpeinen *et al.* 2007; Liers *et al.* 2006; Lopez *et al.* 2007).

Thus, this study mainly assessed the enzymatic capacities of microfungi isolated from combs of some Macrotermitinae species to provide clues about their functional role in fungus-growing termite symbiosis and to improve our understanding of lignocellulose recycling in nature.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and all were of analytical grade.

Organism

Fungus combs of three fungus-growing termite species (*Macrotermes bellicosus*, *Microtermes sp.* and *Pseudacantotermes spiniger*) were used in this study. These species were selected for two reasons: the different architecture of their associated combs and the availability of data about the extracellular enzymes released by their respective *Termitomyces*.

Fungal isolation, medium and growth conditions

Fungus combs were collected directly from the nest and immediately used for fungal isolation. Isolation was performed by dilution plate technique. Briefly, 10 g of each sample were shaken in 90 ml of a sterile dispersing solution (sodium pyrophosphate 0.6 % w/v; bactopectone 0.12 % w/v). This initial suspension was then serially diluted in a 0.9 % (w/v) NaCl solution and 250 μ l of each dilution were inoculated in five Petri dishes (d = 9 cm). The experiments were done in triplicate. The medium used for the isolation of fungi was Potato Dextrose Agar (PDA) supplemented with Chloramphenicol (50 mg.l⁻¹) to prevent bacterial growth. All plates were incubated at 29°C and the fungi were isolated after 2-7 days of growth.

API ZYM microassay

The enzymatic activities of the pure fungal strains obtained were determined with the API ZYM method. The API ZYM system (Biomérieux, France) contains a set of 20 microtubes in which, besides the control microtube, dehydrated substrates of 19 enzymes are included (Table 1). Cell suspen-

sions were obtained from 48-hour cultures, and after being adjusted to a density of 5.0 McFarland standard units, aliquots of 65 μ l were introduced in all strip cupules. After incubation at 37°C for 4 hours, one drop of ZYM A (Tris-hydroxymethylaminomethane, hydrochloric acid 37%, sodium lauryl sulphate, H₂O) and ZYM B (Fast Blue BB, 2-methoxyethanol) reagents were added to develop a positive color reaction. After 5 min at room temperature, the result was read using the color chart provided by the manufacturer. For the purpose of this study only qualitative results were recorded, e.g. negative (–) and positive (+) reactions without any intensity.

Table 1: List of assayed enzymes and hydrolysed substrates

No.	Enzyme	Hydrolyzed substrate	pH
I	Control		
II	Alkaline phosphatase	2-Naphtalophosphate	8.5
III	Esterase (C-4)	2-Naphtalobutyrate	6.5
IV	Esterase lipase (C-8)	2-Naphtalocapronate	7.5
V	Lipase (C-14)	2-Naphtalomiristilate	7.5
VI	Leucine arylamidase	L-Leucylo-2-naphtaloamide	7.5
VII	Valine arylamidase	L-valine-2-naphtaloamide	7.5
VIII	Cystine arylamidase	L-cystine-2-naphtaloamide	7.5
IX	Trypsin	N-benzylo-DL-arginine-2-naphtaloamide	8.5
X	Chymotrypsin	N-glutarate-phenylalanine-2-naphtaloamide	7.5
XI	Acid phosphatase	2-Naphtalophosphate	5.4
XII	Naphtol-AS-BI phosphohydrolase	Naphtol-AS-BI phosphate	5.4
XIII	α -Galactosidase	6-Br-2-naphtalo- α -D-galactopirane	5.4
XIV	β -Galactosidase	2-Naphtalo- β -D-galactopirane	5.4
XV	β -Glucuronidase	Naphtol-AS-BI- β -D-glucuronide	5.4
XVI	α -Glucosidase	2-Naphtalo- α -D-glucopirane	5.4
XVII	β -Glucosidase	6-Br-2-naphtalo- β -glucopirane	5.4
XVIII	N-acetyl- β -glucosaminidase	1-Naphtalo-N-acetyl- β -D-glucosylamide	5.4
XIX	α -Mannosidase	6-Br-2-naphtalo- α -D-mannopirane	5.4
XX	α -Fucosidase	2-Naphtalo- α -L-fucopirane	5.4

Enzyme production and preparation of crude extracts

Raulin mineral synthetic medium (C₄H₆O₆ 2.66 g; NH₄NO₃ 2.66 g; (NH₄)₂HPO₄ 0.40 g; K₂CO₃ 0.40 g; MgHCO₃ 0.26 g; (NH₄)₂SO₄ 0.16 g; ZnSO₄ 0.04 g; FeSO₄ 0.04 g; distilled water 1 L), supplemented with Chloramphenicol (50 mg.l⁻¹) was used for enzyme production. Agar disks of active fungal mycelium (three days old culture) were transferred from PDA plates to 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of the medium mentioned above and 0.5 % of each polysaccharide substrate (starch, cellulose and xylan) or 40 mM of different phenolic compounds (tannic, ferulic, syringic

and gallic acids) as the only carbon sources. For a comparative analysis with extracellular enzymes released by *Termitomyces* fungi (Ikhouane & Rouland, unpubl., Mora & Rouland 1994), flasks were incubated in similar conditions to those reported in these latter studies, e.g. 29°C, 150 rpm and 14 days. Crude enzyme was finally obtained after filtration of the culture broth through Whatman filter paper and a centrifugation of the resultant filtrate (13000 g, 4°C) for 3 min. The activity of induced enzymes released in the medium was then estimated, as well as the rate of phenolic compound degradation. For each source of carbon, the experiment was done in triplicate and a non-inoculated control was also performed.

Assay of polysaccharidase activities

Polysaccharidase activities were estimated by the Somogyi (1945) and Nelson (1944) procedure modified by Williams *et al.*, (1978). The reaction mixture contained 100 µl of enzyme solution with 100 µl of substrate and 50 µl of McIlvain (1921) buffer (pH 4.4). Standard reaction time was 20 min at 37 °C. All activities were expressed in Units (U), where 1U of enzyme activity is defined as the amount of enzyme required to release 1 µg of reducing sugar per minute.

Degradation of phenolic compounds

Degradation of phenolic compounds by the isolates was determined colorimetrically using Folin-Ciocalteu reagent and according to the Slinkard *et al.* (1977) method. Briefly, 1 ml of culture filtrate was diluted with 46 ml of milliQ water. Then, 1 ml of Folin-Ciocalteu reagent was added and the mixture was homogenized vigorously. After 3 min, 3 ml of Na₂CO₃ (2%) was added and the resultant mixture was allowed to stand for 2 hours with intermittent shaking. The absorbance was measured at 760 nm against a blank in a Spectrophotometer and the percentage of degradation was estimated as follows: $(\Delta_{A760} \text{ of control} - \Delta_{A760} \text{ of sample}) / \Delta_{A760} \text{ of control} \times 100$.

Identification of fungal isolates

For the determination of taxonomic positions of obtained strains, total DNA was extracted. Fungal mycelium (200-250 mg) was crushed in a 2 ml sterile Eppendorf tube containing 500 µl of CTAB lysis buffer (0.5 M EDTA, Tris-HCl pH 8.0, 5 M NaCl and 2 % CTAB) with zirconium added. The

mixture was homogenized by beadbeating (Retsch® MM 200, Germany) for 2 min at maximum speed (50 Hz). This step was followed by incubation at 68°C for 30 min, beadbeating for 1 min at 50 Hz and centrifugation for 4 min at 4°C and 12000 g. The supernatant was transferred to a new sterile 2 ml Eppendorf tube, and then deproteinized with an equal volume of Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1; v/v/v). After centrifugation (4 min, 4°C, 12000 g) and transfer of the supernatant to a Phase Lock Gel tube (Eppendorf), an equal volume of Chloroform Isoamyl (24:1) was added, then the tube was gently homogenized and centrifuged (4 min, 4°C, 12000 g). Next, 500 µl of the supernatant was transferred to a 1.5 ml sterile Eppendorf tube and precipitated with a double volume of Poly Ethylene Glycol (30 % PEG, 1.6 M NaCl). After a 30 min centrifugation at 4°C and 12000 g, the supernatant was discarded and the pellet was rinsed with 70 % cold ethanol. A final centrifugation (4 min, 4°C, 12000 g) ended the DNA extraction, and the recovered pellet was finally vacuum-dried for 5 min and resuspended in 25 µl of TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5). DNA concentration was quantified by using a spectrophotometer (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer).

Primers used for amplification were the universal primers ITS1 and ITS4 (White *et al.* 1990) and amplification was performed in a Thermal Cycler (Eppendorf). PCR cycles were as follows: initial denaturation at 94°C for 5 min, and 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 60 s and elongation at 72°C for 60 s; and a final elongation at 72°C for 10 min. Sequencing reactions were performed by Genome express, Lab. of Grenoble (France).

All obtained sequences were then blasted with the GenBank blast (Altschul *et al.* 1997) for taxonomic identification.

Nucleotide sequence accession numbers

The nucleotide sequences determined in this study have been deposited into the GenBank database under accession numbers EU139244 to EU139250.

Statistical analysis

The experimental data were centered by using three parallel measurements of means \pm SD. Analysis of variance was performed to determine differences among mean values using R software version 2.5.1 (R Development Core

Team 2007). Tukey's honestly significant difference (HSD) test was used for multiple comparisons. A similarity analysis was performed with ADE-4 package of R to show the hierarchy of the differences between samples.

RESULTS

Fungal strain identification

Seven strains isolated from combs of three fungus-growing termites and their closest relatives are given in Table 2. Based on blast of ITS sequences, all of them were inferred to belong to the Ascomycete phylum. Two microfungi, *Porosphaerella cordanophora* and *Paecilomyces sp.*, were isolated from the *Macrotermes bellicosus* comb. Both strains were closely matched to sequences retrieved from GenBank with similarity up to 99%. One phylotype was obtained from the *Microtermes sp.* comb. However, the similarity (86.67%) with its closest relative in GenBank, *Cordyceps memorabilis*, does not allow us to identify this sequence at the species level. From the *Pseudacantotermes spiniger* comb, 4 microfungi were isolated using PDA medium and their closest relatives in the GenBank database were *Acremonium cyanophagus*, *Chaetomium funicola*, *Arthrographis cuboidea* and 1 unidentified ascomycota. Similarity with GenBank sequences for these latter strains ranged between 90.43 and 98.48%.

Table 2: Fungal strains isolated from combs of three fungus-growing termite species with their Accession Nos. in the GenBank database.

Fungus-growing species	Strain	Closest relative / GenBank Accession No.	Similarity (%)	GenBank Accession No.
<i>Macrotermes bellicosus</i>	Pc	<i>Porosphaerella cordanophora</i> / AF1778563	99.78	EU139244
	Pv	<i>Paecilomyces sp.</i> / DQ682588	99.27	EU139245
<i>Microtermes sp.</i>	Cm	<i>Cordyceps memorabilis</i> / AY245632	86.67	EU139248
<i>Pseudacantotermes spiniger</i>	Asp	<i>Acremonium cyanophagus</i> / DQ393594	98.32	EU139249
	Cf	<i>Chaetomium funicola</i> / AJ279450	98.48	EU139246
	Sl	<i>Arthrographis cuboidea</i> / AB213444	90.43	EU139247
	Uf	<i>Ascomycete sp.</i> / AY787735	96.78	EU139250

Table 3: Comparison of hydrolytic enzymes released by some microfungi isolated from fungus combs.

Strain	Enzyme No.†																			
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX
<i>Porosphaerella cordanophora</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Pacilomyces</i> sp.	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cordyceps</i> sp.	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acremonium cyanophagum</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Chaetomium funicola</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Arthrographis</i> sp.	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ascomycete</i> sp.	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Termitomyces</i> of <i>P. spiniger</i> *	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Termitomyces</i> of <i>M. bellicosus</i> *	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) = positive reaction, (-) = negative reaction

†See Table 1

*Enzymatic data for *Termitomyces* species are from Ikhouane & Rouland (unpublished data).

API ZYM assay

Determination of the extracellular enzyme profile of the isolates was performed by using the API ZYM kit system, which can test 19 different enzymes (Table 3). No production of Cystine arylamidase (enzyme VIII), Trypsin (enzyme IX), β -Glucuronidase (enzyme XV) and α -Fucosidase (enzyme XX) was observed in any strain. Contrary to the previous enzymes, the following were detected in all isolates: Alkaline phosphatase (enzyme II), Acid phosphatase (enzyme XI), Naphthol-AS-BI phosphohydrolase (enzyme XII), β -Glucosidase (enzyme XVII) and α -Mannosidase (enzyme XIX). Among all microfungi tested, some enzymes were released by all but a single strain. This is the case of N-acetyl- β -glucosaminidase (enzyme XVIII), Esterase C-4 (enzyme III) and Leucine arylamidase (enzyme VI) which were respectively not secreted by *Porosphaerella cordanophora*, *Chaetomium funicola* and *Ascomycete* sp. The narrowest enzymatic spectrum was detected in *Porosphaerella* (8 enzymes) and the widest in *Cordyceps* (14 enzymes), with an average of 11 extracellular enzymes released. When compared with results from Ikhouane and Rouland (unpublished data), differences in enzymatic profiles between microfungi and *Termitomyces* from a single comb were observed. For example,

Lipase C-14 (enzyme V) and β -Glucuronidase (enzyme XV) were absent in all microfungi from the *Macrotermes bellicosus* fungus comb, whereas these enzymes were detected in the *Termitomyces* of this termite species. Also, all microfungi isolated from the *Pseudacantotermes spiniger* comb exhibited Cystine arylamidase (enzyme VIII) and β -Galactosidase (enzyme XIV) contrary to the symbiotic *Termitomyces*.

Polysaccharidasic activities

Enzymatic activities of microfungi isolated from fungus-growing termite combs were also assessed by using the Somogyi-Nelson method. Figs. 1A, 1B and 1C show the result of polysaccharidasic activities. Only *Arthrographis* and *Ascomycete sp.* exhibited cellulase activities. However, the Tukey's HSD test performed on the means revealed no significant differences between both isolates. The other fungi did not grow on mineral medium with cellulose as the only carbon source. Amylase activities were produced by four fungi and *Arthrographis* had the highest activity value (9.76 U ml^{-1}). For both strains which grew on the cellulose substrate, amylase activity was 3 and 7

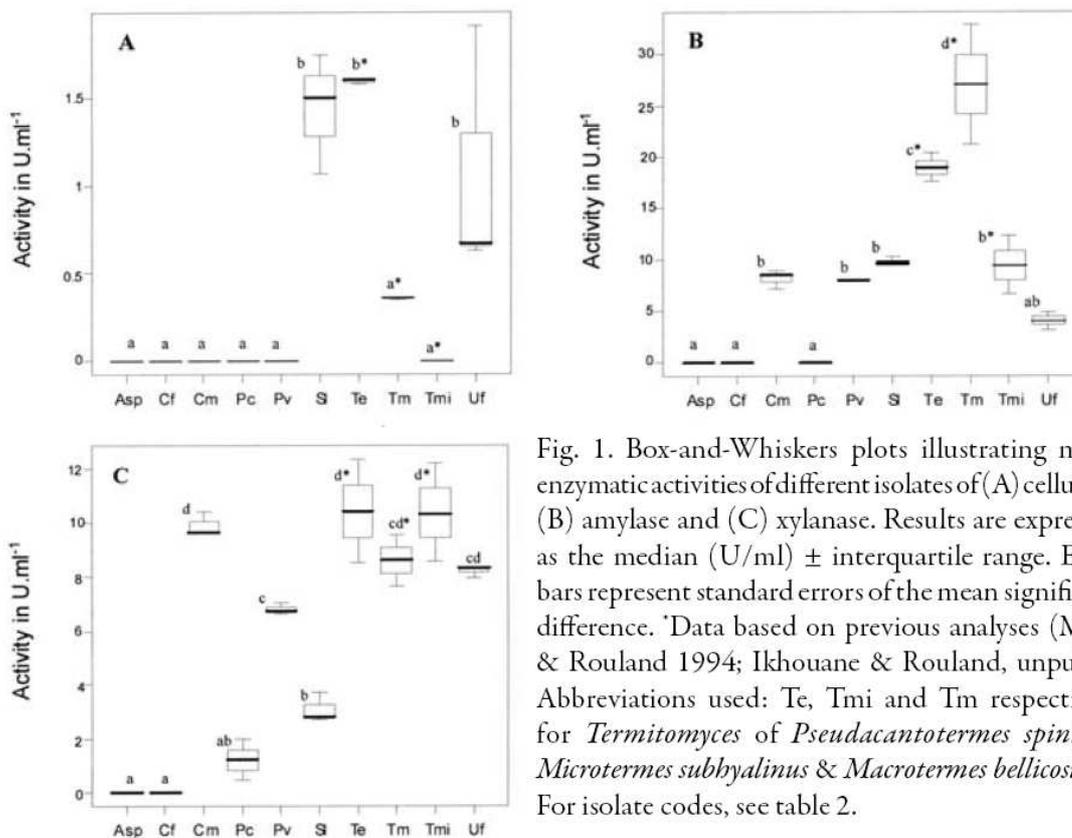


Fig. 1. Box-and-Whiskers plots illustrating mean enzymatic activities of different isolates of (A) cellulase, (B) amylase and (C) xylanase. Results are expressed as the median (U/ml) \pm interquartile range. Error bars represent standard errors of the mean significant difference. *Data based on previous analyses (Mora & Rouland 1994; Ikhouane & Rouland, unpubl.). Abbreviations used: Te, Tmi and Tm respectively for *Termitomyces* of *Pseudacantotermes spiniger*, *Microtermes subhyalinus* & *Macrotermes bellicosus*. For isolate codes, see table 2.

times higher than cellulase activity, respectively. Five strains grew on broth with xylan as the sole carbon source and produced activities which varied from 1.22 to 9.89 U ml⁻¹, with the lowest activities for *Porosphaerella*. This latter strain did not produce cellulase and amylase activities. Quantitative comparison of amylase and xylanase showed that activity of the first enzyme was significantly higher (Tukey HSD, $P < 0.05$) for *Paecilomyces* (1.2-fold) and *Arthrographis* (3-fold), whereas the second was higher for *Cordyceps* (1.2-fold) and *Ascomycete sp.* (2-fold). *Acremonium* and *Chaetomium* did not grow on any substrate with a single carbon source, contrarily to *Arthrographis* and *Ascomycete sp.* which were able to utilize, to a variable extent, all three polysaccharides tested. However, despite visible growth on cellulose, cellulase activity was not recorded for *Paecilomyces*.

Phenolic compound degradation

All isolates were tested for their ability to degrade aromatic complexes (Table 4). Only *Paecilomyces* was able to degrade tannic acid with a relatively high percentage of degradation (85.01%). This latter strain was also the most efficient on gallic, syringic and ferulic acids with degradation rates ranging from 78.62 to 97.45%. *Arthrographis* degraded syringic acid but to a lesser extent than *Paecilomyces* species. Degradation percentages of ferulic acid by *Arthrographis* and *Ascomycete sp.* were lower, at 4.92 and 10.32 percent, respectively. However, these latter values were not statistically different.

Table 4: Degradation of four aromatic compounds by some microfungi from fungus-growing termite combs (means \pm standard deviation).

Strain	Degradation of aromatic acids (%)			
	Tannic	Gallic	Syringic	Ferulic
<i>P. cordanophora</i>	0 a	0 a	0 a	0 a
<i>Paecilomyces sp.</i>	85.01 \pm 1.78 b	94.2 \pm 0.75 c	97.45 \pm 0.37 c	78.62 \pm 2.71 c
<i>Cordyceps sp.</i>	0 a	0 a	0 a	0 a
<i>A. cyanophagus</i>	0 a	0 a	0 a	0 a
<i>C. funicola</i>	0 a	0 a	0 a	0 a
<i>Arthrographis sp.</i>	0 a	0 a	44.56 \pm 0.65 b	4.92 \pm 1.43 b
<i>Ascomycete sp.</i>	0 a	4.38 \pm 2.32 b	0 a	10.32 \pm 4.76 b
<i>T. of M. bellicosus</i> *	25	60	30	30
<i>T. of P. spiniger</i> *	40	60	100	40

Strains with different letters in a particular column are significantly different ($P < 0.05$) using the Tukey HSD test. Blank spaces in the column show tests which were not run.

*Based on unpublished data of Ikhouane & Rouland.

Despite a good growth observed on gallic acid, little degradation of this aromatic substrate was revealed for *Ascomycete sp.* using the Folin-Ciocalteu colorimetric method. The other isolates were not able to degrade any aromatic carbon source tested.

Dendrogram analysis

The abilities of microfungi to grow with carbohydrates or aromatic acids as sole carbon sources were compared to those of *Termitomyces* species using a dendrogram of similarity (Fig. 2). Based on dendrogram analysis, *Paecilomyces* and *Termitomyces* of *Pseudacantotermes spiniger* differed from the other fungi and were clustered together. This is the result of their similar enzymatic profile and their ability to degrade both polysaccharide and phenolic substrates to a higher extent. The second cluster was divided into two sub-clades: the first one contained

Termitomyces of *Macrotermes bellicosus*, which was separated from the other fungi due to its significant xylanase and amylase activities, but compared to *Paecilomyces* and *Termitomyces* of *P. spiniger*, was much less efficient on complex substrates. In the second sub-clade, *Chaetomium*, *Acremonium*, *Porosphaerella*, *Ascomycete sp.* and *Arthrographis* were clustered together. Contrarily to *Ascomycete sp.* and *Arthrographis*, which exhibited some enzyme activity, although to a lesser extent than *Paecilomyces* and *Termitomyces* species, *Chaetomium*, *Acremonium* and *Porosphaerella* were unable to utilize most of the tested substrates as sole carbon sources.

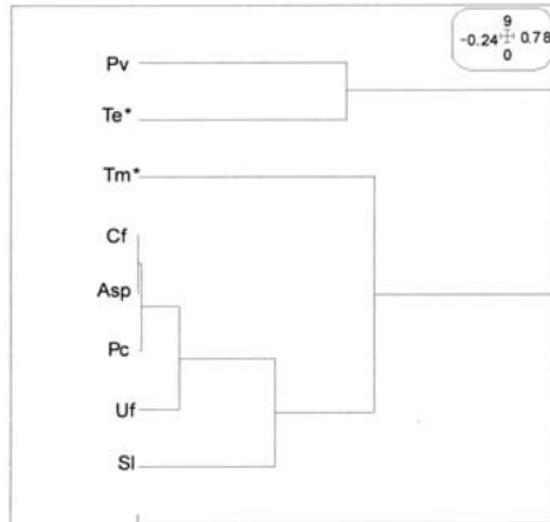


Fig. 2. Dendrogram of similarity based on carbohydrate and complex substrate utilization. From Ikhouane & Rouland (unpublished data). Abbreviations used: Te and Tm for *Termitomyces* of *Pseudacantotermes spiniger* and *Macrotermes bellicosus*, respectively. For isolate codes, see Table 2.

DISCUSSION

This study mainly attempted to determine patterns of substrate utilization by some microfungi from fungus-growing termite combs and to relate the enzymatic profiles observed to their potential functional role. Although

a powerful tool to assess the enzymatic variability of isolates from various origins (e.g. soil, compost, clinical, etc.), and frequently used (Kawecki *et al.* 2006; Khan *et al.* 2002; Tiquia 2002), API ZYM tests do not allow us to discriminate among isolates. Indeed, despite slight differences, most microfungi exhibited the same positive/negative reactions for a given substrate. Patterns of substrate utilization revealed by API ZYM assays between microfungi and *Termitomyces* from a single termite species showed that the symbiotic fungus generally exhibited more enzymes compared to other isolates. However, in most cases, these enzymes were also found at least in one fungus from the same comb, suggesting a potential biochemical partitioning of nutrients due to the complementary nature of the patterns.

Dendrogram analysis of polysaccharide and aromatic substrate degradation distinguished two main groups of microfungi from the combs. The first was represented by species with strong enzymatic abilities such as *Paecilomyces*, and the second by species with moderate to very low activity which were generally incapable of using complex substrates. Based on the similar enzymatic pattern observed between *Termitomyces* and *Paecilomyces*, both strains may have similar functions, e.g. to increase food palatability for the insects by degrading vegetal material (mainly lignin and other recalcitrant constituents). *Paecilomyces* is a widespread genus, found in a various habitats including litter, soil, wood and compost (Kluczeck-Turpeinen *et al.* 2007). In addition, *Paecilomyces* species are insect parasites (Siddiqui & Mahmood 1996) and some were already isolated from termite guts (Rajagopal *et al.* 1979). Our findings are congruent with those of recent studies which showed the capacity of *Paecilomyces spp.* to efficiently breakdown carbohydrate, lignin and lignin-derivative substrates (Battestin *et al.* 2007; Ghosh *et al.* 2006; Kluczeck-Turpeinen *et al.* 2007; Sachan *et al.* 2006). In addition, some authors found that lignin was depleted by *Paecilomyces* species more quickly than other cell wall constituents (Eslyn *et al.* 1975).

Microfungi of the second group revealed by dendrogram analysis were mainly characterized by their incapacity to grow on aromatic substrates. Although certain species were unable to use any tested substrate, microfungi of this group mainly exhibited amylase and xylanase activities, whereas cellulase was generally not detected. Aptitudes to hydrolyze mainly hemicelluloses rather than cellulose seem frequent in microfungi (Dix & Webster 1995).

As a result, they are not capable of penetrating living cells and are probably latent saprophytes. In the case of comb colonization, these fungi will consume readily available nutrients (simple sugars, glucose and amino acids) and thereby affect the growth of *Termitomyces* species which may have similar requirements for these resources. The low number of microfungi isolated may be a consequence of this nutritional feature.

Indeed, it had been suggested that as *Termitomyces* is a slow-growing fungus, termites secrete antibiotic substances which promote the growth of their symbiotic fungi by inhibiting the proliferation on competitive saprophytic strains (Rouland-Lefevre 2000). This hypothesis is accredited by the discovery of antimicrobial peptides from *P. spiniger* (Lamberty *et al.* 2001). Batra & Batra (1979) hypothesized that microfungal regulation in combs is either due to antifungal activity of *Termitomyces* or selective grazing of fungi by termites. However, we do not know whether termites can select for or prevent inhibition of potentially beneficial strains. In a comparable symbiotic association (fungus-growing ant symbiosis), it has been shown that leaf-cutting ants (Attini, Formicidae) were able to adjust the concentration of inhibitory compounds of their metapleural glands, to specifically target a group of microorganisms (Bot *et al.* 2002). If this is widespread in all insect-fungus associations, we may expect to see a similar behavior in fungus-growing termites as well. Hyodo *et al.* (1999), when studying the pattern of lignin degradation on fungus combs, found a decrease of lignin concentration related to fungus comb age and presence or absence of *Termitomyces* nodules. In addition, the amount of lignin in the combs differed among fungus-growing species due to the different materials used to build the combs (Hyodo *et al.* 2003). These findings may influence microfungi distribution and also explain the discrepancy between the number of microfungi isolated from *Macrotermes bellicosus*, *Microtermes sp.* and *Pseudacantotermes spiniger* combs.

Surprisingly, although most microfungi isolated were reported to be common in soils, quantitative comparisons of their enzyme activities with those from previously published sources were unfortunately not possible because very few studies focused on their abilities to degrade plant materials or lignin-model molecules. However, in contrast to this work where no polysaccharidase activity was detected in *Chaetomium*, Katapodis *et al.* (2007) showed the production of xylanase by *Chaetomium thermophilum*.

Our results concerning *Acremonium* were congruent with those of Diouf *et al.* (2006). Indeed, these authors found that *Acremonium strictum* was unable to use all polysaccharides tested, whereas Fan *et al.* (2000) reported the abilities of *Acremonium* species to produce oligosaccharidase.

Four of the seven isolates closely matched known sequences from the GenBank database, whereas three ITS phylotypes were not found at the species level. For these latter sequences, we hypothesize that these fungal species were absent from GenBank because they were not yet isolated. This confirms the fact that termite bio-structures may be an interesting area for fungal studies because new fungal species are continuously discovered on these structures (Diouf *et al.* 2002).

In summary, data presented in this study revealed a great variation in substrate utilization among microfungi occurring on fungus-growing termite combs. Although most of them are probably latent saprophytes, we showed their potential to produce several enzymes involved in plant residue degradation. Moreover, some microfungi, especially those with interesting enzymatic capacities, may constitute a new source of lignocellulose-degrading enzymes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the French Institute of Research for Development (IRD), which supported this work.

REFERENCES

- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D.J. Lipman 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Batra, L.R. & S.W.T. Batra 1979. Termite-fungus mutualism. *In: Insect-fungus symbiosis nutrition, mutualism and commensalism.* (Batra, L.R., Ed). Montclair, New Jersey: Allanheld, Osmun and Co. pp. 117-163.
- Battestin, V. & G.A. Macedo 2007. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. *Bioresource Technology* 98: 1832-1837.
- Bot, A.N.M., D. Ortius-Lechner, K. Finster, R. Maille & J.J. Boomsma 2002. Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants. *Insectes Soc.* 49: 363-370.
- Carroll, G. & O. Petrini 1986. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. *Mycologia* 75(1):53-63.

- De Koker, T.H., J. Zhao, S.F. Allsop & B.J.H. Janse 2000. Isolation and enzymic characterisation of South African white-rot fungi. *Mycol. Res.* 104 (7): 820-824.
- Diouf, M., A. Brauman, P. Mora, E. Miambi & C. Rouland-Lefevre 2006. Modification of soil fungal communities in crop sheetings of fungus-growing termites and its effects on soil functioning. *Sociobiology* 47(2): 353-371.
- Diouf, M., A. Brauman & C. Rouland-Lefèvre 2002. Modifications des communautés fongiques du sol sous l'action de plusieurs espèces de termites Macrotermitinae. *Act Coll UIEIS* 15: 63-67.
- Dix, N.J. & J. Webster 1995. *Fungal ecology*. Chapman and Hall, Cambridge, Great Britain
- Elsyn, W.B., T.K. Kirk & F.J. Efland 1975. Change in the chemical composition of wood caused by six soft-rot fungi. *Phytopathologia* 65: 473-476.
- Fan, Z., G.B. Oguntimein & P.J. Reilly 2000. Characterization of kinetics and thermostability of *Acremonium strictum* glucooligosaccharide oxidase. *Biotechnol. Bioeng.* 68: 231-237.
- Ferreira Gregorio, A.P., I.R. Da Silva, M.R. Sedarati, & J.N. Hedger 2006. Changes in production of lignin degrading enzymes during interactions between mycelia of the tropical decomposer basidiomycetes *Marasmiellus troyanus* and *Marasmius pallescens*. *Mycological research* 110: 161-168.
- Ghosh, S., A. Sachan & A. Mitra 2006. Formation of vanillic acid from ferulic acid by *Paecilomyces variotii* MTCC 6581. *Curr. Sci.* 90: 825-829.
- Hyodo, F., J-I. Azuma & T. Abe 1999. A new pattern of lignin degradation in the fungus comb of *Macrotermes carbonarius* (Isoptera, termitidae *Macrotermitinae*). *Sociobiology* 34(3): 591-596.
- Hyodo, F., I. Tayasu, T. Inoue, J-Y Azuma, T. Kudo & T. Abe 2003. Role of symbiotic fungi in lignin degradation and food provision for fungus-growing termites (*Macrotermitinae*: *Isoptera*). *Functional Ecology* 17: 186-193.
- Katapodis, P., V. Christakopoulou, D. Kekos & P. Christakopoulos 2007. Optimization of xylanase production by *Chaetomium thermophilum* in wheat straw using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 35:136-141.
- Kawecki, D., E. Swoboda-Kopec, M. Dabkowska, E. Stelmach, M. Wroblewska, Krawczyk, S. Blachnio & M. Luczak 2006. Enzymatic variability of *Candida krusei* isolates in a course of fungal infection in a liver transplant recipient. *Transplantation Proceedings* 38, 250-252.
- Khan, Z.U., T.D. Chugh, R. Chandy, F. Provost & P. Boiron 1998. A study of the enzymatic profile of soil isolates of *Nocardia asteroides*. *Mycopathologia* 143(3):151-154.
- Kluczek-Turpeinen, B., P. Majjala, M. Hofrichter & A. Hatakka A 2007. Degradation and enzymatic activities of three *Paecilomyces inflatus* strains grown on diverse lignocellulosic substrates. *International Biodeterioration and Biodegradation* 59(4): 283-291.
- Konopka, A., L. Olivier & R.F.J. Turco 1998. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microbial Ecology* 35: 103-115.

- Lamberty, M., D. Zachary, R. Lanot, C. Bordereau, A. Robert, J.A. Hoffmann & P. Bulet 2001. Solution structures of the antifungal heliomycin and a selected variant with both antibacterial and antifungal activities. *Biochemistry* 40: 11995–12003.
- Liers, C, R. Ullrich, K.T. Steffen, A. Hatakka & M. Holfrichter 2006. Mineralization of ¹⁴C-labelled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*. *Appl. Microbiol. Biotechnology* 69: 573-579.
- Lin, E-S., C.-C. Wang & S.-C. Sung 2006. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 98-102.
- Lopez, M.J., M.C. Vargas-Garcia, F. Suarez-Estrella, N.N. Nichols, B.S. Dien & J. Moreno 2007. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: application for a lignocellulosic substrate treatment. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 794-800.
- Mac Ilvain, T.C. 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* 49: 183-188.
- Matoub, M. & C. Rouland 1995. Purification and properties of the xylanases from the termite *Macrotermes bellicosus* and its symbiotic fungus *Termitomyces* sp. *Comparative Biochemistry and Physiology* 112 B (4): 629-635.
- Mora, P. & C. Rouland 1994. Comparison of hydrolytic enzymes produced during growth on carbohydrate substrates by *Termitomyces* associates of *Pseudacanthohermes spiniger* and *Microtermes subhyalinus* (Isoptera: Termitidae). *Sociobiology* 26(1): 39-53.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153: 375-380.
- Niranjane, A.P., P. Madhou & T.W. Stevenson 2007. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantean*. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 1464-1468.
- Pelaez, F., M.J. Martinez & A.T. Martinez 1995. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycological research* 99: 37-42.
- R Development Core Team 2007. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Rajagopal, S., D.R. Rao & A.K. Varma 1979 Association of fungi in the termite gut. *Curr. Sci.* 48: 998-999.
- Rouland, C., F. Lenoir & M. Lepage 1991. The role of the symbiotic fungus in the digestive metabolism of several species of fungus-growing termites. *Comp. Biochem. Physiol.* 99(4): 657-663.
- Rouland-Lefèvre, C. 2000. Symbiosis with fungi. *In: Termites: Evolution, Sociability, Symbiosis and Ecology* (T. Abe, D.E. Bignell & M. Higashi, Eds), Kluwer Acad. Publ. pp. 289-306.
- Rouland-Lefèvre, C., T. Inoue & T. Johjima 2006. *Termitomyces*/Termite interactions. *In: Intestinal Microorganisms of Soil Invertebrates* (Konig, H. & A. Varma, Eds.). Springer-Verlag. pp. 335-350.

- Sachan, A., S. Ghosh & A. Mitra 2006. Biotransformation of p-coumaric acid by *Paecilomyces variotii*. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 35-41.
- Siddiqui, Z.A. & I. Mahmood 1996. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: a review. *Bioresource Technol.* 58: 229-239.
- Slinkard, K & V.L. Singleton 1977. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28: 49-55.
- Somogyi, M. 1945. Determination of blood sugar. *J. Biol. Chem.* 160: 61-68.
- Taprab, Y., T. Johjima, Y. Maeda, S. Moriya, S. Trakulnaleamsai, N. Noparatnaraporn, M. Okhuma & T. Kudo 2005. Symbiotic fungi produce laccases potentially involved in phenol degradation in fungus combs of fungus-growing termites in Thailand. *Applied and Environmental Microbiology* 71(12): 7696-7704.
- Thomas, R.J. 1987. Factors affecting the distribution and activity of fungi in the nests of *Macrotermitinae* (Isoptera). *Soil Biol. Biochem.* 19 (3): 343-349.
- Tiquia, S.M. 2002. Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting. *Journal of Applied Microbiology* 92(4):764-775.
- White, T.J., T. Burns, S. Lee & J. Taylor 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR protocols* (Innes, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White, eds.), Academic Press, San Diego, Calif. pp. 315-322.
- Williams, J.H., Villaroya and M. Petek 1978. The β -galactosidase II, III and IV from seeds of *Trifolium repens*. *Biochem. J.* 175: 1069-1077.
- Wood, T.G. & J. Thomas 1989. The mutualistic association between *Macrotermitinae* and *Termitomyces*. *In: Wilding, N., N.M. Collins, P.M. Hammond & J.F. Webber (eds.) Insect-fungus Interaction*, Academic Press, London, pp. 69-92



CHAPITRE III.2 ANALYSE MOLECULAIRE DES COMMUNAUTES FONGIQUES DES MEULES

Dans le premier chapitre, seule la mycoflore cultivable a été étudiée. Les techniques conventionnelles de cultures utilisées ne nous ont, par ailleurs, pas permis d'isoler le *Termitomyces*, champignon dont le mycélium est pourtant majeur dans la meule de même que les *Xylaria* spp décrits dans la littérature comme étant associés aux meules abandonnées par les termites. C'est pourquoi, dans la deuxième partie de ce travail, une approche moléculaire d'isolement des souches fongiques de la meule a été envisagée.

III.2.1 Diversité génétique des meules révélée par PCR-DGGE

Les amorces 403-f/662-r ciblant le 28S fongique ont servi à amplifier directement l'ADN total des meules de 7 espèces de termites champignonnistes suivie d'une électrophorèse en gradient de dénaturant (DGGE). Le patron électrophorétique (figure 8) montre des différences en fonction de l'espèce de Macrotermitinae considérée, avec un nombre de bandes dominantes allant de 1 pour *Odontotermes hainanensis* à 7 pour *Microtermes* sp.

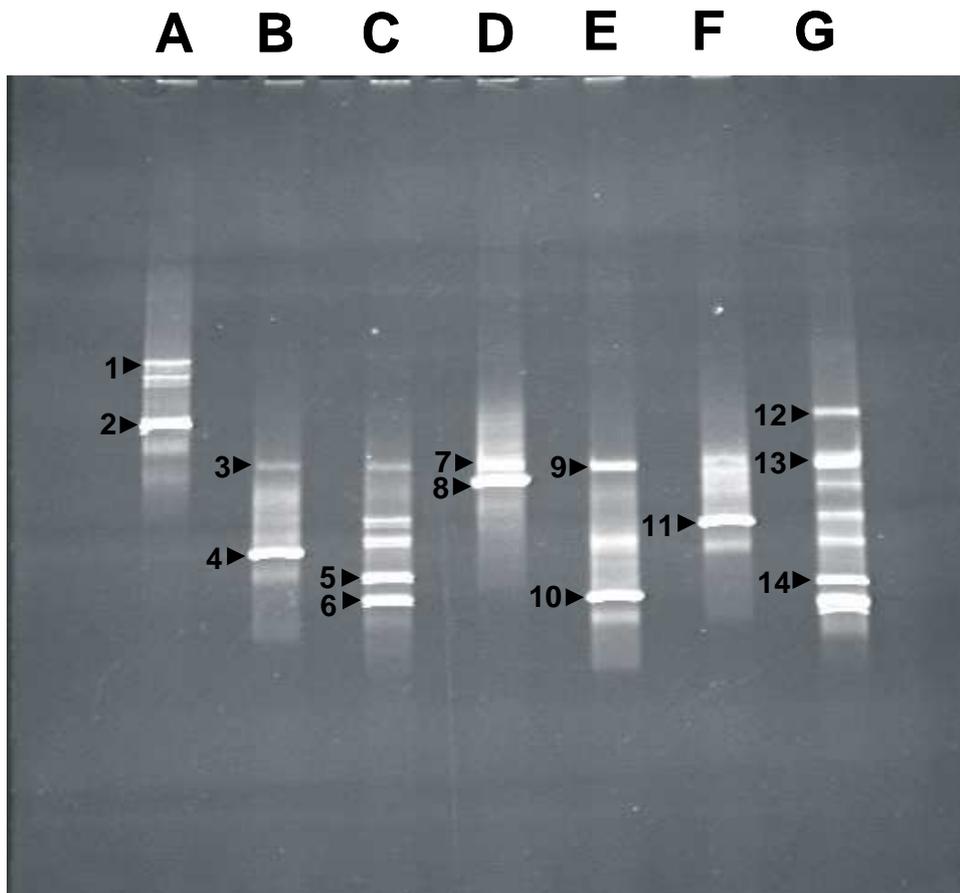


Figure 8: Analyse de la diversité fongique des meules de Macrotermitinae par PCR DGGE

Bandes d'intérêt excisées: 1-14. **A** *Macrotermes annandalei*, **B** *Macrotermes barneyi*, **C** *Pseudacantotermes spiniger*, **D** *Pseudacantotermes militaris*, **E** *Macrotermes bellicosus*, **F** *Odontotermes hainanensis*, **G** *Microtermes* sp.

14 bandes majeures ont été sélectionnées (avec au moins deux bandes/échantillon sauf pour *O. hainanensis* où la seule bande visible a été excisée) et séquencées pour la détermination de la position taxinomique des phylotypes (tableau 7). Les phylotypes fongiques ont été groupés par unités taxinomiques (critère de 97,5% de similarité). Le blast des séquences obtenues indiquent que tous les phylotypes appartiennent au genre *Termitomyces*.

Tableau 7: Identification taxinomique des bandes DGGE d'intérêt excisées

labels des bandes DGGE	Séquence la plus proche dans GenBank (Numéro d'accession)	OTUs [†]	N° d'accession dans GenBank
1, 2 et 11	<i>Termitomyces sp. group5</i> 99% (AB073542)	OTU1	EU816408
3 et 4	<i>Termitomyces sp. group1</i> 99% (AB073516)	OTU2	EU816409
5, 6, 7 et 8	<i>Termitomyces sp. group3</i> 97% (AB073538)	OTU5	EU816412
9 et 10	<i>Termitomyces sp.</i> 96% (DQ110875)	OTU3	EU816410
12, 13 et 14	<i>Termitomyces sp. group2</i> 96% (AB073504)	OTU4	EU816411

[†]OTU: Operational Taxonomic Unit à partir de 97,5% de similarité

Les bandes DGGE provenant d'une même espèce de termite sont hautement similaires (% généralement égal à 100%). Les phylotypes de *Termitomyces* provenant des meules de *Macrotermes barneyi*, *Macrotermes bellicosus* et de *Microtermes sp.* ont été groupés dans 3 différents OTUs, tandis que d'une part ceux de *Pseudacantotermes spiniger* et *Pseudacantotermes militaris* ont été regroupés dans le même OTU et d'autre part les *Termitomyces* d'*Odontotermes hainanensis* et de *Macrotermes annandalei* présentent plus de 97,5% de similarité.

Discussion

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons utilisé une approche moléculaire (la DGGE) afin d'évaluer la diversité fongique des meules provenant de 9 différentes espèces de termites champignonnistes correspondant à 4 genres. Les communautés fongiques des meules révélées par la DGGE appartiennent toutes au genre *Termitomyces* contrairement à celles issues des techniques de cultures (cf. chapitre 3.1). Ainsi, la diversité taxinomique issue de l'analyse moléculaire est plus faible que celle obtenue à partir des cultures contrairement à d'autres travaux ayant utilisé une approche similaire (Broderick et al., 2003).

Cependant, de façon comparable, Brightwell et al. (2006) ont montré qu'à l'exception d'un phylotype détecté aussi bien en culture que par T-RFLP, les genres majoritairement retrouvés après culture des échantillons n'étaient pas décelés en biologie moléculaire et inversement.

Les multiples bandes observées en DGGE pour un même organisme pouvaient être dus à un biais méthodologique. Afin de le vérifier, le temps d'extension de la PCR a été modifié comme préconisé par Janse et al. (2004). Toutefois, le résultat est resté inchangé, excluant donc un biais méthodologique et suggérant plutôt la présence d'une microhétérogénéité de séquence (Cilia et al., 1996 ; Nübel et al., 1996 ; Vanio & Hantula, 2000). Ceci confirme le fait qu'une bande DGGE peut ne pas correspondre à un taxon unique (Sekiguchi et al., 2001 ; Gafan & Spratt, 2005 ; Michaelsen et al., 2006). Aussi, le fait que plusieurs *Termitomyces* provenant de genres de termites différents aient été regroupés dans la même unité taxinomique confirme que dans la symbiose des Macrotermitinae, des *Termitomyces* peuvent être associés à plusieurs genres de termites différents (Kato et al., 2002 ; Rouland-Lefèvre et al., 2002, Aanen et al., 2002).

Tout comme pour les conditions de culture ou la méthode d'extraction d'ADN utilisée, le choix des amorces semble crucial et déterminant car ces derniers peuvent biaiser les fréquences des phylotypes obtenus via l'amplification sélective de certains taxons (Reysenbach et al., 1992 ; Ercolini et al., 2001, Brightwell et al., 2006). Dans le cas de la mycoflore des meules de Macrotermitinae, le fait que seul le champignon symbiotique soit visible dans la meule active laisse croire que l'ADN de ce dernier est largement majoritaire et par conséquent préférentiellement amplifié par PCR et uniquement détecté en biologie moléculaire. Ceci est en accord avec des analyses antérieures qui ont montré que la DGGE ne permettait de détecter que les souches fongiques représentant au moins 1% de l'ADN total (Muyzer et al., 1993 ; Stephen et al., 1999). Dent et al. (2004) en testant l'utilité de la nested PCR-DGGE pour l'étude des communautés microbiennes associées aux graines de *Beta vulgaris* subsp. *Vulgaris*, ont montré que pour être détecté l'ADN fongique devait correspondre à au moins 10% de l'ADN total. Une quantité d'ADN inférieure ne permettait pas l'amplification fongique mais plutôt celle de l'ADN végétal résiduel (*B. vulgaris*).

En ce qui concerne nos échantillons, ce résultat montre clairement que les phylotypes isolés en culture (chapitre précédent) sont certainement très minoritaires dans la meule. Ainsi dans le cas d'un échantillon contenant des espèces quantitativement très disparates (certaines très abondantes avec d'autres minoritaires), la DGGE ne possède pas une résolution suffisante pour fournir une image réelle de l'ensemble des communautés fongiques.

Ceci pourrait aussi expliquer la non détection des *Xylaria* car, même s'ils ne prolifèrent réellement (formation visible de hampes) que lorsque les meules sont abandonnées, ils résideraient néanmoins sous forme mycélienne dans les meules entretenues par les termites (Grassé, 1937) et devraient donc être détectables en biologie moléculaire.

Comme la plupart des autres méthodes dites de 'fingerprinting moléculaire', la DGGE a montré ses limites dans l'étude de la diversité fongique d'échantillons complexes comme les meules de Macrotermitinae, car le résultat est biaisé par l'ADN majoritaire du *Termitomyces*. Le principal problème en écologie microbienne moléculaire reste donc l'incapacité des techniques moléculaires à détecter des taxons minoritaires ou faiblement représentés dans des échantillons environnementaux à ADN majoritaire (Holben et *al.*, 2004 ; Green & Minz, 2005). C'est pourquoi, dans la deuxième partie de ce chapitre, nous avons adapté aux champignons pour la première fois une technique moléculaire récente mise en place chez les bactéries, la 'Suicide Polymerase Endonuclease Restriction (SuPER)', afin d'avoir une idée plus précise de la mycoflore des meules de termites champignonnistes.

Spécifiquement, il s'agira de réaliser en amont les étapes préliminaires suivantes afin de s'assurer des possibilités d'adaptation de la méthode SuPER à l'étude de la mycoflore des meules.

- Détermination et validation d'une amorce spécifique à l'ADN majoritaire c'est-à-dire celui du *Termitomyces*

En se basant sur l'ensemble des *Termitomyces* déjà répertoriés dans GenBank une portion de 20 pb a été choisie comme oligonucléotide sens. L'amorce ITS1FT réalisée par Eurogentec SA (Liège, Belgique) a les caractéristiques suivantes :

Séquence : (5' GTT-TTC-AAC-CAC-CTG-TGC-AC-3') %GC : 50 ; Tm (2AT + 4GC) 60°C ; Tm (%GC) 49,71°C ; MM : 6028,00 g mol⁻¹ ; Coefficient d'extinction 180000,0 l/(mol cm)
Le primers antisens utilisé est ITS4 (White et al., 1990).

La spécificité du couple d'amorces ITS1FT/ITS4 a été vérifiée par des tests d'amplification (Figure 10). Après extraction des ITS fongiques cultivables de différents groupes de champignons (ascomycètes, zygomycètes et basidiomycètes) selon le protocole d'extraction précédemment décrit (voir Matériel & Méthodes) puis amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR) avec le couple d'amorces ITS1FT/ITS4, **seuls les *Termitomyces* ont été amplifiés, illustrant bien la spécificité des primers.**

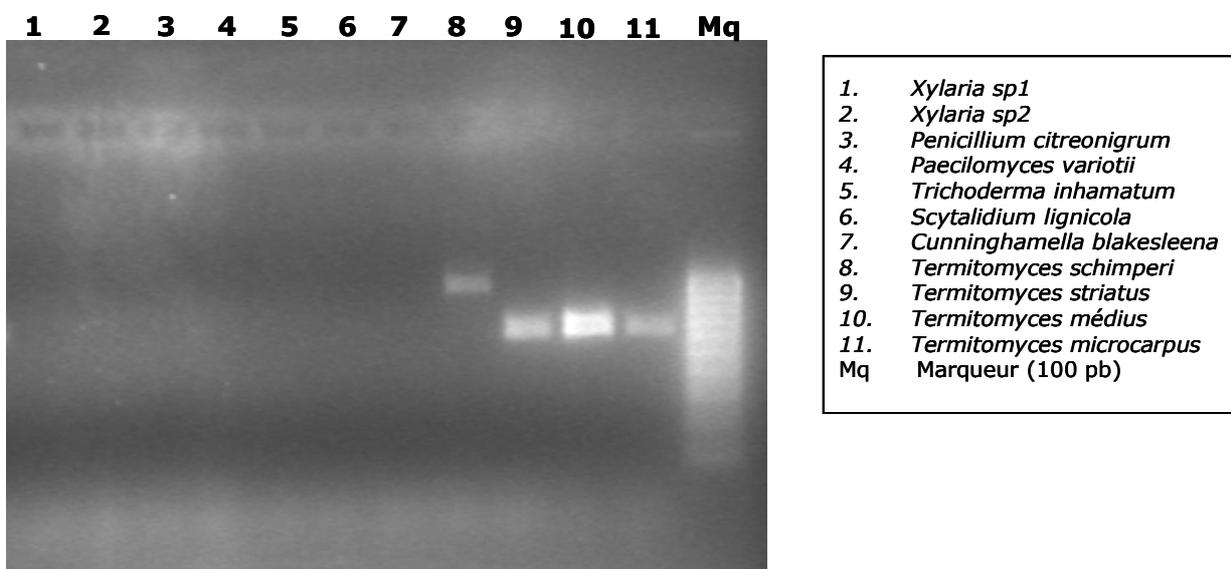


Figure 10: Gel d'agarose 2% illustrant l'amplification sélective des *Termitomyces* par le couple d'amorce ITS1FT et ITS4 (aucune autre espèce de champignon n'a été amplifiée)

- Vérification de l'efficacité de l'enzyme de restriction sur l'ADN du *Termitomyces*

L'endonucléase utilisée est la Tsp509I (New England BioLabs Inc.) qui est une enzyme thermostable pouvant donc opérer à haute température.

La présence des sites de restriction sur l'ADN du *Termitomyces* a été vérifiée par ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis). Brièvement, l'ADN du *Termitomyces* est extrait puis amplifié à l'aide des amorces spécifiques (ITS1FT/ITS4) ; ensuite sont ajoutés dans l'ordre pour un volume réactionnel de 30µl :

- 15µl d'eau milliQ
- 10µl de produit PCR (environ 1µg d'ADN),
- 3µl de tampon (concentration finale 1X)
- 2µl d'endonucléase Tsp509I.

L'ensemble est homogénéisé puis incubé à 65°C pendant 2h suivi d'une migration sur gel d'agarose 2%. Le résultat de l'ARDRA montre **l'efficacité de la digestion du *Termitomyces* par l'endonucléase Tsp509I** (Figure 11).

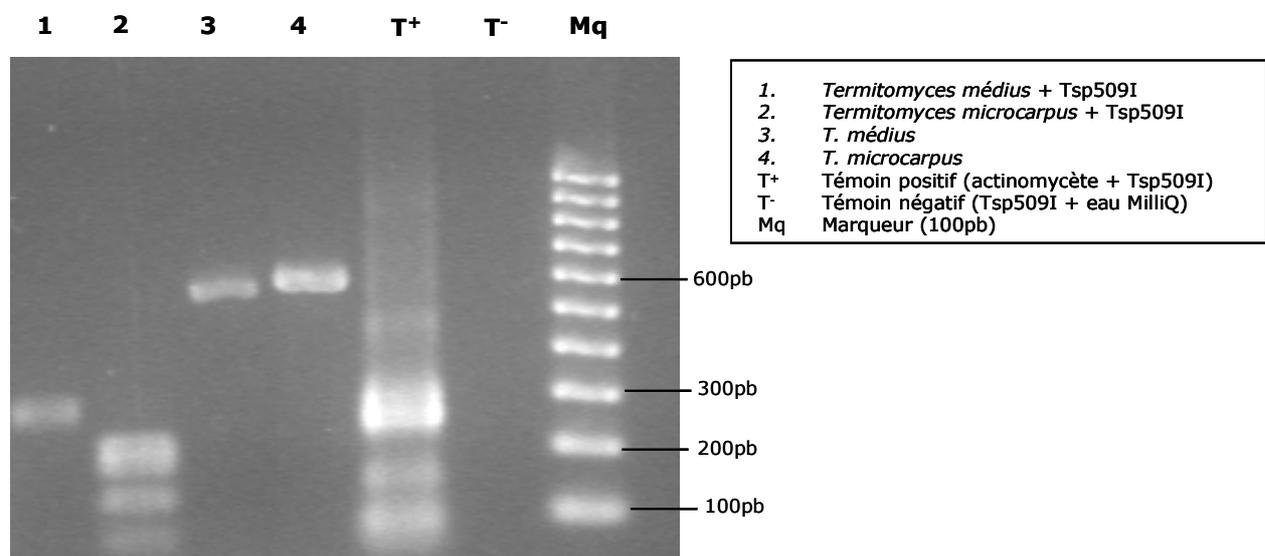


Figure 11: Résultat de l'ARDRA montrant les fragments obtenus après restriction de l'endonucléase Tsp509I (2 fragments d'environ 300pb chacun et 3 fragments d'environ 250, 200 et 100pb respectivement chez *T. médius* et *T. microcarpus*).

- Optimisation des conditions réactionnelles (température stringente d'hybridation, concentration des primers SuPER, quantité initiale d'ADN pour la SuPER réaction)

La réussite de la technique SuPER dépend énormément du choix de la température permettant à la fois l'hybridation de l'ADN cible, l'élongation de l'ADN polymérase et la restriction du fragment double brins par l'endonucléase thermostable. Ce choix est d'autant plus délicat qu'à faible température, des ADN non spécifiques peuvent s'hybrider et donc entraîner des restrictions non sélectives, tandis qu'à forte température l'enzyme peut ne plus fonctionner correctement ou être inactivée (Green & Minz, 2005).

Ainsi, pour déterminer la température stringente d'hybridation des primers utilisés pour la SuPER réaction, plusieurs tests ont été effectués avec des températures allant de 56 à 62°C. Les produits d'amplification ont été observés pour 58, 59 et 60°C. Au-delà de 60°C, aucun produit PCR n'a été obtenu. Les trois températures ayant donné des produits d'amplification (58, 59 et 60°C) ont également servi à la détection de celle permettant la meilleure activité de l'endonucléase Tsp509I. **La température correspondant à 60°C ayant donné les meilleurs résultats a finalement été sélectionnée pour la SuPER réaction.**

Les amorces utilisées pour la SuPER réaction pouvant par la suite inhiber les amplifications ultérieures (Green & Minz, 2005), la quantité minimale de primers SuPER requise pour obtenir des produits PCR a été déterminée en réduisant de 1/10, 1/5, 1/4, 1/3 et 1/2 la quantité habituellement utilisée pour les amplifications (0,2µM). Seule la dilution à 1/2 a donné des produits d'amplification. **Ainsi, les primers ITS1FT/ITS4 ont été utilisés à 0,1µM dans la SuPER réaction.**

Concernant la quantité d'ADN à utiliser pour la SuPER réaction, celle-ci nécessite une **calibration spécifique à chaque échantillon** en tenant également compte du fait qu'une quantité élevée peut entraîner une digestion incomplète de l'ADN majoritaire. L'aspect primordial n'est en fait pas réellement la quantité d'ADN à ajouter dans le milieu mais plutôt la quantité d'ADN majoritaire contenu dans l'ADN total utilisé pour la SuPER réaction. En d'autres termes, si l'ADN du *Termitomyces* est à 99% dans un échantillon de meule et que 100ng d'ADN de cet échantillon sont ajoutés dans le milieu réactionnel, après la SuPER réaction, il restera 1ng d'ADN non digéré. Dans ces conditions, la quantité d'ADN minoritaire obtenue à la fin de la réaction étant trop faible, celle-ci ne permettra pas l'obtention de produits d'amplification. Si au contraire l'ADN du *Termitomyces* n'est qu'à 60% dans les échantillons de meules et que 100ng sont utilisés, les 40ng obtenus à la fin de la SuPER réaction pourront permettre plus facilement l'obtention de produits d'amplification. Ainsi, une gamme d'ADN expérimentalement déterminée et comprise entre **80-130ng d'ADN pour 25µl de milieu réactionnel a été utilisée pour la SuPER réaction.**

Les conditions indispensables à la SuPER méthode ayant été optimisées puis validées par les différentes PCR et DGGE réalisées, cette méthode a été appliquée à l'étude de la mycoflore des meules afin de détecter les taxons en faible abondance. 5 espèces de Macrotermitinae collectées à trois différents endroits ont été utilisées dans cette partie:

- *Macrotermes subhyalinus* et *Macrotermes bellicosus* (Burkina Faso)
- *Macrotermes annandalei* et *Macrotermes carbonarius* (Vietnam)
- *Odontotermes sp.* (Thaïlande)

Les termitières ont été excavées et les meules actives (présence visible de termites) sont stérilement prélevées puis l'ADN est extrait comme précédemment décrit (Cf. Matériels & Méthodes)

III.2.2.2 SuPER réaction

Le milieu réactionnel de la SuPER digestion contient pour un volume de 25µl : 2U de *Taq* DNA polymérase (Invitrogen), 1X de tampon PCR (Invitrogen), 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs et 0,1µM des amorces ITS1FT et ITS4. Le mélange contenant approximativement 80-130ng d'ADN est chauffé à 95°C pendant 5min puis la température est abaissée à la température stringente d'hybridation déjà préalablement identifiée (60°C). L'endonucléase Tsp509I préalablement chauffée à 60°C dans le thermocycleur (Eppendorf) est ensuite ajoutée (avec les dNTPs) dans chaque tube à une concentration équivalente à 5U. Pour la restriction exclusive de l'ADN du *Termitomyces*, la réaction est maintenue à 60°C pendant 60 min afin de permettre simultanément l'hybridation des primers, l'élongation de l'ADN polymérase et la digestion de l'ADN double brins du *Termitomyces*. Le mélange réactionnel est ensuite incubé à 90°C pendant 20 min pour inactiver l'enzyme de restriction. L'ensemble est refroidi à 4°C et de la protéinase K (Sigma) est rajoutée au milieu réactionnel (concentration finale de 3,3 µg/µl), pour éviter les risques d'inhibition des PCR ultérieures par l'endonucléase. L'enzyme de restriction et la polymérase sont ensuite détruites en chauffant le mélange à une température de 58°C. La SuPER réaction se termine en élevant la température du mélange à 95°C pendant 10 min afin d'éliminer la protéinase K. Le milieu réaction SuPER ainsi obtenu est directement utilisé comme échantillon pour les PCR successives ultérieures.

III.2.2.3 Amplification par two-step PCR

L'ADN total des meules ayant subi une SuPER digestion ainsi que des échantillons non traités ont été amplifiés à l'aide des amorces fongiques universelles ITS1/ITS4 (White et *al.*, 1990) avec un GC-clamp (Sheffield et *al.*, 1989) associé à l'amorce sens afin d'optimiser la DGGE (Muyzer et *al.*, 1993). Toutefois, l'amplification de l'ADN total des meules ne permettant pas l'obtention de produits PCR lors de l'utilisation directe du couple d'amorce GC-ITS1/ITS4 et ce quelque soit les modifications apportées (nombre de cycles, température d'hybridation, purification de l'ADN, augmentation de la quantité d'ADN ou de MgCl₂), il est apparu que le GC-clamp inhibait l'amplification. Ce phénomène a par ailleurs déjà été signalé par d'autres travaux (Muyzer & Smalla, 1998 ; Oros-Sichler et *al.*, 2006).

Ainsi, une two-step PCR a été utilisée pour pallier à l'inhibition causée par le GC-clamp. Dans cette approche, le milieu réactionnel contient pour un volume de 25µl : 2U de *Taq* DNA polymérase (Invitrogen), 1X de tampon PCR (Invitrogen), 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs et 0,2µM de chaque amorce. Les réactions d'amplification sont réalisées à l'aide d'un thermocycleur (Eppendorf) et la première amplification de la two-step PCR s'est faite avec les amorces ITS1 (sans GC) et ITS4 selon les conditions suivantes: dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, suivie par 30 cycles de dénaturation 94°C pendant 1 min, hybridation à 60°C pendant 1 min, extension à 72°C pendant 1 min et une extension finale à 72°C pendant 10 min. La seconde partie de la two-step PCR a été réalisée avec le couple d'amorces GC-ITS1/ITS4 selon les mêmes conditions que celles du premier round mais le nombre de cycles a été diminué à 25 et la température d'hybridation a été montée à 61°C afin d'éviter des amplifications aspécifiques. Les produits d'amplification obtenus après chaque amplification ont été contrôlés par électrophorèse sur un gel d'agarose 2% et dans certains cas lorsque la première amplification de la two-step PCR semblait légère, au lieu de 1µl d'ADN dans 25µl de milieu réactionnel, c'est plutôt 2µl d'ADN qui ont été utilisés pour le second round.

III.2.2.4 Modification des conditions de migration en DGGE

Après l'amplification, les produits PCR sont séparés sur un gel d'acrylamide 6% (acryl-bisacrylamide gel ; 37,5 :1) contenant un gradient linéaire de dénaturants chimiques (30-70%) constitué par de l'urée et du formamide désionisé. La technique utilisée est déjà décrite dans la rubrique Matériels & Méthodes. Toutefois, les conditions de migration ont par contre été modifiées. La migration s'effectue d'abord à 20 Volts pendant 10 min puis à 75 Volts pendant 14 heures, la température étant réglée à 60°C. A cause d'une différence prononcée au niveau de la mobilité électrophorétique des taxons isolés, le gradient de dénaturant chimique utilisé n'a pas permis une très bonne résolution lors de la séparation de certaines bandes DGGE. Ainsi, pour ces échantillons, un gradient d'acrylamide (6-12%) a été couplé au gradient de dénaturant chimique (30-35%). Les conditions de migration sont dans ce dernier cas de 250 Volts pendant 6 heures, la température restant inchangée (60°C).

III.2.2.5 Communautés fongiques des meules révélées par SuPER PCR DGGE

Les communautés fongiques des meules de 5 espèces de Macrotermitinae ont été analysées par PCR et SuPER PCR DGGE. Les profils électrophorétiques obtenus par les deux techniques présentent des différences (figure 12).

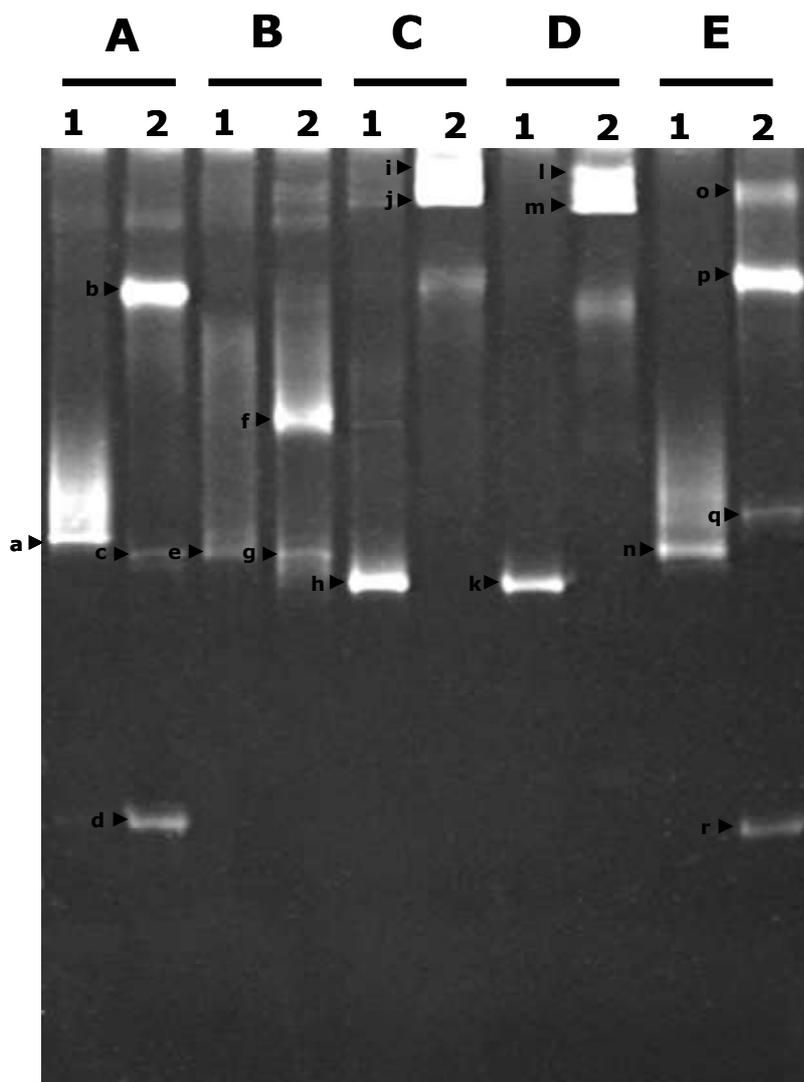


Figure 12: Comparaison de la mycoflore des meules de plusieurs espèces de Macrotermitinae analysée par SuPER PCR (1) et PCR (2) DGGE. Bandes DGGE d'intérêt excisées et séquencées a-r. **A** *Macrotermes subhyalinus*, **B** *Odontotermes sp.*, **C** *Macrotermes carbonarius*, **D** *Macrotermes Annandalei*, **E** *Macrotermes bellicosus*

Le blast des phylotypes ITS détectés par PCR-DGGE classique montre clairement et ce, quelque soit l'espèce de termite considérée ou l'origine des échantillons, que tous les ITS fongiques isolés appartiennent au genre *Termitomyces*. Ces phylotypes ont été classifiés en trois OTUs (tableau 8). La SuPER PCR-DGGE révèle par contre une diversité taxinomique plus importante bien qu'un seul phylotype ait été isolé par échantillon. En effet, pour les phylotypes isolés des meules de *Macrotermes subhyalinus* et *Macrotermes bellicosus* collectés au Bénin, la souche la plus proche dans GenBank appartient au genre *Candida* et les deux phylotypes ont été classifiés dans le même OTU (% de similarité = 100%). Dans les extraits des meules de *Odontotermes sp.* (Thaïlande), les bandes DGGE excisées sont hautement similaires à *Pichia caribbica* tandis que les phylotypes isolés des

meules des espèces vietnamiennes *Macrotermes carbonarius* et *Macrotermes annandalei* possèdent une similarité de 98% avec *Paecilomyces tenuis* (tableau 8). Aussi, les profils électrophorétiques révélés par PCR-DGGE et SuPER PCR-DGGE sont similaires pour des échantillons prélevés dans la même zone géographique.

Tableau 8: Identification taxonomique des Bandes DGGE isolées des meules de 5 termites champignonnistes

Label des bandes DGGE	Séquence la plus proche dans GenBank / N° d'accèsion et similarité	OTUs [†]	Accession N°
a et n	<i>Candida sp.</i> (AM160629) 97%	OTU1	EU816413
e	<i>Pichia caribbica</i> (EU569029) 99%	OTU2	EU816414
h et k	<i>Paecilomyces tenuis</i> (EU004812) 98%	OTU3	EU816415
b, c, d, o, p, q et r	<i>Termitomyces sp.</i> ST1 (AF321370) 100%	OTU4	EU816416
f	<i>Termitomyces sp.</i> group5 (AB073511) 100%	OTU5	EU816417
I, j, l et m	<i>Termitomyces sp.</i> group1 (AB073516) 99%	OTU6	EU816418

†OTU: Operational Taxonomic Unit à partir de 97.5% d'identité

La figure 13 présente le placement taxonomique des phylotypes fongiques isolés. L'arbre phylogénétique obtenu montre l'affiliation des OTU1 et OTU2 dans le cluster *Candida/Pichia* tandis que la troisième unité taxonomique est étroitement associée au cluster *Penicillium/Talaromyces/Paecilomyces*. Ces deux clusters 'non-*Termitomyces*' sont fortement supportés par des valeurs de bootstraps de 100%. Le clade contenant les phylotypes appartenant au genre *Termitomyces* est lui aussi fortement supporté par l'analyse de bootstraps. Il importe également de noter qu'aucune souche fongique commune n'a été décelée par les deux techniques et que malgré le succès de la SuPER réaction avec un isolement majoritaire de champignons filamenteux dont certains retrouvés en culture, aucun *Xylaria* n'a été obtenu sur les meules actives.

Discussion

L'objectif de cette deuxième partie est d'avoir une analyse plus complète de la diversité fongique des meules de *Macrotermitinae*, étape capitale dans la compréhension des mécanismes intervenant dans la symbiose *Macrotermitinae/Termitomyces*. La précédente analyse moléculaire de la mycoflore des meules (PCR-DGGE du 28S fongique, première partie) ayant mis en évidence que dans leur forme classique les techniques moléculaires ne permettent de déceler que l'ADN majoritaire du *Termitomyces*, la SuPER PCR (Green & Minz, 2005) a été adaptée à nos échantillons afin de connaître les communautés fongiques des meules actives.

L'hypothèse de départ était que d'une part certains phylotypes obtenus par culture pourraient être des résidents permanents des meules et donc impliqués dans la symbiose, et d'autre part la non détection de ces phylotypes via les outils moléculaires classiques serait due à l'ADN dominant du *Termitomyces* qui empêcherait l'amplification de l'ADN des autres communautés.

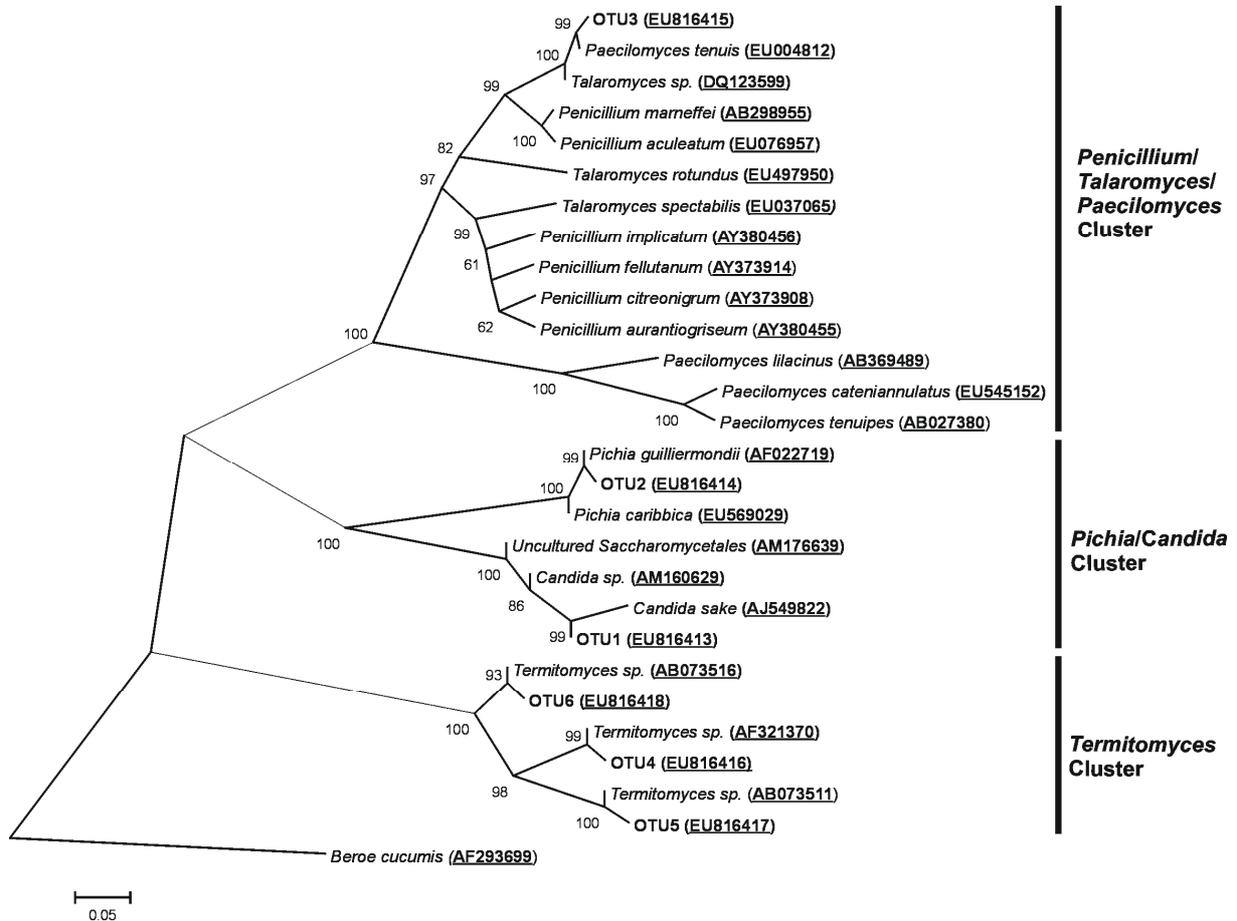


Figure 13: Arbre phylogénétique montrant le placement taxonomique des phylotypes rDNA ITS isolés des meules de 5 espèces de termites champignonnistes. *Beroe cucumis* (AF293699) a été utilisé comme extra-groupe. Les bootstraps ont été obtenues après 1000 répliqués et sont marquées pour des valeurs > 50%. Les séquences obtenues au cours de ce travail sont groupées par OTU en utilisant le critère de 97,5% d'identité.

La méthode SuPER (Green & Minz, 2005) a été pour la première fois utilisée dans l'étude des communautés fongiques et comme espéré a permis de détecter des communautés fongiques habituellement non décelées en biologie moléculaire. Bien qu'ayant nécessité une très longue phase d'optimisation, nos résultats confirment l'intérêt de cette technique pour l'étude des populations fongiques minoritaires. Ainsi, nous avons pu montrer pour la première fois que des populations fongiques autres que le *Termitomyces* étaient présentes sur les meules.

Dans le chapitre 3.1, il avait été suggéré que des souches appartenant au genre *Pichia* pouvaient être favorisées dans les meules tant pour leur potentiel antagonisme contre les principaux saprophytes (*Pichia guilliermondii*) alors que d'autres étaient des compétiteurs potentiels du *Termitomyces* en raison de leur forte capacité dans le recyclage des composés récalcitrants de la matière végétale (*Paecilomyces*) qui leur permettait de se maintenir dans la meule. Les résultats actuels illustrent clairement la présence de ces champignons dans la meule et cette association peut donc ne pas être accidentelle. Cependant, en étudiant l'origine des séquences les plus proches dans GenBank, il apparaît que les OTU1, OTU2 et OTU3 formant le groupe des 'Non-*Termitomyces*' sont très proches de taxons isolés d'environnements variés incluant les insectes, le sol et le matériel végétal.

Un autre but dans l'analyse moléculaire des communautés fongiques des meules de Macrotermitinae était la mise en évidence éventuelle d'une relation entre les souches de *Xylaria* présentes dans les meules abandonnées et les termites champignonnistes. En effet, plusieurs travaux font état de la présence quasi invariable de *Xylaria* dans les meules abandonnées par les termites ou extraites des nids (Grassé, 1937 ; Sand, 1969 ; Batra & Batra, 1979 ; Wood & Thomas, 1989). Deux hypothèses sont habituellement proposées : d'une part les *Xylaria* seraient sous forme mycélienne dans les meules et ne pousseraient (en formant des hampes) que lorsque ces dernières sont extraites des nids (Grassé, 1937) ou au contraire les *Xylaria* ne sont pas sous forme mycélienne dans les meules mais deviennent actifs quand les nids sont abandonnés par les termites (Batra & Batra, 1979 ; Wood & Thomas, 1989). Bien que ces deux hypothèses suggèrent l'influence de comportements 'hygiéniques' des termites (et dans une moindre importance les conditions environnementales des nids), ces résultats supportent plutôt la seconde hypothèse notamment l'absence des *Xylaria* sous forme mycélienne dans la meule active.

En analysant aussi bien les mycotêtes de *Termitomyces* que les meules de quelques espèces de Macrotermitinae asiatiques, Moriya et al. (2005) ont détecté par clonage 101 phylotypes parmi lesquels il y avait 99 basidiomycètes dont 96 *Termitomyces*. D'une part, les 96 *Termitomyces* ont été combinés en seulement 4 OTUs (Operational Taxonomic Units) et d'autre part ces auteurs ont considéré les 2 phylotypes non-basidiomycètes obtenus comme étant des *Xylaria*. Toutefois, les résultats obtenus au cours de cette étude, mais également les très faibles valeurs de bootstraps observées lors du placement taxonomique de ces deux phylotypes dans le cluster des *Xylaria* (représenté uniquement dans leurs travaux par deux séquences, laissent penser que ce ne sont pas des *Xylaria* associés aux termites.

Ces derniers seraient plutôt des contaminants issus de l'échantillonnage. Cela est d'autant plus vraisemblable qu'ils proviennent d'un échantillon unique mais surtout qu'ils n'apparaissent pas dans les profils T-RFLP des meules qui eux correspondent exclusivement aux *Termitomyces* symbiotiques (Moriya et *al.*, 2005). Il aurait en outre été intéressant de comparer ces 2 séquences identifiées comme étant des *Xylaria* avec celles directement obtenues à partir des hampes (chapitre suivant), toutefois, contrairement aux phylotypes de *Termitomyces*, ces 2 séquences n'ont été déposées dans aucune banque de données (DDBJ, EMBL ou GenBank).

Ainsi, tout comme la DGGE, la T-RFLP dans leur cas n'a permis l'obtention que des populations majoritaires des meules de Macrotermitinae, à savoir uniquement les *Termitomyces* symbiotiques, confirmant ainsi une des principales limites des techniques moléculaires classiques à savoir leur propension à ne déceler que les communautés majoritaires (Muyzer et *al.*, 1993 ; Muyzer & Smalla, 1998 ; Boon et *al.*, 2001 ; Holben et *al.*, 2003). La présence de plusieurs bandes DGGE pour une unique espèce de *Termitomyces*, liée à l'hétérogénéité des *rrn* opérons est également observée avec l'ITS fongique. Des observations similaires ont été faites par Moriya et *al.* (2005) en utilisant la T-RFLP. Toutefois, cette hétérogénéité peut entraîner une surestimation de la diversité réelle si l'on considère qu'une bande DGGE correspond à une souche unique.

Ce travail est le seul à avoir révélé génétiquement la présence d'autres champignons que le *Termitomyces* dans les meules saines de Macrotermitinae. Toutefois, bien que les présents résultats suggèrent que les *Xylaria* ne seraient pas présents sous forme mycélienne dans ces meules, il est néanmoins intéressant de vérifier la spécificité et la nature de cette association, c'est ce que nous avons entrepris dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 3.3 PHYLOGENIE ET SPECIFICITE DES *XYLARIA* ASSOCIES AUX MEULES DE MACROTERMITINAE

Des études phylogénétiques ont permis de mettre en évidence que l'association entre le *Termitomyces* et les termites de la sous famille des Macrotermitinae était une symbiose parfaite (Aanen et al., 2002 ; De fine et al., 2006 ; Katoh et al., 2002 ; Rouland-Lefèvre et al., 2002). Toutefois, plusieurs observations révèlent que dans la meule active (en présence des termites) le *Termitomyces* est le seul champignon visible mais lorsque les termites abandonnent les nids, plusieurs autres espèces fongiques se développent rapidement sur les meules. Parmi ces souches fongiques, une espèce est communément retrouvée dans les meules en absence des termites et jamais en leur présence.

Ce champignon a été placé dans le genre *Xylaria* (famille *Xylariaceae*, classe des ascomycètes) dont le trait principal est la formation de hampes. De ce fait, les *Xylaria* étroitement associés aux meules des termites champignonnistes sont considérés comme étant soit de simples saprophytes (Sand, 1969) soit des symbiontes à l'instar des *Termitomyces* (Batra & Batra, 1979). Ainsi, la nature de cette association est encore totalement inconnue.

Au nombre des difficultés majeures rencontrées dans l'étude des *Xylaria*, on note non seulement leur nature cosmopolite, leur morphologie hautement variable en fonction du stage de maturité, mais également des probables confusions taxonomiques dues à la difficulté d'observer les sites de germination des ascospores (Whalley, 1996 ; Lee et al., 2000, Rogers et al., 2005). Il est donc très difficile d'identifier formellement une espèce de *Xylaria* en se basant rien que sur les caractères morphologiques. De plus, Rogers et al. (2005) en étudiant la systématique de quelques *Xylaria* associés aux termites Macrotermitinae, ont parfaitement conclu que seule une caractérisation moléculaire pourrait clarifier la relation entre les *Xylaria* qui se développent sur les meules et les termites champignonnistes. Toutefois, aucune étude phylogénétique n'a concerné cette catégorie de *Xylaria*. L'on ne sait donc pas si la prolifération des *Xylaria* sur la meule est le résultat d'une coévolution avec les termites, si une espèce de *Xylaria* donnée est spécifique à un genre de termite ou enfin si plusieurs espèces différentes de *Xylaria* peuvent se développer sur une meule appartenant à une espèce unique de termite. Cette étude vise par conséquent à étudier la spécificité de la relation existant entre les termites de la sous famille des Macrotermitinae et les *Xylaria* retrouvés dans les meules.

III.3.1 Matériel biologique

Les espèces de Macrotermitinae utilisées, les différentes localités où elles ont été collectées, les codes des séquences de *Xylaria* isolés des meules ainsi que leurs numéros d'accès dans GenBank sont donnés par le tableau 9. Pour l'isolement des *Xylaria*, les meules ont été maintenues dans une boîte stérile légèrement humidifiée afin de favoriser l'érection des hampes. Après 2-5 jours d'incubation à température ambiante, les hampes sont prélevées à l'aide d'un matériel stérile, lavées à plusieurs reprises avec de l'eau distillée puis conservées dans de l'éthanol absolu à -20°C jusqu'à l'extraction d'ADN.

III.3.2 Diversité génétique des *Xylaria* associés aux Macrotermitinae

Les résultats révèlent que plusieurs isolats possèdent des ITS similaires. D'un côté les séquences des souches ASO5, AO7, AMS9, AMS10, ASMA4, AMB8, MB11, MB12 et MB13 sont hautement similaires et d'un autre, ASMG1 et ASMG2 sont également identiques. Ainsi, comme précédemment décrit dans le Matériel & Méthodes, seul un homologue de chaque (ASO5 et ASMG2) a été retenu pour l'analyse des séquences. La région ITS (incluant le 5.8S) des *Xylaria* associés aux termites a une longueur comprise entre 401 et 452 paires de bases (pb). La taille de l'ITS1 varie entre 84 et 137 pb bien qu'elle soit comprise entre 100 et 130 pb pour la majorité des souches isolées (tableau 10). Concernant l'ITS2, elle fait entre 135 et 163 pb. La teneur en Guanine-Cytosine (%GC) est en moyenne 56% pour l'ITS1 et 61% pour l'ITS2. Le 5.8S identique chez tous les isolats (165 pb) a une proportion de GC égale à 44,7%.

L'analyse de similarité entre les séquences est donnée par le tableau 11. La plus petite distance a été trouvée entre deux espèces isolées des meules ASMG2 et ASO5, tandis que la distance la plus importante est celle existant entre AO1 et *Xylaria acuta*. Le pourcentage de divergence entre les souches isolées des meules et les autres phylotypes inclus dans l'analyse phylogénétique varie de 22,29% (AO6/*X. entereuloca*) à 35,06% (AO1/*X. acuta*).

Tableau 9: Origine des séquences obtenues (espèces de Macrotermitinae, localités de collection ainsi que les codes des *Xylaria* isolés)

Souches fongiques	Codes	Termite symbiotique	Localités (Continent)	Nos d'accèsion GenBank
<i>Xylaria</i>				
Undetermined	AO1	<i>Odontotermes pauperans</i>	Côte d'Ivoire (Afrique)	EU164403
Undetermined	AO6	<i>Odontotermes sp1</i>	Bénin (Afrique)	EU164401
Undetermined	AO7	<i>Odontotermes sp2</i>	Bénin (Afrique)	EU203583
Undetermined	AMS4	<i>Macrotermes subhyalinus</i>	Burkina Faso (Afrique)	EU164407
Undetermined	AMS10	<i>Macrotermes subhyalinus</i>	Cameroun (Afrique)	EU203581
Undetermined	AMS9	<i>Macrotermes subhyalinus</i>	Cameroun (Afrique)	EU203580
Undetermined	AMS13	<i>Macrotermes subhyalinus</i>	Tchad (Afrique)	EU203586
Undetermined	AMB8	<i>Macrotermes bellicosus</i>	Benin (Afrique)	EU203582
Undetermined	AMB2	<i>Macrotermes bellicosus</i>	Burkina Faso (Afrique)	EU164406
Undetermined	AMB11	<i>Macrotermes bellicosus</i>	Togo (Afrique)	EU203587
Undetermined	AMB12	<i>Macrotermes bellicosus</i>	Togo (Afrique)	EU203588
Undetermined	AAG5	<i>Ancistrotermes cavithorax</i>	Togo (Afrique)	EU164400
Undetermined	AM3	<i>Microtermes sp.</i>	Burkina Faso (Afrique)	EU164408
Undetermined	ASMC3	<i>Macrotermes carbonarius</i>	Vietnam (Asie)	EU164404
Undetermined	ASMA4	<i>Macrotermes annandalei</i>	Vietnam (Asie)	EU203585
Undetermined	ASMG1	<i>Macrotermes gilvus</i>	Thaïlande (Asie)	EU203584
Undetermined	ASMG2	<i>Macrotermes gilvus</i>	Thaïlande (Asie)	EU164402
Undetermined	ASO5	<i>Odontotermes sp.</i>	Vietnam (Asie)	EU164405
<i>Xylaria acuta</i>	-	-	MI (USA)	AF163026
<i>Xylaria arbuscula</i>	-	-	Californie (USA)	AF163029
<i>Xylaria mali</i>	-	-	Corée (Asie)	AF163040
<i>Xylaria longipes</i>	-	-	Pays-Bas (Europe)	AF163038
<i>Xylaria enteroleuca</i>	-	-	HI (USA)	AF163033
Undetermined ascomycete				
Uncultured ascomycete	-	<i>Odontotermes formosanus</i>	Japon (Asie)	AB217790
<i>Ascomycota sp.</i>	-	<i>Odontotermes formosanus</i>	Japon (Asie)	AB217784
<i>Geniculisyneema termiticola</i>	-	<i>Odontotermes formosanus</i>	Japon (Asie)	AB274813
<i>Dyatripe disciformis</i>	-		Espagne (Europe)	AJ390410

Tableau 10: taille et %GC des ITS des *Xylaria* isolés des meules de Macrotermitinae

<i>Xylaria</i>	ITS1		ITS2	
	Taille (pb)	% G+C	Taille (pb)	% G+C
AAG5	103	57.3	163	60.1
AO6	137	60.6	150	55.3
ASMG2	110	55.5	154	53.3
AO1	125	50.4	135	68.1
ASMC3	130	66.1	154	61.0
ASO5	107	56.0	158	55.6
AMB2	85	42.3	156	48.7
AMS4	111	57.6	148	52.7
AM3	84	53.6	152	61.2

III.3.3 Spécificité des *Xylaria* associés aux meules de Macrotermitinae

III.3.3.1 Analyse phylogénétique

Les séquences de *Xylaria* obtenues après le séquençage (effectué par Génome Express, Grenoble) ont été alignées à l'aide du logiciel ClustalW (Thompson et *al.*, 1994). La matrice résultante a été ensuite manuellement vérifiée puis optimisée en supprimant les sites nucléotidiques ambigus. Les séquences ITS de 5 espèces de *Xylaria* endophytes et de 3 ascomycètes isolés des meules ont été retrouvées dans GenBank et incluses dans les alignements. *Diatrype disciformis* (AJ390410) a servi d'extra-groupe. L'alignement ainsi obtenu a servi pour l'obtention de la matrice de similarité et en cas de stricte homologie entre les séquences (- de 1% de divergence), seul un exemplaire de chaque homologue est conservé pour la reconstruction phylogénétique (Aïnouche & Bayer, 1999). La méthode phylogénétique utilisée est celle de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). L'arbre a été obtenu à l'aide du package PHYLIP (Felsenstein, 1991) avec les options par défaut. Tous les gaps issus de l'alignement ont été traités comme des caractères et les valeurs des bootstraps sont issues de 1000 replicats.

La reconstruction phylogénétique obtenue à l'aide de l'algorithme de Neighbor-Joining (figure 14) a révélé que les *Xylaria* retrouvés sur les meules de Macrotermitinae forment un groupe monophylétique ABC, quoique modérément supporté par les valeurs de bootstraps. Ce cluster ABC est divisé en trois clades A, B et C.

Tableau 11: Analyse de similarité entre les séquences rDNA ITS des différents taxons

	AAG5	AO6	ASMG2	AO1	ASMC3	ASO5	AMB2	AMS4	AM3	<i>X. ent.</i>	<i>X. acut.</i>	<i>X long.</i>	<i>X. arb.</i>	<i>X. mal.</i>	<i>Asco.</i>	<i>Uncult.</i>	<i>G. term.</i>	<i>D. disci.</i>	
AAG5																			
AO6	23.58																		
ASMG2	17.42	11.40																	
AO1	31.86	27.77	29.07																
ASMC3	18.36	18.28	17.36	24.73															
ASO5	16.40	12.39	04.14	26.20	17.69														
AMB2	18.01	28.12	19.91	33.48	26.97	19.59													
AMS4	18.14	17.40	14.52	26.00	19.29	15.10	21.28												
AM3	13.46	22.99	18.95	30.80	21.98	15.28	15.48	19.21											
<i>Xylaria enteroleuca</i>	27.71	22.29	23.60	30.27	22.49	22.84	30.23	22.43	29.67										
<i>Xylaria acuta</i>	31.52	26.38	26.69	35.06	25.99	26.82	33.98	26.67	33.99	10.12									
<i>Xylaria longipes</i>	30.32	25.20	25.60	32.39	24.35	25.80	32.06	23.89	31.39	08.20	05.26								
<i>Xylaria arbuscula</i>	29.43	22.11	24.80	31.59	24.75	26.71	32.61	24.25	32.07	12.68	12.63	09.68							
<i>Xylaria mali</i>	32.03	25.35	27.29	32.26	27.02	28.74	33.33	26.16	33.20	15.52	14.74	12.07	08.84						
<i>Ascomycota sp.</i>	22.88	15.58	06.99	27.99	21.41	09.91	27.66	19.44	24.57	17.53	20.96	20.12	18.42	20.72					
<i>Uncultured ascomycete</i>	25.83	27.67	24.09	19.10	25.55	25.84	29.35	25.40	26.38	31.19	34.61	32.05	31.72	32.53	26.46				
<i>G. termiticola</i>	30.77	25.27	26.23	18.16	27.20	31.03	30.64	26.35	28.27	30.71	31.91	30.16	30.27	29.17	26.72	21.83			
<i>D. disciformis</i>	34.61	28.57	30.35	32.68	29.24	32.63	34.50	32.56	34.44	22.59	22.16	20.78	21.31	21.50	24.08	34.18	30.27		

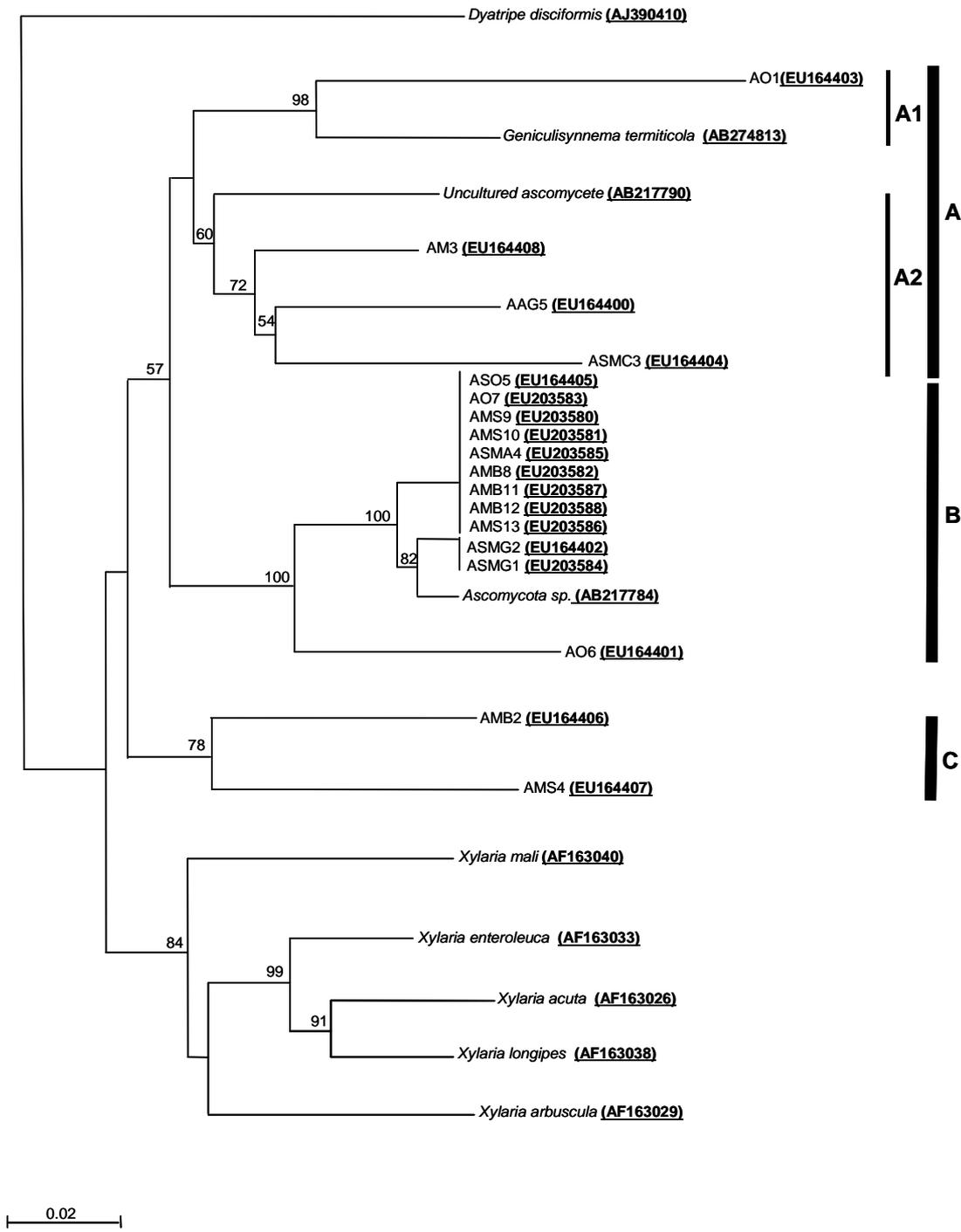


Figure 14: Phylogénie des *Xylaria* isolés des meules de Macrotermitinae réalisée à l'aide des séquences ITS1-5.8S-ITS2 par la méthode de Neighbor-Joining. *Diatrype disciformis* (AJ390410) a été utilisé comme extra-groupe. Les bootstraps sont indiqués sur les nœuds correspondants uniquement pour les valeurs > 50. Les barres verticales et les lettres capitales spécifient les 3 différents clades (A, B, C) et sous-clades (A1, A2) comme discuté dans le texte. Les séquences obtenues au cours de cette étude sont données par les codes des souches et les Nos d'accèsion dans GenBank. Les sequences de *X. arbuscula*, *X. mali*, *X. enteroleuca*, *X. acuta*, *X. longipes* sont issues de Lee et al. (2000); *Uncultured ascomycete* (AB217790) et *Ascomycota* sp. (AB217784) de Shinzato et al. (2005) ; *Geniculisyneema termiticola* (AB274813) de Okane & Nakagiri (2007).

Le clade A contient 2 sous-clades A1 et A2 et est peu supporté par des valeurs de bootstraps. Cependant, A1 incluant la souche AO1 et *Geniculisynnema termiticola* est fortement supporté par des bootstraps de 99% tandis que le clade A2 contenant AAG5, AM3, ASMC3 et l'Ascomycète sp. (AB217790) également isolé des meules de Macrotermitinae, est supporté par une valeur de bootstraps de 60%. Le cluster B qui contient 11 des 18 souches obtenues au cours de cette étude ainsi qu'un clone isolé des meules d'*Odontotermes formosamus* est supporté par 100% de bootstraps. Le clade C (bootstraps = 79%) comporte AMB2 et AMS4. Toutes les autres espèces de *Xylaria* incluses dans l'arbre phylogénétique proviennent d'un clade unique hautement distinct du cluster ABC.

III.3.3.2 Analyse sous UniFrac

Les données phylogénétiques obtenues ont également été traitées avec le logiciel UniFrac afin de tester l'effet de l'environnement sur la phylogénie. En effet, UniFrac analyse le jeu de séquences en tenant compte à la fois de la distance génétique que de l'environnement d'origine des échantillons. Ainsi, un test de significativité (P test), une matrice environnementale et une Analyse en Composante Principale (ACP) ont été réalisés. Le test de significativité (figure 15) montre que les *Xylaria* isolés des meules ne diffèrent pas significativement en fonction de leur environnement d'origine avec généralement une valeur de $P > 0,1$ tandis que la comparaison avec les phylotypes isolés des plantes et issus de GenBank révèle des différences significatives.

Code couleur

- (< 0.001) Hautement significatif
- (0.001-0.01) Significatif
- (0.01-0.05) Légèrement significatif
- (0.05-0.1) Suggestif
- (> 0.1) Non significatif

	Ancistro-Afrique	Endophyte-Plante	Macro-Afrique	Macro-Asie	Micro-Afrique	Odonto-Afrique	Odonto-Asie
Ancistro-Afrique		0.1400	0.2700	0.5100	1.0000	0.2300	0.2700
Endophyte-Plante			0.0000	0.0200	0.1700	0.0100	0.0200
Macro-Afrique				0.1000	0.2000	0.4000	0.1600
Macro-Asie					0.4000	0.7300	0.4200
Micro-Afrique						0.4700	0.2700
Odonto-Afrique							0.9800
Odonto-Asie							

Figure 15: Unifrac P test illustrant les différences significatives entre les *Xylaria* isolés des différents environnements (les phylotypes isolés des meules sont groupés par genre de Macrotermitinae et par continent).

Ces différences entre les paires d'environnement sont beaucoup plus visibles avec la matrice de distance environnementale et l'ACP (figure 16). En effet, la figure 16A montre d'une part que les distances les plus importantes (colorées en bleu) sont celles entre les *Xylaria* isolés des meules et ceux qui sont issus des plantes et d'autre part l'ACP (figure 16B) révèle également cette distinction mais aussi le fait que les *Xylaria* isolés des meules de *Microtermes* et d'*Ancistrotermes* se différencient des *Xylaria* retrouvés chez les autres espèces de termites champignonnistes.

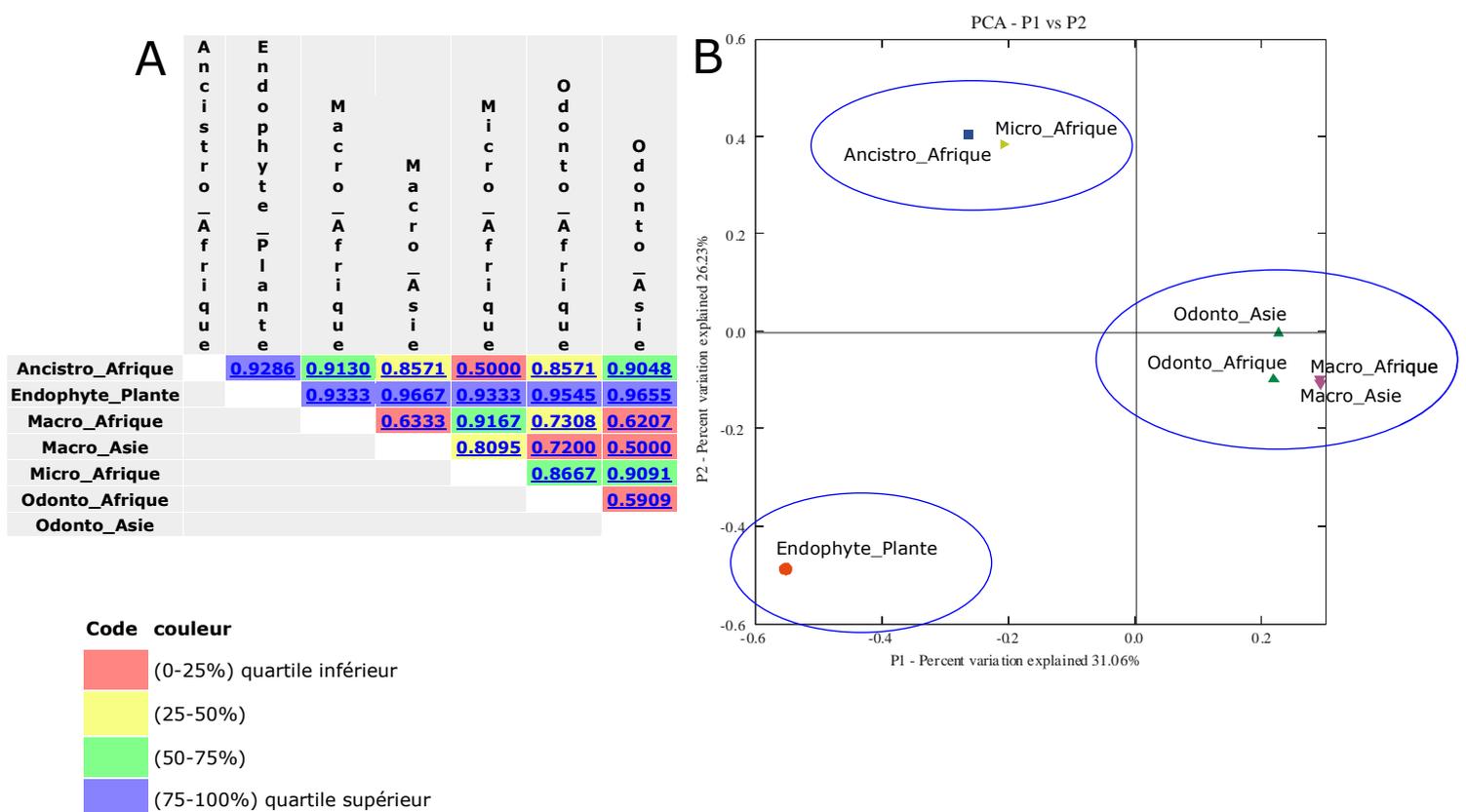


Figure 16: Matrice de distance environnementale (A) et analyse en composante principale (B) réalisées sous UniFrac

En outre, l'axe 1 de l'ACP (31% de la variance observée) regroupe les *Xylaria* isolés des meules de *Macrotermes* et d'*Odontotermes* indépendamment de leur origine.

Discussion

Cette étude s'est intéressée à la diversité génétique des *Xylaria* associés aux termites Macrotermitinae mais également à la spécificité de la relation qu'ils entretiennent avec les termites.

On cherchait donc à savoir si la prolifération des *Xylaria* sur la meule est le résultat d'une coévolution avec les termites ou s'ils sont éventuellement des parasites spécialisés de la symbiose à l'instar des *Escovopsis* chez les fourmis champignonnistes. L'analyse phylogénétique réalisée montre clairement que les *Xylaria* des termites forment au sein de leur genre un groupe monophylétique, quoique modérément supporté par des valeurs de bootstraps particulièrement pour les membres du clade A dont la position semble instable. Ces résultats supportent ceux de Lee et al. (2000) qui ont montré que chez les *Xylaria* endophytes, à l'exception de *Xylaria cubensis*, toutes les autres espèces provenaient d'un clade unique. De plus, Lee et al. (2000) ont noté que *Xylaria cubensis* était en fait phylogénétiquement plus proche du genre *Daldinia* que du genre *Xylaria*. Contrairement à nos résultats, d'autres études ont mentionné la possibilité pour les *Xylaria* de représenter un groupe non monophylétique (Bruner & Petrini, 1992 ; Guo et al., 2000 ; Davis et al., 2003 ;). Cependant, ces derniers travaux consistaient à isoler des espèces endophytes provenant d'environnements différents et n'étaient pas conduits pour élucider les relations phylogénétiques entre espèces de *Xylaria*.

Sur les 18 espèces de *Xylaria* provenant de 11 espèces de termites et de 8 pays (incluant l'Afrique et l'Asie), seules 9 séquences différentes de *Xylaria* ont été obtenues dont une a été retrouvée dans les meules appartenant à 5 espèces de termites. Cette faible diversité montre que peu d'espèces de *Xylaria* sont associées aux Macrotermitinae. Ces dernières observations sont congruentes avec l'étude taxinomique de Rogers et al. (2005) qui ont révélé que 9 espèces de *Xylaria* sont retrouvées sur les meules. Toutefois, ces derniers auteurs précisent que plusieurs autres *Xylaria* peuvent être potentiellement associés aux meules, mais leur relation avec les Macrotermitinae n'est pas confirmée.

Il ressort également de l'analyse des séquences, qu'une seule espèce de *Xylaria* est capable d'avoir des connexions avec plusieurs genres et espèces de termites. Le développement d'un *Xylaria* sur une meule n'est par conséquent pas limité à une espèce précise de Macrotermitinae. Nos travaux montrent par contre qu'une seule espèce de *Xylaria* est présente sur les meules issues d'un même nid. Contrairement à nos résultats, dans une étude récente Okane & Nakagiri (2007) ont retrouvé ensemble sur des meules d'*Odontotermes formosamus* deux phylotypes de l'ordre des Xylariales: le premier a été identifié comme étant *Xylaria angulosa* et le second a été décrit comme étant *Geniculisynnema termiticola* gen. et sp. nov. La séquence ITS de ce nouveau genre *Geniculisynnema* utilisé dans notre reconstruction phylogénétique, est apparue dans le même cluster que nos échantillons, ainsi que deux ascomycètes isolés d'une même meule d'*Odontotermes formosamus* par Shinzato et al. (2005).

Le fait que *G. termiticola* contrairement aux autres *Xylaria* endophytes soit retrouvé dans le même clade que les souches isolées dans cette étude pose le problème de la véritable affiliation dans ce genre, des *Xylaria* retrouvés chez les termites champignonnistes. En effet, plusieurs auteurs pensent que les *Xylaria* associés aux termites présentent certaines caractéristiques morphologiques relativement différentes des autres espèces de *Xylaria* et qu'en conséquence, ces derniers devraient être placés dans un autre genre ou au moins dans un sous-genre différent (voir références dans Rogers et al., 2005). Ceci est étayé par la comparaison des séquences entre les *Xylaria* des termites et les *Xylaria* endophytes sous UniFrac qui différencie clairement les deux types de *Xylaria*. Ces nouvelles données moléculaires associées à la spécificité du substrat supportent donc fortement le placement dans un sous-genre spécifique des *Xylaria* associés aux termites de la sous-famille des Macrotermitinae.

L'hypothèse principale de ce travail était que les *Xylaria* retrouvés dans les meules de termites champignonnistes pourraient avoir évolué avec les termites. Nos résultats ne permettent pas de conclure en ce sens dans la mesure où la même espèce de *Xylaria* a été retrouvée dans 5 espèces différentes de termites, originaires, de plus, de régions géographiques éloignées (Afrique et Asie). Cependant, il est intéressant de signaler que d'une part l'analyse en neighbor-joining sépare clairement (clade A1) les *Xylaria* associés aux meules d'*Ancistrotermes*, de *Microtermes* et de *Macrotermes carbonarius* qui sont de type II et III des meules des autres *Macrotermes* et des *Odontotermes* qui sont toutes de type I (Rouland-Lefèvre, 2000). Ce résultat est confirmé par l'analyse Unifrac qui différencie les *Xylaria* associés aux termites *Macrotermes* et *Odontotermes* de ceux présents dans les nids des *Ancistrotermes* et des *Microtermes*. Ainsi, la présence de l'une ou l'autre espèce de *Xylaria* pourrait être liée à la structure et au mode de fonctionnement de la meule qu'à l'appartenance taxinomique ou géographique du termite-hôte. Dans la mesure où il existerait une spécificité d'association avec un type précis de meule, cela sous-entendrait que la présence des *Xylaria* dans les meules n'est pas due au hasard et donc qu'il existe une relation termites/*Xylaria* qui reste à explorer. S'ils ne peuvent pas être considérés comme des partenaires de la symbiose à l'instar du *Termitomyces* (Rogers et al., 2005), on peut cependant estimer qu'ils ont un rôle dans la relation du termite avec sa meule. Ainsi, les *Xylaria* retrouvés dans les meules par opposition aux autres *Xylaria* seraient des saprophytes spécialisés dans la décomposition de ce type de substrat d'où la différence entre souches associées aux meules de type I et aux meules de type II.

La question qui découle de ce qui précède est comment les *Xylaria* présents sur les meules des termites sélectionnent ce substrat comme leur type d'habitat?

Les activités mécaniques des ouvriers et le contact entre espèces de termites peuvent suffire à expliquer la dispersion des spores d'un nid à un autre ou d'une espèce à l'autre mais pas leur association à un type particulier de meules. Sauf si l'on considère que les *Xylaria* associés aux termites s'approprient le substrat avant le début de la décomposition ce qui ne maintiendrait dans le biotope « meules » que les espèces adaptées à sa décomposition et donnerait un avantage certain aux *Xylaria* sur les autres saprophytes potentiels (Davis et al., 2003). Ceci expliquerait pourquoi quand les nids sont abandonnés par les termites, ils prolifèrent aussi rapidement. Ainsi Wood & Thomas (1989) suggèrent que les *Xylaria* associés aux Macrotermitinae sont en dormance dans la meule et deviennent actifs lorsque ces dernières sont extraites des nids ou que les colonies meurent. Cette hypothèse n'a cependant pas été vérifiée par nos études en biologie moléculaire (SuPER). On peut donc également spéculer sur l'existence d'un microclimat particulier dans le nid (température, humidité, CO₂) qui favoriseraient la croissance des *Xylaria* en l'absence des termites.

Bignell (2006) a défini 4 associations possibles entre la flore intestinale et le termite hôte à savoir : *touristes* (aucune association avec le termite hôte), *parasites* (pas toujours associés à un hôte mais causant des dégâts aux colonies lorsqu'ils sont présents), *généralistes* (développant une relation mutualiste avec plusieurs hôtes) et *spécialistes* (intimement associés à la flore intestinale et souvent retrouvés dans un sous-groupe spécifique). Ces définitions sont largement applicables à n'importe quel type de flore associée aux termites et les *Xylaria* associés aux Macrotermitinae bien que formant un groupe spécifique sont plutôt à classer dans la catégorie des *généralistes*. Toutefois, compte tenu également du fait qu'une espèce de *Xylaria* a déjà été retrouvée dans la flore intestinale des Macrotermitinae (Sreerama & Veerabhadrapa, 1993), il n'est pas exclu que, tout comme pour le *Termitomyces* symbionte, les *Xylaria* retrouvés sur les meules soient transportés par les ailés lors de la formation de nouvelles colonies. Les termites peuvent donc jouer un rôle plus direct dans la propagation de l'espèce.

CHAPITRE 3.4 ETUDE PRELIMINAIRE DES FACTEURS D'INHIBITION DE LA MYCOFLORE DES MEULES

Nos travaux précédents confirment la présence majoritaire voire quasi-exclusive dans la meule du mycélium de *Termitomyces* tandis que lorsqu'elles sont abandonnées par les termites, de nombreux autres champignons principalement des ascomycètes y sont observés. Cette observation conduit à se demander quels sont les mécanismes responsables de la monoculture du *Termitomyces* dans les meules. Le non-développement des souches saprophytes peut être dû à une incapacité de ces souches à croître sur le substrat proposé (carence nutritionnelle), à un effet antifongique des sécrétions salivaires ou digestives des termites ouvriers qui manipulent la meule et/ou à une inhibition par le *Termitomyces* en croissance.

III.4.1 Effet du substrat de croissance

Les souches de *Porosphaerella cordanophora*, *Trichoderma viride* et *Umbellopsis isabellina* isolées des meules (Cf. chapitre III.1) ont été mis en culture sur un milieu minéral ne contenant comme seule source de carbone qu'un broyat de meules. Quelle que soit la souche, on observe en 3 jours une nette croissance sur ce milieu. Le substrat de la meule n'est donc pas un inhibiteur de croissance des champignons saprophytes.

III.4.2 Evaluation de l'effet inhibiteur des suspensions salivaires et digestives des ouvriers de *Macrotermes bellicosus*

Des suspensions obtenues à partir des glandes salivaires et des tubes digestifs des ouvriers de *M. bellicosus* ont été utilisées pour ces essais. Compte tenu du grand nombre de glandes salivaires (et donc d'ouvriers de termite) nécessaires à cette expérimentation, seules 5 espèces de champignons saprophytes, choisies volontairement dans des groupes taxonomiques éloignés, ont été utilisées pour cette partie : *Chaetomium funicola* (meules de *Pseudacanthotermes militaris* et *spiniger*), *Umbellopsis isabellina* (meules d'*O. hainanensis*), *Cunninghamella blakesleana* (meules de *Microtermes* sp.), *Arthrographis* sp. (meules de *Pseudacanthotermes spiniger*) et *Xylaria* sp. (meules de *Macrotermes bellicosus*). La figure 17 illustre les principaux effets des suspensions salivaires et digestives sur la croissance des saprophytes testés.

Les glandes salivaires de *Macrotermes bellicosus* ont un effet sur la croissance d'*Umbellopsis isabellina* ainsi que l'indiquent les plages de lyse qui se forment à l'emplacement où les suspensions salivaires ont été inoculées (Figure 17). Avec les broyats des tubes digestifs, le résultat est moins net mais on observe quand même un ralentissement de croissance pour *U. isabellina* et *Chaetomium funicola*.

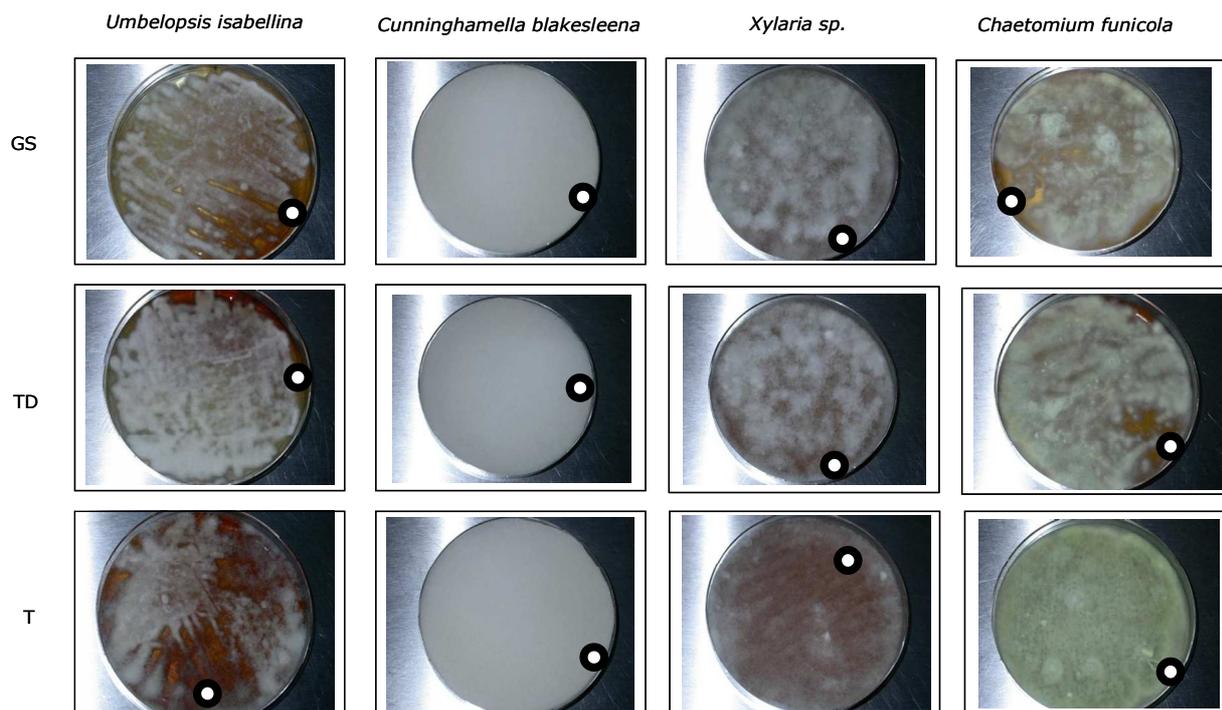


Figure 17 : Effet des glandes salivaires (GS), du tube digestif (TD) et du broyat des mycotètes de *Termitomyces* (T) sur la croissance de quelques saprophytes des meules (l'emplacement de l'inoculum est marqué par un cercle)

En revanche, la croissance de *Cunninghamella blakesleeana* et du *Xylaria sp.* (Figure 17) ainsi que celle d'*Arthrographis sp* (Figure 18A), n'est affectée par aucune suspension (salivaire ou digestive) et ce quelque soit la technique utilisée.

III.4.3 Evaluation de l'inhibition de la mycoflore saprophyte par le *Termitomyces* symbiotique

- Effet du broyat de mycotètes sur la croissance des saprophytes

40 mycotètes de *Termitomyces* ont été également collectés sur les meules de *Macrotermes bellicosus*, puis ont été broyés extemporanément dans 2 ml d'eau milliQ stérile. La croissance de *Xylaria sp.* s'est trouvée fortement ralentie en présence de ce broyat de mycotètes (figure 17). Les broyats de *Termitomyces* ne provoquent par contre aucune modification de la croissance du mycélium de *Cunninghamella blakesleeana*, *Porosphaerella cordanophora* et *Umbelopsis isabellina*.

- Co-culture *Termitomyces* vs. saprophytes des meules

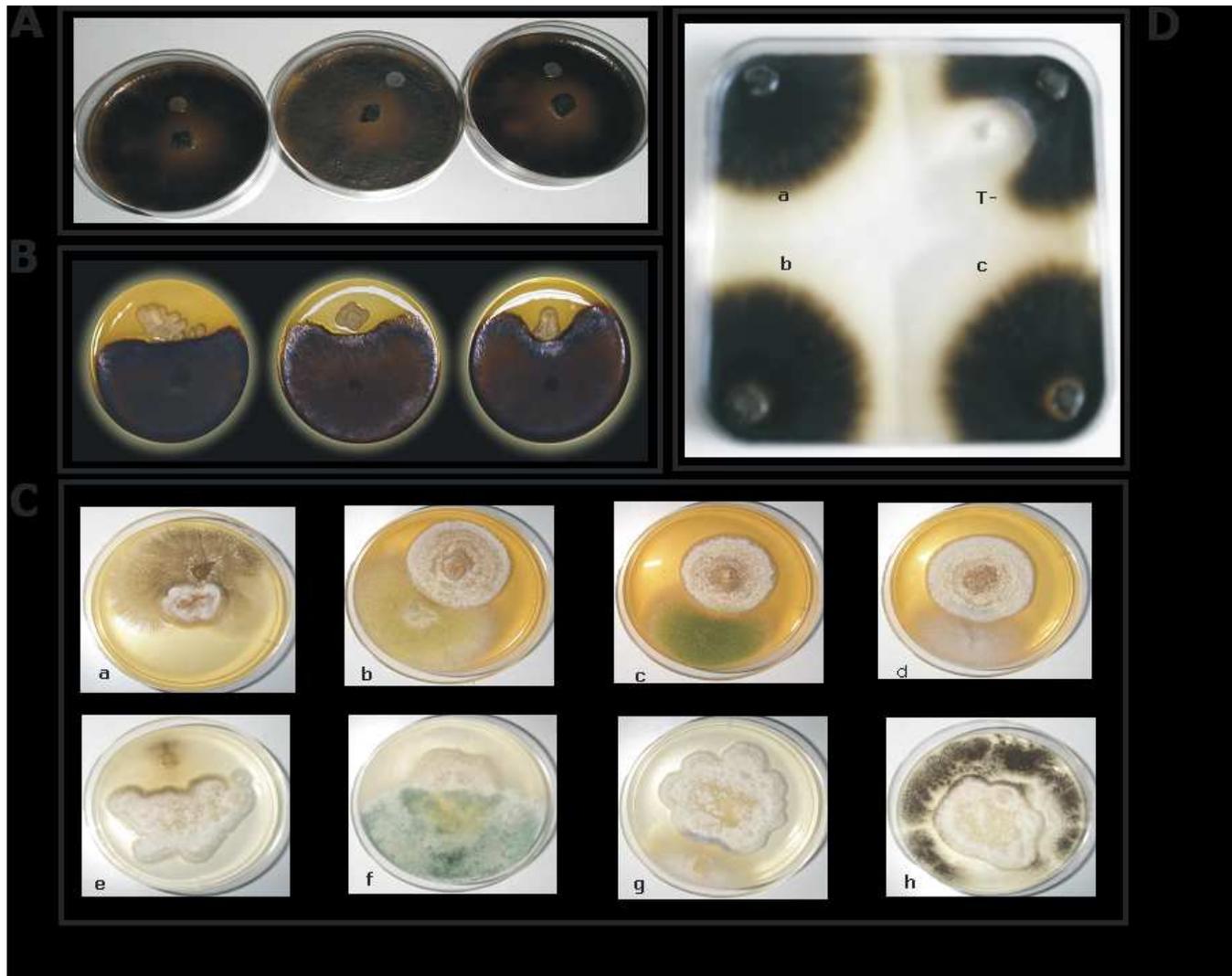
La mise en culture sur un même milieu de croissance de deux *Termitomyces* (*T. sp* de *Macrotermes michaelsenii* DSMZ-4276 & *T. albuminosus* DSMZ-1625) et des phytotypes saprophytes montre que la croissance de ces derniers n'est pas affectée par le mycélium symbiotique actif (Figure 18C). En effet, en cultivant simultanément toutes les souches ou en introduisant les mycéliums saprophytes après plusieurs jours de croissance des *Termitomyces*, les saprophytes recouvrent progressivement le mycélium symbiotique indiquant l'absence de substances antifongiques produites par les *Termitomyces*. Aucun composé volatil n'a en outre été décelé.

- Extraits et filtrats de culture du *Termitomyces* vs. les saprophytes des meules

Les extraits méthanoliques et aqueux des carpophores de *T. striatus*, *T. medius*, *T. microcarpus* et d'un *Termitomyces* non identifié n'ont présenté aucun effet inhibiteur contre les principaux phytotypes isolés des meules (Figure 18D). Les filtrats de culture obtenus après 15 jours de croissance du *Termitomyces* isolé des meules de *Macrotermes michaelsenii* (DSMZ-4276) et de *T. albuminosus* (DSMZ-1625) sur milieu liquide MEPB (Malt Extract Peptone Broth) ont donné des résultats similaires. Aucun effet n'a été observé aussi bien sur les spores que sur la pigmentation des saprophytes fongiques testés.

III.4.4 Evaluation de l'effet inhibiteur de *Pichia guilliermondii*, levure isolée des meules

L'effet de la levure *Pichia guilliermondii* sur la croissance des principaux saprophytes des meules a également été testé. Comme pour tous les autres saprophytes testés, la présence de *P. guilliermondii* ralentit considérablement la croissance d'*Arthographis sp.* (Figure 18B). Aucun métabolite volatil n'a toutefois été décelé chez *P. guilliermondii*.



- A. Effet inhibiteur des glandes salivaires de *Macrotermes bellicosus* sur la croissance d'*Arthrographis sp.* (Paper disk method). **Activité antifongique non observée**
- B. Co-culture de *Pichia guilliermondii* et d'*Arthrographis sp.* **Ralentissement de la croissance d'*Arthrographis sp.***
- C. Co-culture *Termitomyces* vs. principaux saprophytes sur milieux Malt Extract Peptone Agar (a. *Aspergillus aculeatus*, b. *Paecilomyces sp.*, c. *Aspergillus flavus* et d. *Fusarium sp.*) et Potato Dextrose Agar (e. *Arthrographis sp.*, f. *T. virens*, g. *Trichoderma asperellum* et h. *Aspergillus niger*). **Aucun composé volatil ou diffusible n'est produit par le champignon symbiotique.**
- D. Effet de l'extrait méthanoïque (a), de l'extrait aqueux (b) et du filtrat de culture (c) du *Termitomyces* sur la croissance d'*Arthrographis sp.* (T- = témoin positif, nystatine 2mg/ml) **Aucune activité antifongique n'a été détectée**

Figure 19: Illustrations représentatives des différents tests d'inhibition effectués (paper disk technique et co-culture)

Discussion

Le présent travail visait à connaître les mécanismes responsables de la présence d'une seule souche de champignon développée dans les meules de Macrotermitinae. Dans la synthèse de Wood & Thomas (1989), plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer la potentielle régulation de la mycoflore des meules incluant une activité mécanique des termites ('weeding') ayant pour corrolaire la suppression des mycéliums contaminants compétitifs ; un microclimat particulier du nid favorisant la croissance du champignon symbiotique et aussi l'inhibition des phylotypes saprophytes par des substances antifongiques issues des partenaires de la symbiose. Dans cette partie, une partie de ces hypothèses a été évaluée ainsi que l'utilisation possible d'une flore microbienne particulière par les termites.

Concernant le champignon symbiotique, ni les broyats de mycotêtes, ni les extraits méthanoïques et aqueux, ni les filtrats de culture ou le mycélium actif de plusieurs espèces de *Termitomyces* n'ont présenté une activité antifongique (diffusible et volatile) contre les différentes souches de saprophytes testées. Bien que la production des composés inhibiteurs soit fonction du milieu de culture dans lequel la souche antagoniste est cultivée (Wheatley et al., 1997 ; Bruce et al., 2003), ce résultat met en lumière la non implication du *Termitomyces* dans la régulation fongique des meules notamment dans l'inhibition des compétiteurs saprophytes. Par contre, le *Termitomyces* a clairement inhibé la croissance du *Xylaria* testé. Ceci confirme la position particulière du *Xylaria* parmi les champignons saprophytes des meules.

Le potentiel antifongique de *Pichia guilliermondii* a été vérifié sur plusieurs espèces de saprophytes des meules. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Petersson & Schnürer (1995) qui ont montré que la croissance et la sporulation de nombreux champignons filamenteux étaient inhibées par *P. guilliermondii* et *P. anomala*. Notre étude n'a pas mis en évidence la sécrétion de composés volatiles, ceci vient soutenir l'hypothèse qui suggère que cette levure ne produirait pas de substances antifongiques mais que son effet inhibiteur serait plutôt lié à une compétition pour l'espace et les nutriments (Zhao et al., 2008). Cependant, dans notre cas, compte tenu du fait que cette levure n'a été rencontrée que sur quelques échantillons de meules, il conviendrait d'augmenter le nombre d'observations afin de conclure si elle peut vraiment avoir un rôle dans la régulation des populations fongiques des meules de Macrotermitinae.

Les broyats des glandes salivaires et des tubes digestifs ont présenté, à des degrés divers, des capacités antifongiques. Toutes les souches testées n'ont pas présenté un ralentissement significatif de leur croissance mais il est important de souligner que les essais n'ont été faits que sur une seule espèce de termite, *Macrotermes bellicosus*, alors que les souches saprophytes testées provenaient de milieux écologiquement différents. Ainsi, le broyat de glandes salivaires de *Macrotermes bellicosus* semble réprimer la croissance de *Umbellopsis isabellina*. Dans une moindre mesure, le broyat de tubes digestifs provoque le même effet, la salive résiduelle contenue dans le broyat de tube digestif pourrait être responsable de la légère activité antifongique observée. Bien qu'*Umbellopsis isabellina* provienne de la meule d'*Odontotermes hainanensis*, le type et le fonctionnement de la meule sont les mêmes que chez *Macrotermes bellicosus*. Il semble donc qu'une substance produite par les glandes salivaires du termite puisse provoquer l'inhibition de la croissance des spores de souches fongiques saprophytes.

Déjà Heim (1977) et Grassé (1978) suggéraient l'existence d'un antibiotique qui inhiberait la croissance de souches concurrentes au *Termitomyces*. Lamberty et al. (2001) ont noté la présence de peptides anti-microbiens (baptisés termicine et spinigérine) dans les glandes salivaires d'adultes ailés de *Pseudacanthotermes spiniger*, probablement destinés à protéger les œufs des contaminations fongiques, lorsqu'ils sont léchés. L'effet antibiotique des broyats de glandes salivaires et du tube digestif est aussi noté, mais de manière plus ténue, sur *Chaetomium funicola*, trouvé chez *Pseudacanthotermes spiniger*. Ces derniers n'ont toutefois aucun effet sur la croissance de *Cunninghamella blakesleeana*, trouvé chez *Microtermes sp.* et d'*Arthrographis sp.* trouvé chez *P. militaris*. La plus faible efficacité de ces broyats s'explique probablement par le grand éloignement phylogénétique entre ces deux genres de termites et le genre *Macrotermes* (Aanen et al., 2002). Les substances antifongiques contenues dans la salive de *Macrotermes bellicosus* auraient donc un spectre d'action restreint à un type de meule particulier.

Ce résultat mitigé peut aussi être la résultante de plusieurs facteurs méthodologiques:

- L'existence d'une inhibition "dose-dépendante" c'est-à-dire une concentration seuil en deçà de laquelle les phylotypes fongiques ne sont pas inhibés. La difficulté de standardiser les inoculums salivaires peut ainsi expliquer la diversité des réponses obtenues.
- La production de composés antifongiques peut ne pas être constante chez les ouvriers mais uniquement activée par des mécanismes de défense contre les compétiteurs fongiques : la non connaissance de l'état physiologique de l'ouvrier pourrait conduire à l'obtention de broyats salivaires d'efficacité variée,

- Les suspensions salivaires utilisées dans les essais ont été centrifugées puis filtrées à 0,2 µM pour éliminer les microorganismes contaminants, cette filtration pourrait également éliminer des substances actives.

Le broyat de mycotêtes, après une latence de quelques jours (3), réprime la croissance de *Xylaria sp.* alors que les broyats de glandes salivaires et de tubes digestifs sont sans effet. Si la répression de spores de souches fongiques saprophytes passe par la production d'antibiotiques par les glandes salivaires, la limitation de la croissance du mycélium de *Xylaria sp.* serait due à des substances émises par le *Termitomyces* lors de sa croissance. Ceci confirmerait la place particulière que les différents auteurs ont donnée à la présence des *Xylaria* dans les nids des Macrotermitinae. Des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour déterminer quel type d'inhibition cela implique: interférence par hyphes, lors de contacts hyphe/hyphe ou hyphe/spore, entraînant la destruction du cytoplasme ; antagonisme à distance par des composés antibiotiques diffusants dans le milieu, ou encore contact entre mycéliums (Boddy, 2000).

4. Conclusion générale & Perspectives

Le but ultime de tels travaux sur la mycoflore des meules de Macrotermitinae outre la connaissance fondamentale de la biodiversité fongique avec la découverte de nouveaux taxons ou de l'impact des ingénieurs écologiques sur les communautés microbiennes, est la capacité à proposer des solutions écologiquement rationnelles et économiquement intéressantes dans l'optique d'une lutte biologique appropriée contre ces termites. En effet, malgré une influence généralement positive sur les propriétés physico-chimiques des sols, les termites champignonnistes occasionnent de nombreux dégâts aux cultures en Afrique et en Asie où ils sont principalement retrouvés. Les méthodes actuellement en vigueur pour lutter contre ces insectes incluent majoritairement l'usage de pesticides avec à la clef des conséquences dramatiques pour l'environnement (toxicité, rémanence,...) mais aussi pour les cultures (contamination). Des méthodes alternatives sont donc constamment recherchées. La connaissance de la relation symbiotique entre les termites Macrotermitinae et les *Termitomyces*, a par exemple permis un nouvel axe de recherche sur l'utilisation de fongicides pouvant inhiber le *Termitomyces* et par la-même les colonies de Macrotermitinae vu que des études fondamentales avaient montré en amont que cette relation était un mutualisme parfait et que par conséquent les termites champignonnistes ne pourraient vivre sans leur champignon symbiotique.

Toujours dans cet esprit, ce travail visait un inventaire exhaustif des communautés fongiques retrouvées sur les meules ainsi que l'étude des principales relations existant entre chaque organisme ou groupe d'organismes (antagonisme, parasitisme, mutualisme, saprophytisme,...). Ainsi, l'objectif principal était d'évaluer exhaustivement la biodiversité fongique des meules - structures spéciales construites par les termites Macrotermitinae et substrat de culture du champignon symbiotique - afin d'élucider l'ensemble des mécanismes impliqués dans cette association tout en mettant en exergue le rôle des Macrotermitinae vis-à-vis de la mycoflore tellurique. L'approche polyphasique utilisée tout au long de ce travail en associant différentes méthodes, a permis l'analyse de la diversité taxinomique et fonctionnelle de la mycoflore des meules et a limité les biais méthodologiques inhérents à chaque méthode prise séparément. Les conclusions suivantes résument donc les principaux résultats de cette thèse en relation avec les hypothèses de départ.

C1. L'existence d'une mycoflore spécifique aux meules et dépendante de l'espèce de termite hôte est peu supportée par les résultats de ces travaux.

A l'aide d'une approche analytique incluant l'utilisation complémentaire des méthodes traditionnelles d'isolement (cultures sur milieux gélosés) et des techniques moléculaires (28S et ITS PCR-DGGE, SuPER PCR DGGE), les communautés fongiques des meules de plusieurs espèces de termites Macrotermitinae ont pu être analysées afin de détecter la spécificité éventuelle de certains taxons.

Parmi les phylotypes cultivables obtenus, les *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium* ont été majoritairement isolés des meules. Cependant, la forte similarité avec la mycoflore du sol environnant a montré que ces champignons ne sont pas des parasites spécialisés de la meule, mais plutôt aléatoirement retrouvés en raison du rôle des termites dans leur dispersion, leur distribution et/ou leur croissance. Nos travaux n'ont donc pas permis de mettre en évidence une histoire évolutive commune entre ces champignons saprophytes et les termites hôtes. Cependant, certains taxons affiliés aux genres *Paecilomyces* et *Pichia* pour lesquels l'analyse moléculaire a confirmé la présence dans les meules, bien que minoritaires en regard du *Termitomyces*, pourraient avoir une fonction particulière dans le métabolisme de la meule.

C2. La diversité taxinomique des meules de Macrotermitinae est liée à une diversité fonctionnelle.

Le rôle fonctionnel de la mycoflore des meules a été évalué à travers la capacité d'une partie représentative des phylotypes cultivables obtenus à utiliser différents substrats incluant carbohydrates et composés dérivés de la lignine. Une grande diversité a été observée entre les isolats en termes d'utilisation de substrats carbonés (test de dégradation et dosage par spectrophotométrie) et d'enzymes extracellulaires produites (réalisation de profils physiologiques par API ZYM). La majorité de la mycoflore saprophyte des meules se caractérise par la production d'amylase et de xylanase, tandis que la cellulase n'est généralement pas sécrétée. Ces aptitudes enzymatiques combinées à l'incapacité d'utilisation des substrats complexes tels que les tannins présents en quantité dans les meules, mettent en lumière la nature saprophytique de ces phylotypes et confirme ainsi l'absence d'une relation spécifique avec les termites Macrotermitinae. Contrairement aux autres phylotypes, le genre *Paecilomyces* a été capable de dégrader efficacement la plupart des composés testés. Possédant des capacités fonctionnelles similaires voire supérieures à celles des champignons symbiotiques, les phylotypes de ce dernier genre peuvent être en compétition avec les *Termitomyces* symbiotiques. Il est important de rappeler que la symbiose entre termites et champignons se caractérise par une complémentarité enzymatique. Le *Termitomyces* produit les enzymes susceptibles de dégrader les macromolécules végétales en oligosides qui sont ensuite hydrolysés par les enzymes du termite. Des champignons, comme les *Paecilomyces*, pouvant réaliser seuls la complète dégradation des macromolécules végétales ne permettraient de réaliser cette symbiose équilibrée et doivent donc être éliminés par les termites. Par contre lors de l'abandon des meules ou de la mort de la colonie, ce sont des saprophytes très efficaces.

C3. Les champignons du genre *Xylaria* associés aux meules bien que formant une catégorie particulière, n'ont pas coévolué avec les termites hôtes.

Malgré les observations révélant la présence constante des *Xylaria* dans les meules non actives de Macrotermitinae, la spécificité de cette relation n'avait auparavant jamais été étudiée. Dans notre étude phylogénétique, 18 phylotypes ont été isolés des meules de plusieurs espèces de termites champignonnistes et l'obtention de taxons similaires sur des meules issues de genres de termites différents et provenant de multiples environnements, révèle la non spécificité des *Xylaria* dans leur association avec la meule des Macrotermitinae. Toutefois, la monophylie des *Xylaria* associés aux Macrotermitinae, la différence génétique prononcée avec les autres groupes de *Xylaria*, la proximité génétique avec des phylotypes isolés des meules et affiliés à des genres distincts ainsi que la niche écologique particulière, font que ces derniers méritent d'être placés à l'intérieur d'un sous-genre spécifique. Par ailleurs, la séparation en deux clades des *Xylaria* associés aux meules de type I de ceux associés aux meules de type II et III, renforce l'idée que la présence des *Xylaria* dans les nids des *Macrotermitinae* n'est pas aléatoire.

C4. Les sécrétions orales des ouvriers de Macrotermitinae et/ou le *Termitomyces* ont une action inhibitrice sur certains champignons saprophytes des meules.

Les précédents résultats ayant mis en évidence la faible spécificité de la plupart des taxons isolés pour les meules de Macrotermitinae, les meules sont pratiquement des monocultures du champignon symbiotique. Au nombre des mécanismes pouvant expliquer ce phénomène, la production de composés antifongiques par l'un des partenaires de la symbiose pourrait jouer un rôle important dans le maintien d'un environnement optimal pour une croissance exclusive du *Termitomyces*. Nos travaux préliminaires n'ont pas pu mettre en évidence l'action inhibitrice du *Termitomyces* sur la plupart des souches fongiques saprophytes à l'exception de l'espèce de *Xylaria* testée. A l'inverse, les extraits de glandes salivaires ou de tubes digestifs ont présenté une certaine action antifongique sur plusieurs espèces saprophytes mais n'ont, par contre, pas eu d'action sur le *Xylaria*. Si l'on considère, comme plusieurs auteurs l'ont suggéré que les saprophytes sont sous forme de spores et le *Xylaria* sous forme mycélienne, des modes d'action différents des antifongiques produits par les partenaires, termite et *Termitomyces*, permettraient d'expliquer ces résultats. Cette théorie est, de plus, soutenue par la découverte chez les ailés de *P. spiniger* de deux molécules antifongiques agissant sur la germination des spores.

Au vu des conclusions précédentes, il peut être utile d'analyser de façon plus approfondie les mécanismes par lesquels les termites inhibent la mycoflore des meules afin d'améliorer la compréhension de cette symbiose et d'ouvrir un nouvel axe de recherche appliquée au développement de régulateurs de croissance fongique. Ceci pourra se faire via :

- L'identification des composés chimiques (acides acétiques, lactone, indole-acétiques acides,...), des enzymes et des peptides antimicrobiens contenus dans les sécrétions salivaires des termites Macrotermitinae et la connaissance exacte de leur effet sur les spores et hyphes des *Xylaria* et principaux saprophytes des meules (*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*).
- L'analyse moléculaire de la flore microbienne contenue dans les sécrétions des termites Macrotermitinae (glandes salivaires, faeces, suspensions intestinales,...) afin de préciser au niveau des sécrétions orales la présence préférentielle de certains taxons pouvant résister aux attaques enzymatiques lors du transit digestif et potentiellement impliqués dans la protection des meules contre les parasites.
- L'étude phylogénétique des levures associées à la flore intestinale des termites Macrotermitinae peut également fournir des renseignements intéressants sur l'existence d'une association symbiotique entre ces deux organismes à l'instar de certains insectes (termites et fourmis inférieurs) et diplopodes (*Pachyiulus flavipes*).

Références bibliographiques

- **Aanen DK & Eggleton P** (2005) Fungus-growing termites originated in African rain forest. *Current Biology* 15:851-855.
- **Aanen DK, Eggleton P, Rouland-Lefevre C, Guldborg-Froxlev T, Rosendahl S & Boomsma JJ** (2002) The evolution of fungus-growing termites and their mutualistic fungal symbionts. *PNAS* 99:14887-14892.
- **Abe T & Higashi M** (2001) Isoptera. *Encyclopedia of Biodiversity* 3:581-611.
- **Abo-Khatwa N** (1978) Cellulase of fungus-growing termites: a new hypothesis on its origin. *Experientia* 34: 559-560.
- **Ainouche AK & Bayer RJ** (1999) Phylogenetic relationships in *Lupinus* (Fabaceae: Papilionoideae) based on Internal Transcribed Spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 86: 590-609.
- **Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- **Avis PG, Dickie IA & Mueller GM** (2006) A 'dirty' business: testing the limitations of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of soil fungi. *Molecular Ecology* 15: 873-882.
- **Badalyan SM, Innocenti G & Garibyan NG** (2004) Interactions between xylotrophic mushrooms and mycoparasitic fungi in dual-culture experiments *Phytopathol. Mediterr.* 43: 44-48.
- **Batra LR & Batra SWT** (1979) Termite-fungus mutualism. In: *Insect-fungus symbiosis-nutrition, mutualism and commensalism*. Batra LR (ed), Montclair, New Jersey: Allanheld, Osmun and Co. pp. 117-163.
- **Battestin V & Macedo GA** (2007) Tannase production by *Paecilomyces variotii*. *Bioresource Technology* 98: 1832-1837.
- **Bauer AW, Kirby WMM, Sherris KC & Truck M** (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 45: 493.
- **Bayman P, Angulo-Sandoval P, Baez-Ortiz Z & Lodge J** (1998) Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico. *Mycological research* 102(8): 944-948.
- **Behn M, Thiede C, Neubaeur A, Pankow W & Schuermann M** (2000) Facilitated detection of oncogene mutations from exfoliated tissue material by a PNA-mediated 'enriched PCR' protocol. *J. Pathol.* 190: 69-75.
- **Belbahri L, Calmin G, Sanchez-Hernandez E, Oszako T & Lefort F** (2006) *Pythium sterilum* sp. nov. isolated from Poland, Spain and France: its morphology and molecular phylogenetic position. *FEMS Microbiology Letters* 255(2): 209-214.
- **Bignell DE** (1994) Soil-feeding and gut morphology in higher termites. In: *Nourishment and evolution in insect societies*. Hunt JH & Nalepa CA (eds.), Westview Press, Boulder, pp. 131-158.
- **Bignell DE** (2006) Termites as soil engineers and soil processors. In: *Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates*. Koenig H (ed). Heidelberg, Berlin: Springer Verlag, pp 183-220.
- **Bignell DE & Eggleton P** (2000) Termites in ecosystems. In: *Termites: Evolution, sociality, symbioses and ecology*. Abe T, Bignell DE & Higashi M (eds), Kluwer Acad. Publ. pp. 363-387.

- **Bignell DE, Slaytor M, Veivers PC, Muhlemann R & Leuthold RH** (1994) Functions of symbiotic fungus gardens in higher termites of the genus *Macrotermes*: evidence against the acquired enzyme hypothesis. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 41: 391-401.
- **Blakeman JP** (1978) Microbial competition for nutrients and germination of fungal spores. *Ann. Appl. Biol.* 89: 151-155.
- **Blanchette RA** (1991) Delignification by wood-decay fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 381-398.
- **Bleve G, Grieco F, Cozzi G, Logrieco A & Visconti A** (2006) Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology* 108: 204-209.
- **Boddy L** (2000) Interspecific combative interactions between wood-decay basidiomycetes. *FEMS Microbiol Ecol* 31: 185-194.
- **Bot ANM, Ortius-Lechner D, Finster K, Maille R, Boomsma JJ** (2002) Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants. *Insectes Sociaux* 49:363-370.
- **Breznak JA & Brune A** (1994) Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 453-487.
- **Brightwell G, Boerema J, Mills J, Mowat E & Pulford D** (2006) Identifying the bacterial community in the surface of Intralox™ belting in a meat boning room by culture-dependent and culture-independent 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology* 109: 47-53.
- **Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM & Handelsman J** (2004) Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 293-300.
- **Bruce A** (1998) Biological control of wood decay. In: *Forest Products Biotechnology*. Bruce A & Palfreyman JW (eds), Taylor & Francis, London, pp. 251-267.
- **Brunner F & Petrini O** (1992) Taxonomy of some *Xylaria* species and xylariaceous endophytes by isoenzyme electrophoresis. *Mycological research* 96: 723-733.
- **Cano C & Bago A** (2005) Competition and substrate colonization strategies of three polyxenically grown arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* 97(6): 1201-1214.
- **Cardoza YJ, Klepzig KD & Raffa KF** (2006) Bacteria in oral secretions of an endophytic insect inhibit antagonist fungi. *Ecological Entomology* 31: 636-645.
- **Carroll GC** (1991) Beyond pest deterrence: Alternative strategies and hidden costs of endophytic mutualisms in vascular plants. In: *Microbial Ecology of Leaves*, Andrews JH & Hirano SS (eds), Springer-Verlag, New York, pp. 358-375.
- **Carroll G & Petrini O** (1986) Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. *Mycologia* 75(1):53-63.
- **Celar F** (2000) Antagonistic mechanisms between saprophytic and parasitic soil fungi. Doctoral dissertation, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy, Ljubljana, 118p.
- **Celar F** (2003) Competition for ammonium and nitrate forms of nitrogen between some phytopathogenic and antagonistic soil fungi. *Biological control* 28: 19-24.

- **Cho JC & Giovannoni SJ** (2004) Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine gammaproteobacteria. *Appl Environ Microbiol* 70: 432–440.
- **Cilia V, Lafay B & Christen R** (1996) Sequence heterogeneities among 16S Ribosomal RNA sequences and their effect on phylogenetic analyses at species level. *Mol. Biol. Evol.* 13(3): 451-461.
- **Cmelik S & Douglas CC** (1970) Chemical composition of 'fungus gardens' from two species of termites. *Comparative Biochemistry and Physiology* 36: 493–502.
- **Collins NM** (1981) Consumption of wood by artificially isolated colonies of the fungus-growing termite *Macrotermes bellicosus*. *Entomol. Exp. Appl.* 29: 313-320.
- **Connon S & Giovannoni S** (2002) High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl Environ Microbiol* 68: 3878–3885.
- **Cremonesi L, Firpo S, Ferrari M, Righetti PG & Gelfi C** (1997) Double-gradient DGGE optimized detection of DNA point mutation. *BioTechniques* 22(2): 326-330.
- **Crosland MJW, Chan LK & Buswell JA** (1996) Symbiotic fungus and enzymatic digestion in the gut of the termite, *Macrotermes barneyi* (Light) (Isoptera: Termitidae). *Journal of Entomological Science* 31: 132–137.
- **Currie CR, Bot ANM & Boomsma JJ** (2003) Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. *Oikos* 101(1): 91–102.
- **Currie CR, Mueller UG & Malloch D** (1999) The agricultural pathology of ant fungus gardens. *PNAS* 96:7998-8002.
- **Currie CR, Scott JA, Summerbell RA & Malloch D** (1999) Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* 398: 701–704.
- **Currie CR, Wong B, Stuart AE, Schultz TR, Rechner SA, Mueller UG, Sung G, Spatafora JW & Straus NA** (2003) Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Science* 229: 386-388.
- **Da Silva P, Jouvensal L, Lamberty M, Bulet P, Caille A & Vovelle F** (2003) Solution structure of termicin, an antimicrobial peptide from the termite *Pseudacanthotermes spiniger*. *Protein Sci.* 12: 438–446.
- **Das SR, Maheshwari KL, Nigam SS, Shukla RK & Tandon RN** (1962) Microorganisms from the fungus garden of the termite *Odontotermes obesus* (Rambur). In: *Proceedings of the symposium on termites in the humid tropics*, New Delhi, pp. 163-166.
- **Davis EC, Franklin JB, Shaw JA & Vilgalys R** (2003) Endophytic *Xylaria* (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms: phylogenetics, distribution and symbiosis. *American Journal of Botany* 90(11): 1661-1667.
- **De Fine Licht HH, Boomsma JJ & Aanen DK** (2006) Presumptive horizontal symbiont transmission in the fungus-growing termite *Macrotermes natalensis*. *Molecular ecology* 15: 3131-3138.
- **De Fine Licht HH, Boomsma JJ & Aanen DK** (2007) Asymmetric interaction specificity between two sympatric termites and their fungal symbionts. *Ecological Entomology* 32(1): 76-81.

- **De Koker TH, Zhao J, Allsop SF & Janse BJH** (2000). Isolation and enzymic characterisation of South African white-rot fungi. *Mycol. Res.* 104 (7): 820-824.
- **Dent K, Stephen JR & Finch-Savage WE** (2004) Molecular profiling of microbial communities associated with seeds of *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* (sugar beet) *Journal of Microbiological Methods* 56: 17-26.
- **Dick CM & Hutchinson SA** (1966) Biological activity of volatile fungal metabolite. *Nature* 211: 868
- **Diouf M, Brauman A, Miambi E & Rouland-Lefevre C** (2005) Fungal communities of the foraging soil built by several termite species (Isoptera, Termitidae: Macrotermitinae) in a dry savana (Thies, Senegal). *Sociobiology* 45(3): 899-914.
- **Diouf M, Brauman A, Mora P, Miambi E & Rouland-Lefèvre C** (2006) Modification of soil fungal communities in crop sheetings of fungus-growing termites and its effects on soil functioning. *Sociobiology* 47(2): 353-371.
- **Diouf M, Brauman A & Rouland-Lefèvre C** (2002) Modifications des communautés fongiques du sol sous l'action de plusieurs espèces de termites Macrotermitinae. *Act Coll UIEIS* 15: 63-67.
- **Dix NJ & Webster J** (1995) *Fungal ecology*. Chapman & Hall, Cambridge, Great Britain.
- **Domsch KH, Gams W & Anderson TH** (1993) *Compendium of soil fungi*. IHW-Verlag Pub.
- **Donovan SE, Jones DT, Sands WA & Eggleton P** (2000) The morphological phylogenetics of termites (Isoptera). *Biol J linn Soc* 70: 467-513.
- **Eggleton P** (2000) Global diversity patterns. In: *Termites: Evolution, sociality, symbiosis, ecology*. Abe T, Bignell DE & Higashi M (eds.), Kluwer, Academic Publishers, pp. 25-51.
- **Eggleton P** (2006) The termite gut habitat: its evolution and co-evolution. In: *intestinal microorganisms of soil invertebrates*. König H & Varma A (eds), Springer-Verlag, Berlin, pp. 373-403.
- **Eggleton P & Tayasu I** (2001) Feeding groups, lifetypes and the global ecology of termites. *Ecol. Res.* 16: 941-960.
- **Ellis RJ, Morgan P, Weightman AJ & Fry JC** (2003) Cultivation dependent and independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol* 69: 3223-3230.
- **Elsyn WB, Kirk TK & Effland FJ** (1975) Change in the chemical composition of wood caused by six soft-rot fungi. *Phytopathologia* 65: 473-476.
- **Emerson AE** (1955) Geographical origin and dispersions of termite genera. *Zoology* 37: 465-521.
- **Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G & Coppola S** (2001) The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Systematic and Applied Microbiology* 24: 610-617.
- **Eriksson KE, Blanchette RA & Ander P** (1990) Biodegradation of lignin. In: *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Timell TE (ed.), Springer-Verlag GmbH & Co. KG, Berlin, pp: 225-397.

- **Fan Z, Oguntimein GB & Reilly PJ** (2000) Characterization of kinetics and thermostability of *Acremonium strictum* glucooligosaccharide oxidase. *Biotechnol. Bioeng.* 68: 231-237.
- **Felsenstein J** (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- **Felsenstein J** (1991) PHYLIP-phylogenetic interference package. Computer programs distributed by Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA.
- **Fengel D & Wegener G** (1984) *Wood, chemistry, ultrastructure, reactions.* Walter de Gruyter, Berlin.
- **Ferreira Gregorio AP, Da Silva IR, Sedarati MR & Hedger JN** (2006). Changes in production of lignin degrading enzymes during interactions between mycelia of the tropical decomposer basidiomycetes *Marasmiellus troyanus* and *Marasmius pallenscens*. *Mycological research* 110: 161-168.
- **Fisher MM & Triplett EW** (1999) Automated approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied Environmental Microbiology* 65(10): 4630-4636.
- **Fisher P, Stradling D, Sutton B & Petrini L** (1996) Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. *Mycological Research* 100: 541-546.
- **Fisher PJ & Petrini O** (1992) Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist* 120: 137-143.
- **Frankland JC, Dighton J & Boddy L** (1991) Fungi in soil and forest litter. In: *Methods in Microbiology.* Grigorova R & Norris JR (eds). Vol 22, Academic press, London, pp. 344-404.
- **Gafan GP & Spratt, DA** (2005) Denaturing gradient gel electrophoresis gel expansion (DGGE) – an attempt to resolve the limitations of co-migration in the DGGE of complex polymicrobial communities. *FEMS microbiology letters* 253: 303-307.
- **Garland JL & Mills AL** (1991) Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2351-2359.
- **Ghosh AK, Jana ML, Naskar AK, Chatterjee R & Sengupta S** (2002) Removal of carboxymethyl cellulase activity from the culture filtrate of *Termitomyces clypeatus* producing xylanase. *Biotechnology Letters* 24(15) DOI: 10.1023/A:1016277907666.
- **Ghosh S, Sachan A & Mitra A** (2006). Formation of vanillic acid from ferulic acid by *Paecilomyces variotii* MTCC 6581. *Curr. Sci.* 90: 825-829.
- **Grasse PP** (1937) Recherche sur la systématique et la biologie des termites de l'Afrique occidentale française. *Ann. Soc. Entomol. Fr.* 106: 1-100.
- **Grassé PP** (1978) Sur la véritable nature et le rôle des meules à champignons construites par les termites Macrotermitinae (Isoptera, Termitidae). *C R Hebd Seances Acad. Sci. Ser. D.* 287: 1223-1226.
- **Green SJ & Minz D** (2005) Suicide polymerase endonuclease restriction, a novel technique for enhancing PCR amplification of minor DNA templates. *Applied and Environmental Microbiology* 71(8): 4221-4227.
- **Griffin DH** (1994) *Fungal physiology.* Wiley Ch9.

- **Guarro J, Gené J & Stchigel AM** (1999) Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 454–500.
- **Guarro J, Severo LC, Gené J, de Mattos Oliveira F, Cano J, Franche G, Cantarelli VV & Schell AW** (2006) Sinusitis caused by the fungus *Xylaria enteroleuca* in a lung transplant recipient. *Diagn Microbiol Infect Dis* 56(2): 207–212.
- **Guo LD, Hyde KD & Liew ECY** (2000) Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytol.* 147: 617–630.
- **Haack SK, Garchow H, Klug MJ & Forney LJ** (1995) Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1458–1468.
- **Hall TA** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95–98.
- **Heim R** (1977) *Termites et champignons*. Editions Boubée, Paris. 207 p.
- **Heuer H & Smalla K** (1997) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In: *Modern Soil Microbiology*. van Elsas JD, Trevors JT & Wellington EMH (Eds), Marcel Dekker, New York. pp. 353–373.
- **Heuer H, Wieland G, Schonfeld J, Schnwalder A, Gomes NCM & Smalla K** (2001) Bacterial community profiling using DGGE and TGGE analysis. In *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications*. Rochelle PA (ed.), Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, pp. 177–190.
- **Higashi M & Abe T** (1996) Global diversification of termites driven by the evolution of symbiosis and sociality. In: *Biodiversity: An Ecological Perspective*. Abe T, Levin SA & Higashi M, (eds.), Springer-Verlag, New York, pp. 83–112.
- **Hill GT, Mitkowski NA, Aldrich-Wolfe L, Emele LR, Jurkonie DD, Kicke A, Maldonado-Ramirez S, Lynch ST & Nelson EB** (2000) Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Appl Soil Ecol* 15: 25–36.
- **Holben WE, Feris KP, Kettunen A & Apajalahti JHA** (2004) GC fractionation enhances microbial community diversity assessment and detection of minority populations of bacteria by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 70(4): 2263–2270.
- **Holt JA & Lepage M** (2000) Termites and soil properties. In: *Termites: Evolution, sociality, symbioses, ecology*. Abe T, Bignell DE & Higashi M (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 389–407.
- **Hongoh Y, Ekpornprasit L, Inoue T, Moriya S, Trakulnaleamsai S, Ohkuma M, Noparatnaraporn N & Kudo T** (2006) Intracolony variation of bacterial gut microbiota among castes and ages in the fungus-growing termite *Macrotermes gilvus*. *Mol. Ecol.* 15: 505–516.
- **Hyodo F, Azuma J-I & Abe T** (1999) A new pattern of lignin degradation in the fungus comb of *Macrotermes carbonarius* (Isoptera, termitidae Macrotermitinae). *Sociobiology* 34(3): 591–596.
- **Hyodo F, Inoue T, Azuma J-I, Tayasu I & Abe T** (2000) Role of the mutualistic fungus in lignin degradation in the fungus-growing termite *Macrotermes gilvus* (Isoptera; Macrotermitinae). *Soil Biology and Biochemistry* 32: 653–658.

- **Hyodo F, Tayasu I, Inoue T, Azuma J-Y, Kudo T & Abe T** (2003) Role of symbiotic fungi in lignin degradation and food provision for fungus-growing termites (Macrotermitinae: Isoptera). *Functional Ecology* 17: 186-193.
- **Janisiewicz WJ & Roitman J** (1988) Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology* 78(12):1697-1700.
- **Janse I, Bok J & Zwart G** (2004) A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 57: 279-281.
- **Johnsen K, Jacobsen CS, Torsvik V & Sørensen J** (2001) Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils: a review. *Biology and Fertility of Soils* 33: 443-453.
- **Jones CG, Lawton JH & Shachak M** (1994) Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69: 373-386.
- **Jones DT & Eggleton P** (2000) Sampling termite assemblages in tropical forests: testing a rapid biodiversity assessment protocol. *Journal of Applied Ecology* 37: 191-203.
- **Joseleau JP** (1980) Les hémicelluloses. In: les polymères végétaux. M.B. ed, Gauthier-Villars, 269 p.
- **Josens G** (1971) Le renouvellement des meules à champignons construites par quatre Macrotermitinae (Isoptères) des savanes de Lamto-Pacobo (Côte d'Ivoire). *C R Hebd Seances Acad. Sci. Ser. D.* 272: 3329-3332.
- **Jouquet P, Dauber J, Lagerlöf J, Lavelle P & Lepage M** (2006) Soil invertebrates as ecosystem engineers: intended and accidental effects on soil and feedback loops. *Applied Soil Ecology* 32 (2): 153-164.
- **Jouquet P, Ranjard L, Lepage M & Lata JC** (2005) Incidence of fungus-growing termites (Isoptera, Macrotermitinae) on the structure of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 37(10): 1852-1859.
- **Kaeberlein T, Lewis K & Epstein SS** (2002) Isolating 'uncultivable' microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* 296: 1127-1129.
- **Kanayama N, Suzuki T & Kawai K** (2002) Purification and characterization of an alkaline manganese peroxidase from *Aspergillus terreus* LD-1. *J. Biosci. Bioeng.* 93: 405-410.
- **Kästner M** (2000) Humification Process of Formation of Refractory Soil Organic Matter. In J. Klein (ed) *Environmental Processes II*, Vol. 11b, 2nd Edition Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 89-125.
- **Katapodis P, Christakopoulou V, Kekos D & Christakopoulos P** (2007). Optimization of xylanase production by *Chaetomium thermophilum* in wheat straw using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 35: 136-141.
- **Katoh H, Miura T, Maekawa K, Shinzato N & Matsumoto T** (2002) Genetic variation of symbiotic fungi cultivated by the Macrotermitinae termite *Odontotermes formosamus* (Isoptera: Termitidae) in the Ryukyu Archipelago. *Molecular Ecology* 11: 1565-1572.
- **Kawecki D, Swoboda-Kopec E, Dabkowska M, Stelmach E, Wroblewska, Krawczyk M, Blachnio S & Luczak M** (2006) Enzymatic variability of *Candida krusei* isolates in a course of fungal infection in a liver transplant recipient. *Transplantation Proceedings* 38: 250-252.

- **Keddy PA** (1989) Competition. Population and Community Biology Series. Chapman & Hall, 202 p.
- **Kent AD & Triplett EW** (2002) Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems, *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 211–236.
- **Khan ZU, Chugh TD, Chandy R, Provost F & Boiron P** (1998) A study of the enzymatic profile of soil isolates off *Nocardia asteroides*. *Mycopathologia.* 143(3):151-154.
- **Kirk K & Farrell RL** (1987) Enzymatic 'combustion': the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 465–505.
- **Kluczek-Turpeinen B, Maijala P, Hofrichter M & Hatakka A** (2007) Degradation and enzymatic activities of three *Paecilomyces inflatus* strains grown on diverse lignocellulosic substrates. *International Biodeterioration and Biodegradation* 59(4): 283-291.
- **Kogel-Knabner I** (2002) The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 139-162.
- **König H, Fröhlich J & Hertel H** (2006) Diversity and lignocellulolytic activities of cultured microorganisms. In *Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates*. Koenig H (ed). Heidelberg, Berlin: Springer Verlag, pp. 271-301.
- **Konopka A, Olivier L & Turco RFJ** (1998) The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology *Microbial Ecology* 35: 103-115.
- **Kuhad RC, Singh A & Eriksson KE** (1997) Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In: *Advances in biochemical engineering biotechnology*. Eriksson K-EL (ed.) vol. 57. Springer-Verlag, Germany, pp: 46–125.
- **Kumari R, Sachdev M, Prasad R, Garg AP, Sharma S, Giang PH & Varma A** (2006) Microbiology of termite hill (mound) and soil. In: *intestinal microorganisms of soil invertebrates*. König H & Varma A (eds), Springer-Verlag, Berlin, pp. 351-371.
- **Kuske CR, Ticknor LO, Miller ME, Dunbar J, Davis JA, Barns SM & Belnap J** (2002) Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Applied and Environmental Microbiology* 68(4): 1854-1863.
- **Lamberty M, Ades S, Uttenweiler-Joseph S, Brookhart G, Bushey D, Hoffmann JA & Bulet P** (1997) Insect immunity. Isolation from the lepidopteran *Heliothis virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity, *J. Biol. Chem.* 274: 9320–9326.
- **Lamberty M, Zachary D, Lanot R, Bordereau C, Robert A, Hoffmann JA & Bulet P** (2001) Solution structures of the antifungal heliomycin and a selected variant with both antibacterial and antifungal activities. *Biochemistry* 40: 11995–12003.
- **Larena, I, Salazar O, Gonzalez V, Julian M & Rubio V** (1999) Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhance specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology* 75: 187-194.

- **Lavelle P, Bignell DE, Lepage M, Wolters V, Roger P, Ineson P, Heal W & Dillion S** (1997) Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. *European Journal of Soil Biology* 33: 159-193.
- **Lavelle P & Spain AV** (2001) *Soil Ecology*. Kluwer Academic Publishers. 654 pp.
- **Lee DH, Zo YG & Kim SJ** (1996) Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacteria communities by PCR single-strand conformation polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology* 62(9): 3112-3120.
- **Lee KE & Wood TG** (1971) *Termites and soils*. Academic press, New York and London.
- **Lee JS, Ko KS & Jung HS** (2000) Phylogenetic analysis of *Xylaria* based on nuclear ribosomal ITS-5.8S-ITS2 sequences. *FEMS Microbiology Letters* 187: 89-93.
- **Lee KH, Shin SY, Hong JE, Yang ST, Kim JI, Hahm K-S & Kim Y** (2003) Solution structure of termite-derived antimicrobial peptide, spinigerin, as determined in SDS micelle by NMR spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 309: 591-597.
- **Liers C, Ullrich R, Steffen KT, Hatakka A & Hofrichter M** (2006) Mineralization of ¹⁴C-labelled lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 573-579.
- **Lin E-S, Wang C-C & Sung S-C** (2006) Cultivating conditions influence lipase production by the edible basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 98-102.
- **Little AEF, Murakami T, Mueller UG & Currie CR** (2006) Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. *Biology Letters* 2: 12-16.
- **Liu WT, Marsh TL, Cheng H & Forney LJ** (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4516-4522.
- **Lockwood JL** (1988) Evolution of concepts associated with soilborne plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 26: 93-121.
- **Lopez MJ, Vargas-Garcia MC, Suarez-Estrella F, Nichols NN, Dien BS & Moreno J** (2007) Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: application for a lignocellulosic substrate treatment. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 794-800.
- **Lozupone C & Knight R** (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 71: 8228-8235.
- **Lumsden RD, Carter JP, Whipps JM & Lynch JM** (1990) Comparison of biomass and viable measurements in the antagonism of *Trichoderma harzianum* against *Pytium ultimum*. *Soil Biol. Biochem* 22: 187-194.
- **Mac Ilvain TC** (1921) A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* 49: 183-188.
- **Marshall SH & Arenas G** (2003) Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 6(3)
- **Martin MM & Martin JS** (1977) Cellulose digestion in the midgut of the fungus-growing termite *Macrotermes natalensis*: the role of acquired digestive enzymes. *Science* 199: 1453-1455.

- **Martin MM & Martin JS** (1978) The distribution and origins of the cellulolytic enzymes of the higher termite *Macrotermes natalensis*. *Physiological Zoology*, 52: 11-21.
- **Masoko P, Picard J & Eloff JN** (2007) The antifungal activity of twenty-four southern African Combretum species (Combretaceae). *South African Journal of Botany* 73: 173-183.
- **Matoub M & Rouland C** (1995) Purification and properties of the xylanases from the termite *Macrotermes bellicosus* and its symbiotic fungus *Termitomyces sp.* *Comparative Biochemistry Physiology* 112 B (4): 629-635.
- **McLaughlin RJ, Wisniewski ME, Wilson CL & Chalutz E** (1990) Effects of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* spp. *Phytopathology* 80: 456-461.
- **Michaelsen A, Pinzari F, Ripka K, Lubitz W & Pinar G** (2006) Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonising paper material. *International Biodeterioration and Biodegradation* 58: 133-141.
- **Mora P & Lattaud C** (1999) Screening of termite species for enzymes involved in lignin degradation: role of symbiotic fungus. *Insect Sci. Appl.* 19: 51-55.
- **Mora P, Lattaud C & Rouland C** (1998) Recherche d'enzymes intervenant dans la degradation de la lignine chez plusieurs espèces de termites à regime alimentaire different. *Actes des Colloques UIEIS* 11: 77-80.
- **Mora P & Rouland C** (1994) Comparison of hydrolytic enzymes produced during growth on carbohydrate substrates by *Termitomyces* associates of *Pseudacanthohermes spiniger* and *Microtermes subhyalinus* (Isoptera: Termitidae). *Sociobiology* 26(1): 39-53.
- **Morakotkarn D, Kawasaki H & Seki T** (2007) Molecular diversity of bamboo-associated fungi from Japan. *FEMS Microbiology Letters* 266 (1): 10-19.
- **Moriya S, Inoue T, Ohkuma M, Yaovapa T, Johjima T, Suwanarit P, Sangwanit U, Vongkaluang C, Noparatnaraporn N & Kudo T** (2005) Fungal community analysis of fungus gardens in termite nests. *Microb. Environ.* 20: 243-252.
- **Mueller UG & Gerardo N** (2002) Fungus-farming insects: multiple origins and diverse evolutionary histories. *PNAS* 29(24): 15247-15249.
- **Muyzer G & Ramsing NB** (1995) Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Wat. Sci. Tech.* 32: 1-9.
- **Muyzer G & Smalla K** (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- **Muyzer G, de Waal EC & Uitterlinden AG** (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- **Nalepa CA (1994)** Nourishment and the origin of termite eusociality. In: *Nourishment and Evolution in Insect Societies*. Hunt JH & Nalepa CA (eds). Boulder, Westview Press, pp. 57-104.
- **Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara & Renella G** (2003) Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54: 655-670.

- **Nelson N** (1944) A photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153: 375-380.
- **Nichols D** (2007) Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiol. Ecol* 60: 351-357.
- **Niranjane AP, Madhou P & Stevenson TW** (2007) The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantean*. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 1464-1468.
- **Nübel U, Engelen B, Felske A, Snaidr J, Wieshuber A, Amann RI, Ludwig W & Backhaus H** (1996) Sequences heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. bacterial.* 178:5636-5643.
- **Ohkuma M, Maeda Y, Johjima T & Kudo T** (2001) Lignin degradation and roles of white rot fungi: study on an efficient symbiotic system in fungus-growing termites and its application to bioremediation. *RIKEN Review No.* 42: 39-42.
- **Okane I & Nakagiri A** (2007) Taxonomy of an anamorphic xylariaceous fungus from a termite nest found together with *Xylaria angulosa*. *Mycoscience* 48: 240-249.
- **Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K & Sekiya T** (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *PNAS* 86: 2766-2770.
- **Oros-Sichler M, Gomes NCM, Neuber G & Smalla K** (2006) A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. *Journal of Microbiological Methods* 65: 63-75.
- **Palonen H, Saloheimo M, Viikari L & Kruus K** (2003) Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella sp.* *Enzyme Microb. Technol.* 33: 854-862.
- **Paul EA & Clark FE** (1996) *Soil Microbiology and Biochemistry*, 2nd edition. Academic Press, San Diego, 340p.
- **Pelaez F, Martinez MJ & Martinez AT** (1995) Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycological research* 99: 37-42.
- **Petersson S & Schnurer J** (1995) Biocontrol of Mold Growth in High-Moisture Wheat Stored under Airtight Conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 61(3):1027-1032.
- **Petrini O** (1991) Fungal endophytes of tree leaves. In: *Microbial Ecology of Leaves*. Andrews JH & Hirano SS (eds), Springer-Verlag, New York, pp. 179-197.
- **Pointing SB, Pelling AL, Smith GJD, Hyde KD & Reddy CA** (2005) Screening of basidiomycetes and xylariaceous fungi for lignin peroxidase and laccase genespecific sequences. *Mycol. Res.* 109: 115-124.
- **Porteus LA, Seidler RJ & Watrud LS** (1997) An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Mol. Ecol.* 6: 787-791.
- **Prabhu KA & Maheshwari R** (1999) Biochemical properties of xylanases from a thermophilic fungus, *Melanocarpus albomyces* and their action on plant cell walls. *J Biosci* 24: 461-470.

- **Preston-Mafham J, Boddy L & Randerson PF** (2002) Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles: A critique. *FEMS Microbiol Ecol* 42: 1–14.
- **R Development Core Team** (2007) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- **Rajagopal S, Rao DR & Varma AK** (1979) Association of fungi in the termite gut. *Curr Sci* 48: 998-999.
- **Ranjard L, Poly F, Combrisson J, Richaume A, Gourbiere F, Thioulouse J & Nazaret S** (2000) Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microb. Ecol.* 39: 263–272.
- **Reynolds HT & Currie CR** (2004) Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: the parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. *Mycologia* 96(5): 955-959.
- **Reysenbach AL, Giver LJ, Wickham GS & Pace NR** (1992) Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3417-3418.
- **Ritz K** (2007) The Plate Debate: Cultivable communities have no utility in contemporary environmental microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 60: 358-362.
- **Rodrigues A, Bacci Jr FC, Mueller UG, Ortiz A & Pagnocca M** (2008) Microfungal 'weeds' in the leafcutter ant symbiosis. *Microbial Ecology* DOI 10.1007/s00248-008-9380-0.
- **Rodrigues A, Pagnocca FC, Bacci Jr M, Hebling MJA, Bueno OC & Pfenning LH** (2005) Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. *Folia microbiology* 50(5): 421-425.
- **Rodrigues A, Pagnocca FC, Bueno OC, Pfenning LH & Bacci Jr M** (2005) Assessment of microfungi in fungus gardens free of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 46(2): 1-7.
- **Rodrigues KF & Samuels G** (1990) Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. *Mycological Research* 94: 827–830.
- **Rodrigues, KF & Petrini O** (1997). Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. In: Hyde, K.D. (Ed.), *Diversity of Tropical Microfungi*. University of Hong Kong Press, Hong Kong, pp. 57–69.
- **Rogers J** (1979) The Xylariaceae: Systematic, biological and evolutionary aspects. *Mycologia* 71: 1-41.
- **Rogers J & Samuels G** (1986) Ascomycetes of New Zealand 8. *Xylaria*. *New Zealand Journal of Botany*, 24: 615-650.
- **Rogers JD, Ju Y-M & Lehmann J** (2005) Some *Xylaria* on termite nests. *Mycologia* 97(4): 914-923.
- **Rohrmann GF** (1978) The origin, structure, and nutritional importance of the comb in two species of Macrotermitinae (Insecta, Isoptera). *Pedobiologia* 18: 89–98.
- **Rohrmann GF & Rossman AY** (1980) Nutrient strategies of *Macrotermes ukuzii* (Isoptera: Termitidae). *Pedobiologia* 20: 61–73.

- **Roose-Amsaleg CL, Garnier-Sillam E & Harry M** (2001) Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology* 18: 47-60.
- **Rouland C, Civas A, Renoux J & Petek F** (1988a) Purification and properties of cellulases from the termite *Macrotermes mülleri* (Termitidae, Macrotermitinae) and its symbiotic fungus *Termitomyces sp.* *Comparative Biochemistry and Physiology* 91B: 449-458.
- **Rouland C, Civas A, Renoux J & Petek F** (1988b) Synergistic activities of the enzymes involved in cellulose degradation, purified from *Macrotermes mülleri* and from its symbiotic fungus *Termitomyces sp.* *Comparative Biochemistry and Physiology*, 91B: 459 -465.
- **Rouland C, Lenoir F & Lepage M** (1991) The role of the symbiotic fungus in the digestive metabolism of several species of fungus-growing termite. *Comparative Biochemistry and Physiology* 99A: 657-663.
- **Rouland C, Lepage M, Chotte J-L, Ndiaye D, Ndiaye S, Seugé C & Brauman A** (2003) Experimental manipulation of termites (Isoptera, Macrotermitinae) foraging patterns in Sahelo-Sudanese savanna: effect of litter quality. *Insectes Sociaux* 50(4): 309-316.
- **Rouland-Lefevre C** (2000) Symbiosis with fungi. In: *Termites: Evolution, sociability, symbiosis and ecology*. Abe T, Bignell DE & Higashi M (eds.) Kluwer Acad. Publ. pp. 289-306.
- **Rouland-Lefevre C & Bignell DE** (2001) Cultivation of symbiotic fungi by termites of the subfamily Macrotermitinae. In: *Symbiosis: Mechanisms and model systems*. Seckbach J (ed), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 731-756.
- **Rouland-Lefevre C, Diouf MN, Brauman A & Neyra M** (2002) Phylogenetic relationships in *Termitomyces* (Family Agaricaceae) based on the nucleotide sequence of ITS: a first approach to elucidate the evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing termites and their fungi. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 423-429.
- **Rouland-Lefèvre C, Inoue T & Johjima T** (2006) *Termitomyces*/Termite interactions. In: *Intestinal microorganisms of soil invertebrates*. König H & Varma A (eds.), Springer Verlag. pp: 335-350.
- **Sachan A, Ghosh, S & Mitra A** (2006) Biotransformation of p-coumaric acid by *Paecilomyces variotii*. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 35-41.
- **Saitou N & Nei M** (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- **Sandhu GS, Kline BC, Stockman L & Roberts GD** (1995) Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2913-2919.
- **Sands WA** (1969) The association of termites and fungi. In: *Biology of termites*. Krishna K & Weesner FM (eds.). Vol.1, ch. 16. New York: Academic Press. pp 495-524.
- **Santos AV, Dillon RJ, Reynolds SR & Samuels RI** (2004) Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia sp.* in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *FEMS Microbiology Letters* 239: 319-323.
- **Santos A, Marquina D, Leal JA & Peinado JM** (2000) (1,6)-b-D-glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1809-1813.

- **Schering A, Kanigan T, Hartke Quiett T, Lewis K & Epstein SS** (2006) New platform technology for high-throughput cultivation of novel microorganisms. In 11th International Symposium on Microbial Ecology, Vienna.
- **Schwieger F & Tebbe CC** (1998) A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 64(12): 4870-4876.
- **Sekiguchi H, Tomioka N, Nakahara T & Uchiyama H** (2001) A single band does not always represent single bacterial strain in denaturing gradient gel electrophoresis. *Biotechnol Lett* 23: 1205-1208.
- **Shah M, Reddy GV, Banerjee R, Babu PR & Kothari IL** (2005) Microbial degradation of banana waste under solid state bioprocessing using two lignocellulolytic fungi (*Phylosticta spp.* MPS-001 and *Aspergillus spp.* MPS-002). *Proc. Biochem.* 40: 445-451.
- **Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS & Myers RM** (1989) Attachment of a 40-base-pair G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *PNAS* 86(1): 232-236.
- **Shinzato N, Muramatsu M, Watanabe Y & Matsu T** (2005) Termite-regulated fungal monoculture in fungus combs of a Macrotermitinae termite *Odontotermes formosanus*. *Zoological Science* 22(8): 917-922.
- **Siddiqui ZA & Mahmood I** (1996) Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: a review. *Bioresource Technol.* 58: 229-239.
- **Silva A, Rodrigues A, Bacci Jr M, Pagnocca FC & Bueno OC** (2006) Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: basidiomycota) towards microfungi. *Mycopathologia* 162: 115-119.
- **Slinkard K & Singleton VL** (1977) Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28: 49-55.
- **Smalla K, Wachtendorf U, Heuer H, Liu W-T & Forney L** (1998) Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1220-1225.
- **Somogyi M (1945)** Determination of blood sugar. *J. Biol. Chem.* 160: 61-68.
- **Sreerama L & Veerabhadrapa PS** (1993) Isolation and properties of carboxylesterases of the termite gut-associated fungus *Xylaria nigripes* K. and the identity from the host termite, *Odontotermes horni* W. mid-gut carboxylesterases. *Internat. J. Biochem.* 25: 1637-1651.
- **Stephen JR, Chang Y-J, Macnaughton SJ, Kowalchuk GA, Leung KT, Flemming CA & White DC** (1999) Effect of toxic metals on indigenous soil β -subgroup proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 95-101.
- **Stevenson B, Eichorst S, Wertz J, Schmidt T & Breznak J** (2004) New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl Environ Microbiol* 70: 4748-4755.
- **Stevenson L** (1994) *Humus chemistry: genesis, composition, reactions* (second ed.), Wiley, New York, USA.
- **Su NY** (2002) Current and future trends of termite management. *Sociobiology* 40: 1-2.

- **Swofford DL** (1993) PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1.1. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- **Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24(8): 1596-1599.
- **Taprab Y, Johjima T, Maeda Y, Moriya S, Trakulnaleamsai S, Noparatnaraporn N, Ohkuma M & Kudo T** (2005) Symbiotic fungi produce laccases potentially involved in phenol degradation in fungus comb of fungus-growing termites in Thailand. *Applied and Environmental Microbiology*. 7696-7704.
- **Tetsch L, Bend J, Janssen M & Hölker U** (2005) Evidence for functional laccases in the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila* and isolation of laccase-specific gene fragments. *FEMS Microbiol. Lett.* 245: 161–168.
- **Thomas RJ** (1987a) Distribution of *Termitomyces* and other fungi in the nests and major workers of several Nigerian Macrotermitinae. *Soil Biology and Biochemistry* 19 (3): 335-341.
- **Thomas RJ** (1987b) Factors affecting the distribution and activity of fungi in the nests of Macrotermitinae (Isoptera). *Soil Biol. Biochem.* 19 (3): 343-349.
- **Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG** (1997) The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.
- **Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ** (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acid Res* 22: 4673-4680.
- **Tiquia SM** (2002) Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting. *Journal of Applied Microbiology* 92(4): 764-775.
- **Treusch AH & Schleper C** (2006) The microbial soil flora: novel approaches for accessing the phylogenetic and physiological diversity of prokaryotes. In: *Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates*. König H & Varma A (eds), Springer, 483p.
- **Urzi C, De Leo F, Donato P & La Cono V** (2003) Multiple approach to study the structure and diversity of microbial communities colonizing artistic surfaces. Study case: the Roman catacombs of St. Callistus and Domitilla. In: Saiz-Jimenez C (ed). *Molecular Biology and Cultural Heritage*, Balkema AA Publishers, Lisse, pp. 187–193.
- **Vane CH, Drage TC, Snape CE, Stephenson MH & Foster C** (2005) Decay of cultivated apricot wood (*Prunus armeniaca*) by the ascomycete *Hypocrea sulphurea*, using solid state ¹³C NMR and off-line TMAH thermochemolysis with GC-MS. *Inter. Biodeter. Biodegrad.* 55: 175–185.
- **Vanechoutte M** (1996) DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. *Mol. Biotechnol.* 6: 115-142.
- **Vanio EJI & Hantula J** (2000) Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological Research* 104: 927-936.
- **Veivers PC, Mühlemann R, Slaytor M, Leuthold RH & Bignell DE** (1991) Digestion, diet and polyethism in two fungus-growing termites: *Macrotermes subhyalinus* Rambur and *M. michaelseni* Sjøstedt. *Journal of Insect Physiology*, 37: 675–682.

- **Walker LP & Wilson DB** (1991) Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview. *Bioresource Technology* 36(1): 3-14.
- **Ward N** (2006) New directions and interactions in metagenomics research. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55: 331-338.
- **Wartell RM, Hosseini S, Powell S & Zhu J** (1998) Detecting single base substitutions, mismatches and bulges in DNA by temperature gradient gel electrophoresis and related methods. *Journal of chromatography A806*: 169-185.
- **Whalley AJS** (1996) The xylariaceous way of life. *Mycol. Res.* 100: 897-922.
- **Wheatley R, Hackett C, Bruce A & Kundzewicz A** (1997) Effect of substrate composition on production of volatile organic compounds from *Trichoderma spp.* inhibitory to wood decay fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation* 39: 199-205.
- **Whipps JM & Lumsden RD** (1991) Biological control of *Pythium* species. *Biocontrol Science and Technology* 1: 75-90.
- **White TJ, Burns T, Lee S & Taylor J** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols. Innes MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ (eds.), Academic Press, San Diego, Calif. pp. 315-322.
- **Widden P** (1997) Competition and the fungal community. In: Environmental and Microbial Relationships: The mycota IV. Wicklow DT & Söderström B (eds), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, pp. 135-147.
- **Williams JH, Villaroya and Petek M** (1978) The β -galactosidase II, III and IV from seeds of *Trifolium repens*. *Biochem. J.* 175: 1069-1077.
- **Wilson IG** (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied Environmental Microbiology* 63(10): 3741-3751.
- **Winiewski M, Biles C, Droby S, McLaughlin R, Wilson C & Chalutz E** (1991) Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*: I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39: 245-258.
- **Wood TG & Sands WA** (1978) The role of termites in ecosystems. In: Production ecology of ants and termites. Brian MV (ed), pp 245-292. Cambridge Univ Press, Cambridge.
- **Wood TG & Thomas RJ** (1989) The mutualistic association between Macrotermitinae and *Termitomyces*. In: Wilding N, Collins NM, Hammond PM & Webber JF (eds) Insect-fungus Interaction, Academic Press, London, pp. 69-92.
- **Xu F** (2005) Application of oxidoreductases: recent progress. *Industrial Biotechnology* 1: 38-50.
- **Zhao J & Janse BJH** (1996) Comparison of H₂O₂-producing enzymes in selected white-rot fungi. *FEMS Microbiology Letters* 139: 215-221.
- **Zhao J, De Koker TH & Janse BJH** (1995) First report of the white rotting fungus *Phanerochaete chrysosporium* in South Africa. *South Africa Journal of Botany* 61: 167-168.
- **Zhao Y, Tu K, Shao X, Jing W & Su Z** (2008) Effect of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* doi:10.1016/j.postharvbio.2008.01.001.

Liste des manuscrits rédigés

I. **Guedegbe HJ, Houngnandan P, Roman J & Rouland-Lefèvre C** (2008) Patterns of substrate degradation by some microfungi from fungus-growing termite combs (Isoptera, Termitidae : Macrotermitinae). *Sociobiology* 52 (3): 1-17.

II. **Guedegbe HJ, Miambi E, Houngnandan P, Pando A & Rouland-Lefèvre C** Molecular diversity and host-specificity of termite-associated *Xylaria* based on rDNA ITS sequences. (soumis à *Mycologia*)

III. **Guedegbe HJ, Houngnandan P & Rouland-Lefèvre C** Microfungal variability and Fungal DGGE Profiling of Fungus-growing termite (Termitidae, subfamily Macrotermitinae) Combs. (Soumission en cours à *Microbial Ecology*).

IV. **Guedegbe HJ, Miambi E, Houngnandan P & Rouland-Lefèvre C** The use of Suicide Polymerase Endonuclease Restriction (SuPER) to Reveal Non-*Termitomyces* Fungal Community in Fungus Comb (Soumission en cours à *Ecological Entomology*).

Résumé

La diversité fongique des meules de plusieurs espèces de Macrotermitinae a été analysée au niveau taxinomique, fonctionnel et génétique à l'aide d'une approche polyphasique associant plusieurs techniques complémentaires. L'objectif étant d'évaluer la spécificité des taxons fongiques associés aux meules ainsi que les relations qu'ils entretiennent avec les termites champignonnistes. Une grande variété de phylotypes cultivables appartenant majoritairement au phylum des Ascomycètes a été obtenue par isolement et séquençage des ITS fongiques, et peu de séquences se sont révélées être spécifiques à un genre de Macrotermitinae particulier. Les profils physiologiques obtenus ont mis en évidence la nature saprophytique de la majorité des phylotypes et confirmé l'absence de taxons spécifiques. Par PCR-DGGE de l'ADN total de meules, 100% des phylotypes ITS et 28S fongiques identifiés étaient affiliés au genre *Termitomyces*. La technique Suicide Polymerase Endonuclease Restriction (SuPER) a été adaptée à la mycoflore des meules pour limiter l'impact de l'ADN majoritaire du *Termitomyces* symbiotique. Celle-ci a permis la détection de plusieurs autres populations fongiques. Les analyses phylogénétiques ont montré d'une part la spécificité des *Xylaria* associés aux meules de Macrotermitinae bien qu'aucune co-évolution n'ait été observée avec les termites hôtes et d'autre part leur affiliation dans un sous-genre spécifique. Une analyse préliminaire des facteurs d'inhibition a également révélé l'implication des termites dans la régulation des communautés fongiques des meules. Dans leur ensemble, nos résultats illustrent clairement l'influence des Macrotermitinae sur les communautés fongiques telluriques pendant leurs différentes activités.

Mots clés: Termites champignonnistes, Meules, Diversité fongique, *Xylaria*, *Termitomyces*, ITS, 28S, DGGE, SUPER, API ZYM, Phylogénie, Ascomycètes, Activités enzymatiques, Phylotypes.

Abstract

Fungal diversity of several Macrotermitinae fungus combs was analyzed at taxonomic, functional and genetic levels using a polyphasic approach. The aim of this thesis was to evaluate the specificity of fungal strains from combs and to elucidate their relationship with fungus-growing termites. A large variety of culturable phylotypes mainly belonging to Ascomycota phylum was retrieved using conventional isolation techniques followed by sequencing of ITS1-5.8S-ITS2 region. Based on the obtained results, there is evidence for any species-specificity between these taxa and a given genus of Macrotermitinae. This finding was supported by the physiological profile of some representative phylotypes which revealed the saprophytic nature of most of the isolates. By PCR-DGGE analysis of fungal ITS and LSU, all of the sequences were belonged to *Termitomyces* genus. The Suicide Polymerase Endonuclease Restriction method was adapted to the analysis of comb mycoflora for restricting the impact of the dominant *Termitomyces* DNA. As expected, this latter technique revealed non-*Termitomyces* fungal populations. Phylogenetic analysis also showed the specificity of termite-associated *Xylaria* although they do not evolved with termite hosts, and also their affiliation to a new genus or at least a specific sub-genus. Preliminary investigation revealed the implication of termite workers in fungal regulation in fungus combs. All in one, our results clearly underline the great impact of fungus-growing termite species on soil fungal community during their activities.

Keywords: Fungus-growing termites, Fungus combs, Fungal diversity, *Xylaria*, *Termitomyces*, ITS, 28S, DGGE, SUPER, API ZYM, Phylogeny, Ascomycota, Enzymatic activities, Phylotypes.