



HAL
open science

Quelques aspects (anatomie et enzymologie) des relations nutritionnelles entre la fourmi attine *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera - Formicidae) et son champignon symbiotique

Gérard Febvay

► **To cite this version:**

Gérard Febvay. Quelques aspects (anatomie et enzymologie) des relations nutritionnelles entre la fourmi attine *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera - Formicidae) et son champignon symbiotique. Biochimie [q-bio.BM]. INSA de Lyon; Université Claude Bernard - Lyon I; Ecole Centrale de Lyon, 1981. Français. NNT: . tel-00616986

HAL Id: tel-00616986

<https://theses.hal.science/tel-00616986>

Submitted on 25 Aug 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

présentée devant

L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

L'Université Claude BERNARD Lyon I

L'École Centrale de Lyon

pour obtenir

LE Diplôme de Docteur-Ingénieur
(Biologie cellulaire - Biologie Appliquée)

par

Gérard FEBVAY

(Ingénieur Biochimiste I. N. S. A.)

**QUELQUES ASPECTS (ANATOMIE ET ENZYMOLOGIE) DES RELATIONS NUTRITIONNELLES
ENTRE LA FOURMI ATTINE *ACROMYRMEX OCTOSPINOSUS*
(*HYMENOPTERA-FORMICIDAE*) ET SON CHAMPIGNON SYMBIOTIQUE**

Soutenu le 4 Septembre 1981 devant la Commission d'Examen :

Jury : MM. A. GUYARD
A. KERMARREC
P. LAVIOLETTE
P. NARDON
E. SALMON-LEGAGNEUR

- UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I -

Président honoraire : M. le Pr J. BOIDIN

Président : M. le Pr L. DAVID

Premier Vice-Président : M. le Pr R. MORNEX

Deuxième Vice-Président : Mme A. VARAGNAT, M.A.

Troisième Vice-Président : M. DUGNAT, Etudiant

Secrétaire Général de l'Université : M. F. MARIANI

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE (U.E.R.)

U.E.R. de Médecine GRANGE-BLANCHE : M. le Pr Paul ZECH
U.E.R. de Médecine ALEXIS-CARREL : M. le Pr René MORNEX
U.E.R. de Médecine LYON-NORD : M. Yves MINAIRE, M.C.A.
U.E.R. de Médecine LYON-SUD : M. le Pr Jean NORMAND
U.E.R. Faculté de Pharmacie : M. le Pr C.A. BIZOLLON
U.E.R. de Techniques de Réadaptation : M. le Pr Alain MORGON
U.E.R. de Biologie Humaine : M. Jean-Pierre REVILLARD, M.C.A.
U.E.R. E.P.S. : M. Albert MILLON, Pr d'E.P.S.
U.E.R. Faculté d'Odontologie de Lyon : M. le Pr Jean PARRET
U.E.R. de Mathématiques : M. le Pr Maurice FLAMANT
U.E.R. de Physique : M. le Pr Jean DELMAU
U.E.R. de Chimie et Biochimie : Madame Annick VARAGNAT, M.A.
U.E.R. des Sciences de la Nature : M. le Pr Yves LEMOIGNE
U.E.R. de Sciences Physiologique : M. le Pr J.F. WORBE
U.E.R. de Physique Nucléaire : M. le Pr Mark GUSAKOW
I.U.T. I : M. le Pr Albert VILLE
I.U.T. II : M. J. GALLET, Directeur ENSAM
Observatoire de Lyon : M. G. MONNET, Astronome titulaire
U.E.R. de Mécanique : M. le Pr G. COMTE-BELLOT

INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

Directeur : R. HAMELIN

Chefs de Départements :

1er Cycle	: C. GUILLAUD Professeur
Biochimie	: L. CRONENBERGER Professeur
Génie Civil et Urbanisme	: H.. BOTTA, Professeur
Génie Electrique	: H. KLEIMANN Professeur
Génie Energétique	: B. CLAUDEL Professeur
Génie Mécanique Construction	: M. THEOLIER, Professeur
Génie Mécanique Développement	: M. GODET, Professeur
Génie Physique Matériaux	: J. GOLE, Professeur
Informatique	: R. ARNAL Professeur

Professeurs :

R. ARNAL	: Informatique Appliquée
J. BAHUAUD	: Mécanique des Solides
D. BERTHE	: Mécanique des Contacts
M. BOIVIN	: Mécanique des Solides
H. BOTTA	: Génie Civil et Urbanisme (Méthodes)
J. BOUSQUET	: Thermo-Chimie Minérale
E. BRARD	: Physiologie et Pharmacodynamie
M. CHEVRETON	: Etude des Matériaux
B. CLAUDEL	: Cinétique et Génie Chimiques
L. CRONENBERGER	: Chimie Biologique
J.C. CUBAUD	: Génie Civil et Urbanisme (Bétons et Structures)
L. EYRAUD	: Génie Electrique et Ferroélectricité
G. FANTOZZI	: Gr. étude Métall. Phys. et Phys. des Matériaux
J. FAVREL	: Informatique Appliquée
Y. FETIVEAU	: Génie Electrique et Ferroélectricité
J. FRENE	: Mécanique des Contacts
R. GELIN	: Chimie Organique
S. GELIN	: Chimie Organique
M. GERY	: Génie Civil et Urbanisme (Equipped de l'habitat)
J. GIELLY	: Génie Civil et Urbanisme (Géotechnique)
P. GOBIN	: Gr. étude Métall. Phys. et Phys. des Matériaux
M. GODET	: Mécanique des Contacts
J. GOLE	: Matériaux Macromoléculaires
R. GOUTTE	: Optique Corpusculaire et Ultrasons
C. GUILLAUD	: Optique Corpusculaire et Ultrasons
C. GUITTARD	: Electronique Appliquée
J.F. JULLIEN	: Génie Civil et Urbanisme (Bétons et Structures)
H. KLEIMANN	: Génie Electrique et Ferroélectricité
M. LALANNE	: Mécanique des Structures
A. LALEMAND	: Energétique et Automatique
P. LAREAL	: Génie Civil et Urbanisme (Géotechnique)
A. LAUGIER	: Physique de la Matière
P. LAVIOLETTE	: Biologie
M. LEMAIRE	: Génie Civil et Urbanisme (Bétons et Structures)

C. LESUEUR	: Vibrations, Acoustique
Y. MARTINEZ	: Informatique Appliquée
C. MARTY	: Etude des Procédés de Fabrication
N. MONGEREAU	: Génie Civil et Urbanisme (Géotechnique)
G. MONNIER	: Physicochimie Industrielle
H. PACHECO	: Chimie Biologique
G. PERACHON	: Thermo-Chimie minérale
J. PEREZ	: Gr. étude Métall. Phys. et Phys. des Matériaux
E. PERNOUX	: Gr. étude Métall. Phys. et Phys. des Matériaux
M. PEYRON	: Chimie Physique
P. PINARD	: Physique de la Matière Physique Industrielle
P. PREVOT	: Informatique Appliquée
R. REYNAUD	: Energétique et Automatique
M. RICHARD	: Energétique et Automatique
E. RIEUTORD	: Hydraulique et Dynamique des Gaz
J. ROBIN	: Physico-Chimie Industrielle
M. ROLIN	: Physico-Chimie Industrielle
F. STOEBER	: Microbiologie
M. THEOLIER	: Métallurgie et Traitements Thermiques
PH. TROMPETTE	: Mécanique des Structures
J. VERON	: Chimie Appliquée

Maîtres de Recherche C.N.R.S. :

P. CLAUDY	: Thermochimie Minérale
M. MURAT	: Chimie Appliquée

REMERCIEMENTS.

Ce travail a été réalisé grâce à une association entre le Laboratoire de Biologie de l'INSA de Lyon et la Station de Zoologie et Lutte Biologique de l'INRA Antilles-Guyane.

Monsieur le Professeur P. LAVIOLETTE, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a fait l'honneur de présider ce jury, voudra bien accepter ma respectueuse gratitude.

J'exprime ma très amicale reconnaissance à Monsieur A. KERMARREC, instigateur de ce travail, dont l'aide personnelle et les nombreux conseils m'ont été précieux.

Monsieur P. NARDON, qui a suivi cette étude et a accepté d'en discuter les résultats, trouvera ici l'expression de ma reconnaissance.

Je remercie également Messieurs E. SALMON-LEGAGNEUR et A. GUYARD d'avoir bien voulu s'intéresser à ce travail.

Madame ROUSSEAU dont j'ai pu apprécier l'aide technique et le souci d'efficacité recevra mes sincères remerciements.

MM. Jean-Paul TORREGROSSA, Antoine JEAN-BART et Mme Roseline GOTIN, pour leur collaboration amicale, ainsi que toutes les personnes de la Station de Zoologie et Lutte Biologique de l'INRA Antilles-Guyane trouveront également ici l'expression de ma profonde sympathie.

Je ne saurais oublier Mesdames C. NARDON et C. OGIER pour leur aide et tous les membres du Laboratoire de Biologie de l'INSA de Lyon qui accepteront l'expression de ma sincère amitié.

Je remercie particulièrement Mireille BANDOUC pour avoir amicalement accepté de relire et corriger mon manuscrit.

Enfin, je ne saurais terminer sans adresser mes vifs remerciements à Francine KABELA et Nicole EDINVAL qui ont assuré avec une patiente compréhension la dactylographie de cette thèse.

<< Quoique dans l'immense série des êtres, la fourmi ne soit qu'un point qui sans sa mobilité échapperait presque à nos regards, il n'en est pas moins vrai que cet atome animé est digne d'être l'objet de nos méditations. C'est ici qu'il convient de dire que l'Auteur de la nature n'est jamais plus lui-même que dans ce qu'il y a de plus petit >>.

LATREILLE

Histoire Naturelle des Fourmis, 1802

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	1
1. GENERALITES	3
1.1. LES FOURMIS ATTINES	5
1.1.1. Place phylogénique	5
1.1.2. Répartition géographique	5
1.1.3. Estimation des dégâts	7
1.1.4. Méthode de lutte en Guadeloupe	10
1.2. L'ASSOCIATION FOURMI-CHAMPIGNON	12
1.2.1. Le nid et le comportement	12
1.2.2. Le champignon symbiotique	16
1.2.2.1. Morphologie	16
1.2.2.2. Position taxonomique	16
1.2.3. La symbiose Attines - champignon : alliance biochimique	20
1.2.3.1. Introduction	20
1.2.3.2. Apports du champignon à la fourmi	20
1.2.3.3. Apports de la fourmi au champignon	22
1.2.3.4. Maintien d'une culture pure de champignon dans le nid	25
1.2.3.5. Actualisation des connaissances sur le rôle des deux partenaires dans la symbiose	26
1.2.4. Les raisons possibles de la symbiose entre les Attines et leur champignon	29
1.3. CONCLUSION	32
2. MORPHOLOGIE ET FONCTIONNEMENT DU FILTRE INFRABUCCAL CHEZ <i>ACROMYRMEX OCTOS-</i> <i>PINOSUS</i> (REICH). ROLE DE LA POCHE INFRABUCCALE	33
2.1. INTRODUCTION	34
2.2. MATERIEL ET METHODES	36
2.3. RESULTATS ET DISCUSSION	37
2.3.1. Morphologie interne de la cavité buccale	37
2.3.1.1. Le labium	37
2.3.1.2. La poche infrabuccale et le prépharynx	37
2.3.1.3. Le filtre	37
2.3.2. Prise de nourriture et filtration des particules solides	38
2.3.3. Rôle de la poche infrabuccale	47
2.4. CONCLUSION	50

3. ACTIVITES ENZYMATIQUES DES GLANDES SALIVAIRES ET DE L'INTESTIN MOYEN DES ADULTES ET DES LARVES D' <i>ACROMYRMEX OCTOSPINOSUS</i> (REICH)	51
3.1. INTRODUCTION	52
3.2. ANATOMIE DU SYSTEME DIGESTIF	54
3.2.1. L'adulte	54
3.2.2. La larve	56
3.3. ENZYMOLOGIE DES GLANDES SALIVAIRES ET DE L'INTESTIN MOYEN : MATERIEL ET METHODES	67
3.3.1. Principe de la méthode	67
3.3.2. Protocole opératoire	67
3.3.3. Les différents tissus étudiés	69
3.4. RESULTATS ET DISCUSSION	71
3.4.1. Activités enzymatiques révélées chez les adultes	71
3.4.1.1. Les glandes post-pharyngiennes	71
3.4.1.2. Les glandes maxillaires	71
3.4.1.3. Les glandes labiales	73
3.4.1.4. L'estomac	74
3.4.2. Activités enzymatiques révélées chez la larve	75
3.5. CONCLUSION	78
4. ETUDE DU SYSTEME CHITINOLYTIQUE DIGESTIF DES ADULTES D' <i>ACROMYRMEX OCTOSPINOSUS</i> (REICH)	81
4.1. INTRODUCTION	82
4.1.1. Définitions	82
4.1.2. La chitinolyse	84
4.1.3. Focalisation de nos recherches	86
4.2. MATERIEL ET METHODES	87
4.2.1. Préparation du matériel biologique	87
4.2.2. Etudes de l'activité β -N-acétylglucosaminidasique	88
4.2.2.1. Technique histoenzymologique	88
4.2.2.2. Techniques électrophorétiques	88
4.2.2.3. Dosage de la β -N-acétylglucosaminidase	89
4.2.3. Etude de l'activité chitobiasique	90
4.2.3.1. Principe du dosage	90
4.2.3.2. Réaction enzymatique	91
4.2.3.3. Dosage de la N-acétylglucosamine	91
4.2.3.4. Droite étalon	91
4.2.3.5. Technique électrophorétique	92

4.2.4.	Etude de l'activité chitinasique	92
4.2.4.1.	Principe du dosage	92
4.2.4.2.	Réaction enzymatique	93
4.2.4.3.	Dosage de la N-acétylglucosamine	94
4.2.4.4.	Droite étalon	94
4.2.4.5.	Digestion de la chitine du champignon symbiotique	94
4.2.5.	Dosage des protéines	95
4.3.	RESULTATS ET DISCUSSION	96
4.3.1.	Etude de l'activité β -N-acétylglucosaminidasique	96
4.3.1.1.	Localisation histologique	96
4.3.1.2.	Electrophorégrammes, pH_i et estimation du poids moléculaire	96
4.3.1.2.1.	Electrophorèse en gel de PAA homogène	96
4.3.1.2.2.	Electrofocalisation	100
4.3.1.2.3.	Electrophorèse à gradient de polyacrylamide	102
4.3.1.2.4.	Conclusions	102
4.3.1.3.	Caractéristiques de la β -N-acétylglucosaminidase digestive et conditions optimales du dosage	102
4.3.1.3.1.	Concentration en glandes et durée d'incubation	102
4.3.1.3.2.	pH optimum	105
4.3.1.3.3.	Influence de la concentration en substrat, Km de l'enzyme	107
4.3.1.3.4.	Influence de la température	109
4.3.1.3.5.	Conclusions	111
4.3.1.4.	Influence du pH et de la température sur la β -N-acétylglucosaminidase de l'hémolymphe	111
4.3.1.4.1.	Introduction	111
4.3.1.4.2.	Influence du pH	113
4.3.1.4.3.	Influence de la température	113
4.3.1.4.4.	Conclusion	115
4.3.1.5.	Activité de la β -N-acétylglucosaminidase digestive chez <i>Acromyrmex octospinosus</i>	115
4.3.1.5.1.	Comparaison entre les sexués et les ouvrières de différentes tailles	115
4.3.1.5.2.	Influence du jeûne	117
4.3.1.5.3.	Conclusion	118
4.3.2.	Etude de l'activité chitobiasique	118
4.3.2.1.	Existence d'une chitobiasase dans les glandes labiales d' <i>Acromyrmex octospinosus</i>	118
4.3.2.2.	pH optimum	120

4.3.2.3. Effet de la température	120
4.3.2.4. Migration électrophorétique comparée à celle de la β -N-acétylglucosaminidase	120
4.3.2.5. Conclusion	120
4.3.3. Etude de l'activité chitinasique	122
4.3.3.1. Digestion de la chitine par les extraits de glandes labiales d' <i>Acromyrmex octospinosus</i>	122
4.3.3.2. pH optimum et influence du tampon	122
4.3.3.3. Digestion prolongée de la chitine	124
4.3.3.4. Effet de la concentration en chitine	124
4.3.3.5. Effet de la chaleur	126
4.3.3.6. Digestion de la partie insoluble dans l'eau du symbiote d' <i>Acromyrmex octospinosus</i>	126
4.3.3.7. Conclusion	128
4.3.4. Conclusion	129

5. ETUDE DE L'ACTIVITE α -GLUCOSIDASIQUE DES GLANDES LABIALES ET DE L'ESTOMAC D'*ACROMYRMEX OCTOSPINOSUS* (REICH)

5.1. INTRODUCTION	132
5.2. MATERIEL ET METHODES	135
5.2.1. Matériel biologique	135
5.2.2. Etude de l'activité amylasique	135
5.2.2.1. Principe du dosage	135
5.2.2.2. Réaction enzymatique	135
5.2.2.3. Dosage des groupements réducteurs	135
5.2.2.4. Droite étalon	136
5.2.3. Etude de la tréhalase	136
5.2.3.1. Principe du dosage	136
5.2.3.2. Réaction enzymatique	136
5.2.3.3. Dosage du glucose	138
5.2.3.4. Droite étalon	138
5.2.4. Etude de la maltase	139
5.3. RESULTATS ET DISCUSSION	140
5.3.1. Etude de l'activité amylasique	140
5.3.1.1. Réalité d'une activité amylasique dans les glandes labiales	140
5.3.1.2. pH optimum	140
5.3.1.3. Effet de la concentration en ions chlore	140

5.3.1.4.	Influence de la concentration en substrat, Km de l'enzyme	143
5.3.1.5.	Distribution de l'activité amylasique entre glandes salivaires et estomac	143
5.3.1.6.	Influence du jeûne sur l'activité amylasique des glandes labiales	143
5.3.1.7.	Conclusion	146
5.3.2.	Etude de l'activité tréhalasique	146
5.3.2.1.	Digestion du tréhalose dans l'estomac	146
5.3.2.2.	pH optimum	148
5.3.2.3.	Influence de la concentration en tréhalose, Km de l'enzyme	148
5.3.2.4.	Effet de la température	150
5.3.2.5.	Activité de la tréhalase stomacale des ouvrières d' <i>Acromyrmex octospinosus</i>	150
5.3.2.6.	Rapport d'activités de la tréhalase entre les glandes labiales et l'estomac	152
5.3.2.7.	Influence du jeûne	152
5.3.2.8.	Conclusion	153
5.3.3.	Etude de l'activité maltasique	153
5.3.3.1.	Digestion du maltose dans l'estomac	153
5.3.3.2.	pH optimum	155
5.3.3.3.	Influence de la concentration en maltose, Km de l'enzyme	155
5.3.3.4.	Influence de la température	155
5.3.3.5.	Activité de la maltase stomacale des ouvrières d' <i>Acromyrmex octospinosus</i>	155
5.3.3.6.	Rapport d'activités de la maltase entre les glandes labiales et l'estomac	158
5.3.3.7.	Conclusion	158
6.	CONCLUSION GENERALE.....	159
6.1.	CONNAISSANCES ACQUISES PAR CE TRAVAIL	160
6.1.1.	Anatomie	160
6.1.2.	Aspects enzymologiques du tractus digestif	161
6.2.	APPORT NUTRITIONNEL DU CHAMPIGNON ET LA DIGESTION CHEZ <i>ACROMYRMEX OCTOSPINOSUS</i>	164
6.2.1.	Apport nutritionnel du champignon	165
6.2.2.	La digestion chez <i>Acromyrmex octospinosus</i>	165

6.3. QUELQUES PROBLEMES NON RESOLUS	168
6.3.1. Echanges alimentaires dans la colonie d' <i>Acromyrmex octos-</i> <i>pinosus</i>	168
6.3.2. Avantages de l'utilisation d'un champignon par la fourmi	169
6.4. CONSEQUENCES APPLIQUEES : NOUVELLES VOIES POUR UN CONTROLE INTEGRE	169
6.4.1. Définition du problème	169
6.4.2. Les microencapsulés : utilisation et fabrication	169
6.4.3. Application au contrôle d' <i>Acromyrmex octospinosus</i>	170
ANNEXES	173
BIBLIOGRAPHIE	181

INTRODUCTION.

Les Attines ou fourmis champignonnistes sont inféodées strictement au monde néotropical. Les espèces les plus évoluées appartenant aux genres *Atta* et *Acromyrmex* sont, par leur comportement défoliateur, d'importants ravageurs de l'agriculture.

Une seule espèce d'Attine, *Acromyrmex octospinosus* est présente en Guadeloupe. En Guyane française, située dans la sous-région naturelle néo-brésilienne, les genres *Atta* et *Acromyrmex* sont autochtones. La Station de Zoologie et Lutte Biologique du Centre de Recherches Agronomiques des Antilles et de la Guyane (CRAAG) à vocation régionale mais aussi internationale, s'est intéressée dès 1974 à la Lutte contre ces fourmis. Depuis 1978, le programme de recherches sur les Attines est devenu un secteur prioritaire pour cette station.

Seule la lutte chimique à l'aide d'un organochloré est réalisée à l'heure actuelle. Celui-ci, écopolluant, est maintenant interdit de vente aux U.S.A. Récemment KERMARREC⁽¹⁾ a signalé les dangers de pollutions liées à l'utilisation de cet insecticide dans la lutte contre *Acromyrmex octospinosus* en Guadeloupe. Aussi devient-il urgent de mettre en place de nouvelles méthodes de contrôle. Les premières recherches ont révélé que de nombreux compartiments de la Biologie et de la Physiologie de ces fourmis sont encore peu ou pas connus. L'étude approfondie de ceux-ci devenait indispensable afin de déterminer les points faibles de ce ravageur. L'Homme pourrait alors intervenir efficacement.

Sans pour autant délaissier les recherches sur les moyens de lutte, la Station de Zoologie du CRAAG a entrepris des études à caractère plus fondamental. Au sein de ce laboratoire nous avons approfondi certains aspects de la physiologie digestive de l'espèce locale : *Acromyrmex octospinosus*.

Après une synthèse bibliographique des connaissances actuelles sur les fourmis champignonnistes, nos recherches seront exposées en quatre parties, correspondant à la focalisation progressive de nos travaux. La première traitera de la morphologie et du rôle de la poche infrabuccale chez *Acromyrmex octospinosus*. Elle sera suivie des résultats de l'analyse des activités enzymatiques digestives chez les larves et les adultes. Dans les deux dernières parties seront exposées les études de deux systèmes enzymatiques digestifs importants chez cet insecte : les systèmes chitinolytique et amylolytique.

(1) Niveau actuel de la contamination des chaînes biologiques en Guadeloupe : pesticides et métaux lourds. KERMARREC A. (1979-1980), Station de Zoologie et Lutte Biologique - CRAAG - 97170 Petit-Bourg. Ministère de l'Environnement et du Cadre de la Vie. Contrat n° 7883 - Code INRA : 651 339 - 155 pages.

1- GENERALITES.

<< Le premier objet qui frappe nos sens en commençant à étudier les mœurs des fourmis, c'est l'art avec lequel elles construisent leur habitation, dont la grandeur paroît souvent contraster avec leur petitesse ; c'est la variété de ces bâtiments, tantôt fabriqués avec de la terre, tantôt sculptés dans le tronc des arbres les plus durs ; ou composés simplement de feuilles et de brins d'herbe ramassés de toutes parts ; c'est enfin la manière dont ils répondent aux besoins des espèces qui les construisent >>.

P. HUBER

Les Mœurs des Fourmis Indigènes

1810

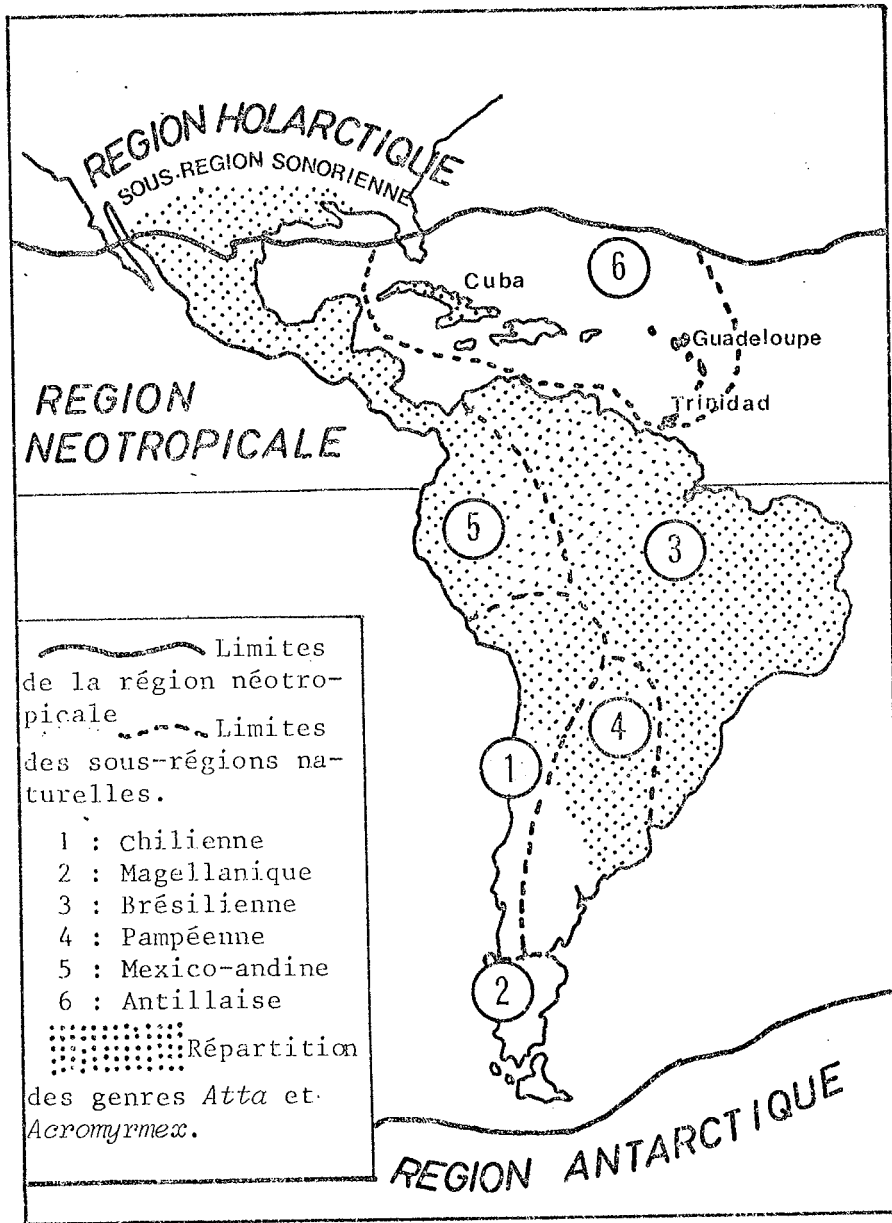


Figure n° 1 : Carte de la région néotropicale (d'après WALLACE) et aire de répartition des *Atta* et *Acromyrmex* (d'après FOREL et WHEELER).

1.1. LES FOURMIS ATTINES

1.1.1. Place phylogénique

Les fourmis appartiennent toutes, dans l'ordre des Hyménoptères, à la superfamille des *Formicoidea* et dans celle-ci à la famille unique des *Formicidae*. La tribu des *Attini*, de la sous-famille des *Myrmicinae*, dériverait selon WILSON et al (1967) du groupe des *Amblyoponini* le plus primitif du complexe ponéroïdien.

Toutes les espèces de cette tribu cultivent un champignon dans leur nid et utilisent celui-ci comme source principale de nourriture. Le substrat sur lequel croît ce champignon varie suivant les genres. Les plus primitifs, *Cyphomyrmex* et *Apterostigma* utilisent les fèces et carcasses d'insectes ainsi que des débris végétaux. Les genres intermédiaires *Sericomyrmex* et *Trachymyrmex* supplémentent les débris collectés avec des feuilles et des fleurs découpées sur des plantes vivantes ; alors que les genres hautement évolués, *Acromyrmex* et *Atta*, fournissent à leur champignon un substrat uniquement végétal grâce à une intense activité de découpe et de récolte de feuilles et de fleurs (WEBER, 1972). L'activité particulière de ces deux derniers genres explique le vocable anglais très souvent rencontré : "leaf-cutting ants".

1.1.2. Répartition géographique

Les fourmis attines ou fourmis champignonnistes apparaissent uniquement dans la zone tropicale et subtropicale des deux Amériques, depuis le Texas et la Louisiane, dans l'Hémisphère Nord, jusqu'à l'Argentine dans l'Hémisphère Sud (fig. 1). La zone insulaire n'est pas épargnée. Diverses îles de l'arc caraïbe sont envahies par une ou plusieurs espèces d'Attines.

Les espèces découpeuses de feuillage (genres *Atta* et *Acromyrmex*), responsables de l'action dévastatrice, sont nombreuses. Certaines sont endémiques, telles *Atta texana* au Texas, *Atta mexicana* au Mexique, *Atta insularis* à Cuba. D'autres sont largement répandues dans la zone de distribution des Attines, telles *Acromyrmex octospinosus*, *Atta senedens*, *Atta cephalotes*. D'une manière générale le genre *Acromyrmex*, dont la capacité d'adaptation au milieu est plus grande, a une zone d'extension plus large en latitude et en altitude que le genre *Atta* (fig. 2).

Les départements français d'Outre-Mer : Guyane, Guadeloupe et Martinique sont situés dans l'aire de répartition géographique des *Attini*.

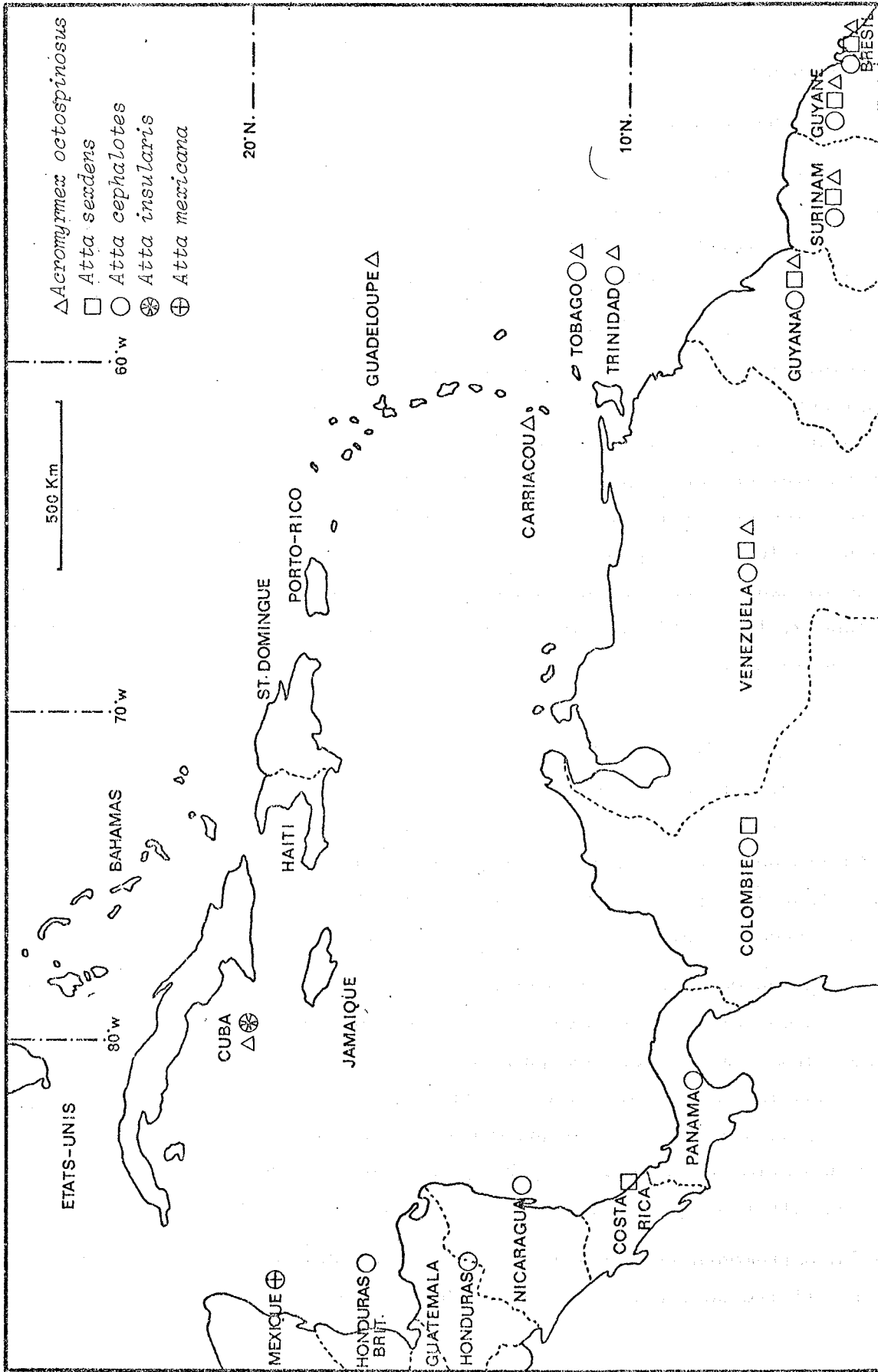


Figure n° 2 : Répartition des principales espèces d'Attines dans la zone caraïbe.

En Guyane, différentes espèces trouvent les conditions écologiques optimales et sont en pleine expansion ; l'endémisme y est très accentué. L'une des plus dévastatrices est *Atta sexdens* (L.) ; viennent ensuite *Atta cephalotes* (L.), *Acromyrmex landolti* (FOR.) et *Acromyrmex octospinosus* (REICH).

Si en Martinique aucune fourmi attine n'a été trouvée à ce jour, l'île de la Guadeloupe subit les dommages d'*Acromyrmex octospinosus* (REICH), connue localement sous le nom de Fourmi-manioc. L'introduction de cette espèce est récente : c'est en août 1954 que cette fourmi fut signalée dans la commune de Morne-à-l'Eau pour la première fois (BLANCHE, 1961). Pour expliquer cette invasion, diverses hypothèses ont été avancées. La plus vraisemblable serait l'introduction fortuite d'une femelle fécondée, apportée de Trinidad ou de Guyane par quelque amateur d'horticulture.

Bien que depuis 1954, la Protection des Végétaux de Guadeloupe ait établi un programme de lutte contre la fourmi-manioc, l'aire de nidification augmente chaque année. Elle atteint en 1976 l'île de la Basse-Terre (fig. 3).

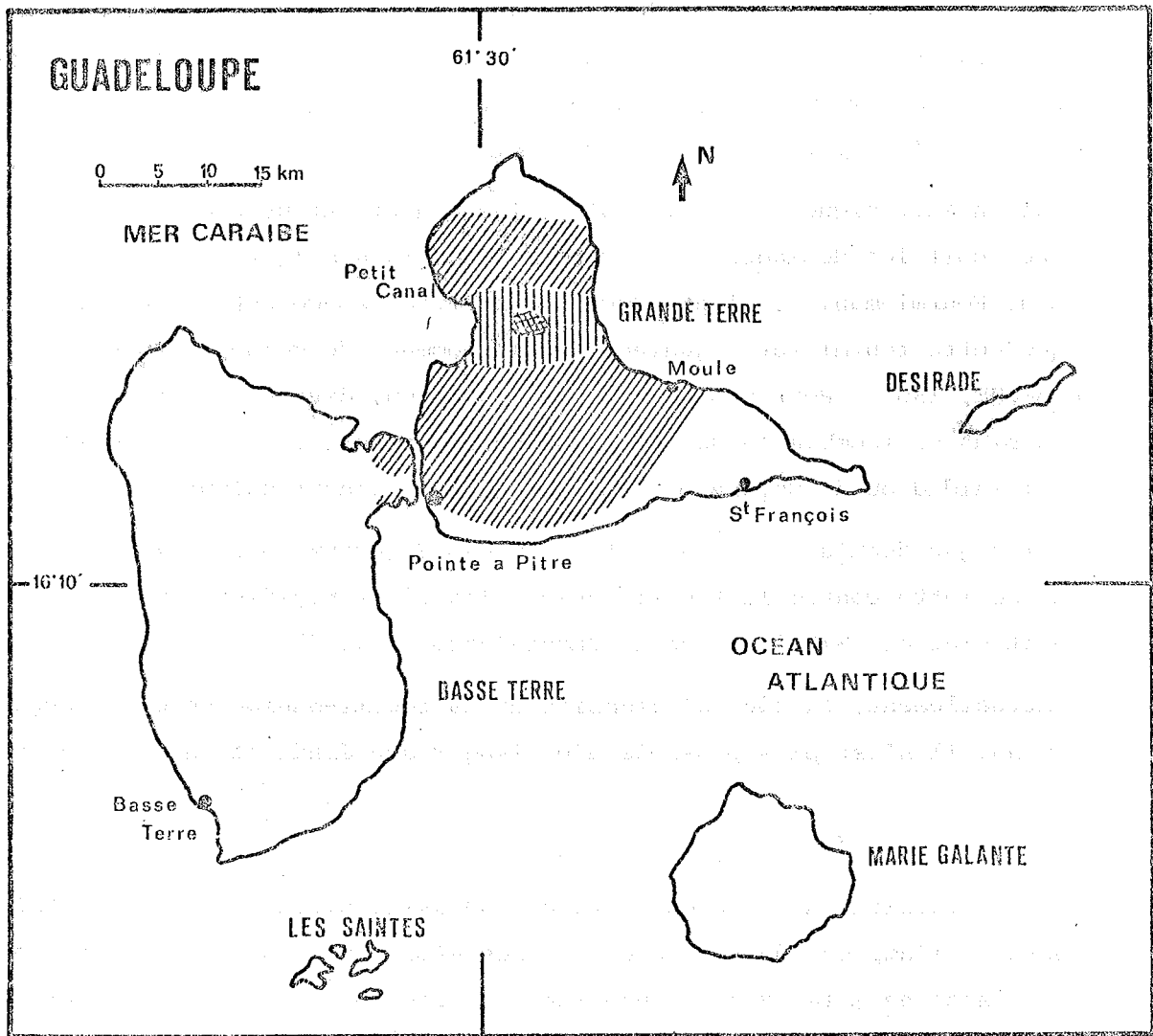
Actuellement, la zone d'extension de la fourmi-manioc en Guadeloupe est d'au moins 40 000 ha. Il n'est plus possible d'envisager son éradication du département.

1.1.3. Estimation des dégâts

Les réflexions d'un colon portugais du XVIIe siècle (cité par WILSON, 1974) rendent compte de l'ampleur du problème : « Les *Atta* sont les vrais propriétaires de la vallée de l'Amazone ; les vrais conquérants et les rois du Brésil ; le Brésil n'est qu'une grande fourmilière... ». De nos jours, les Brésiliens, confrontés par le développement de leur agriculture à des problèmes bien plus importants, sont plus prosaïques. Ils affirment que "Le Brésil tuera la fourmi ou la fourmi tuera le Brésil".

Les fourmis champignonnistes des genres *Atta* et *Acromyrmex* décrites comme invertébrés dominants dans le Nouveau-Monde par WHEELER (1907) sont généralement considérées comme premier fléau de l'agriculture. Dans trois études différentes, leurs dommages ont été estimés globalement à environ 1000 millions de dollars U.S par an (TOWNSEND, 1923 ; ESCHERICH, 1929 ; CRAMER, 1967).

La liste des plantes récoltées par les Attines n'est pas limitative. S'il est connu qu'elles préfèrent certains végétaux dont la gamme est d'ailleurs très large, elles sont susceptibles de récolter les jeunes feuilles d'un grand nombre de plantes cultivées ou spontanées (FENNAH, 1950). La défoliation est essentiellement dommageable aux cultures vivrières, aux plantes maraîchères et ornementales, aux vergers, aux prairies et à certains arbres cultivés pour le bois d'oeuvre.






-  1954 Foyer initial
-  Progression de 1954 à 1963
-  Progression de 1963 à 1981

Figure n° 3 : Progression de la Fourmi-Manioc (*Acromyrmex octospinosus*) en Guadeloupe.

La quantité de végétal découpé varie avec le volume des nids, celui-ci dépendant lui-même de l'espèce d'Attine et de l'âge de la colonie. Un nid d'*Atta sexdens*, selon AUTUORI, élabore en 3 ans jusqu'à 1000 chambres souterraines après excavation de plus de 20m³ de terre et compostage de 6 tonnes de feuillages. Les calculs de WEBER (1966) confirment ces données : le jardin fongique d'une seule chambre d'*Atta cephalotes* pesant environ 130g nécessite la découpe d'environ 1kg de végétal frais par an. Il faut ajouter à cela une longévité de la reine de plus de 10 ans et une densité importante des nids. Au Brésil 10 nids par hectare (principalement *Atta capiguara*) sont communément trouvés dans des prairies vieilles de 5 ans. Ce nombre passe à 18 nids/ha pour 10 ans. La réduction de la capacité de pâture qui en résulte est estimée entre 1,2 et 2,3 animaux par hectare (AMANTE, 1967, 1968 ; BEMELMANS et AMANTE, 1968). L'observation dans certaines prairies de 50 à 60 nids à l'hectare (EIDMANN, 1935) laisse supposer des pertes considérables. AMANTE (1972) estime que dans l'état de São Paulo, la concurrence directe des Attines (*Atta capiguara* et aussi *A. laevigata* et *A. sexdens rubropilosa*) entraîne une perte de pâture pour 1,5 million de têtes de bétail par an.

Mais les dégâts occasionnés par les fourmis champignonnistes ne se restreignent pas aux prairies. Dans les exploitations de canne à sucre, une moyenne de 2,35 nids (*Atta capiguara* et *A. laevigata*) par hectare entraîne une perte brute en matériel frais de 4 tonnes par an et par ha (AMANTE, 1972). Toujours dans l'état de São Paulo une étude réalisée sur 8 fermes en 1962 (TROPPIAIR, 1973) permet d'évaluer à 7,3% la perte de récolte d'arachide ; de 5 à 5,5% celles de haricot, coton, herbe de prairie et eucalyptus ; de 3 à 4% pour les cultures de canne à sucre, manioc, maïs, orange et riz et 1,3% de perte de légumes. Par l'action des Attines uniquement, la moyenne des pertes de récoltes sur l'ensemble des cultures est de 4,2% et correspond à 18,7 millions de cruzeiros (= 40 000 \$ US).

A Trinidad, CHERRETT et SIMS (1968) estiment à 12% de la récolte annuelle d'agrumes, les pertes dues à *Acromyrmex octospinosus* et *Atta cephalotes*. Un tiers des nouveaux plants de citrus sont tués. A ces chiffres il faut ajouter le coût du contrôle permanent car aucune culture n'est envisageable sans traitements. Celui-ci s'élève à 100 000 \$ US par an dans cette île.

Sur les jeunes plantes pérennes les dégâts sont particulièrement importants en saison sèche lorsque celle-ci retarde la reprise de végétation. Ainsi dans l'état de São Paulo les Attines constituent le facteur limitant de reboisement et sont responsables d'une chute de production en bois d'oeuvre de 14%. A Belem, au Nord du Brésil,

la société Jari Florestal possède environ 100 000 hectares plantés en arbres pour la production de cellulose. Les deux espèces utilisées (*Gmelina arborea* et *Pinus caribaea*) sont sujettes aux attaques des fourmis. Le coût du traitement de 30 000 hectares entre mai 1978 et avril 1979 est évalué à 0,5 million de dollars US.

Ainsi, dans tous les pays infestés, les estimations de l'ampleur des dégâts sont équivalentes. Les Attines sont reconnues comme fléau de l'agriculture en Argentine (MARICONI, 1970) et NICKEL (1958) les range en tête des ennemis des cultures à l'égal du criquet migrateur. Au Paraguay elles sont déclarées "ennemis numéro 1 de l'agriculture" (SCHADE, 1973). Dans les années récentes quelques familles du Cran Chaco ont abandonné leur ferme à la suite des dégâts causés par les Attines. Au Pérou (CRAMER, 1967) et en Guyana (KENNARD, 1965), les fourmis champignonnistes se partagent aussi avec le criquet la première place d'insecte ravageur. Le Département de l'Agriculture aux Etats-Unis classe les Attines parmi les insectes les plus destructeurs de l'agriculture des régions tropicales et subtropicales (USDA circular 494).

En Guadeloupe, c'est la micro-agriculture traditionnelle de subsistance de la Grande-Terre, formée de petites parcelles de polyculture potagère (ignames, patates douces, manioc...) et d'arbres fruitiers isolés (agrumes, arbres à pain) qui subit actuellement les principales attaques des fourmis. Ces jardins créoles sont en effet installés, après défrichage au coutelas et brûlis, sur les flancs des mornes à proximité immédiate des nids. Cependant suite à l'accroissement continu du territoire infesté, il est à craindre dans l'avenir des dégâts sur les vergers et les cultures maraîchères intensives de la Basse-Terre.

Récemment en Guyane française, PASTEL et al (1980) signalent la présence d'*Aeromyrmes landolti*, spécialisée dans la découpe de l'herbe des pâturages. Le projet de développement des cultures fourragères dans ce département laisse prévoir des problèmes qui augmenteront avec le temps.

1.1.4. Méthode de lutte en Guadeloupe

L'habitat souterrain de l'insecte, la dispersion d'une multitude de nids souvent très petits, et le grand nombre de sexués produits annuellement par chaque colonie dans une topographie difficile sont autant de facteurs accroissant la difficulté de la lutte contre les Attines.

La destruction des individus présents en surface est totalement inopérante. Les récolteuses ne représentent qu'une infime partie de la population d'un nid à l'abri sous terre. Ce réservoir est à détruire pour mettre fin aux dégâts sur les végétaux cultivés.

La Guadeloupe n'a entrepris la lutte qu'en 1956, soit 2 ans après la découverte du premier foyer. La technique utilisée alors consistait, après repérage des nids, à les asperger d'une solution insecticide à base d'aldrine ou d'heptachlore (2%), substances dotées d'un effet-choc. Cette méthode présentait divers inconvénients :

- nécessité de découvrir chaque nid à traiter par un défrichage manuel quasi total de la zone prospectée ;
- transport des solutions insecticides à dos d'homme dans des zones très accidentées. De plus, un certain nombre de nids trop petits ou bien cachés échappaient toujours au traitement et constituaient le point de départ d'une réinvasion de la zone.

Dès 1963, le Service de la Protection des Végétaux appliqua une technique d'appâtage utilisant les fourmis récolteuses pour véhiculer le toxique au sein de la colonie. L'appât était réalisé de façon artisanale : résidus de l'industrie sucrière (bagasse et mélasse) et aldrine à 1% (BLANCHE, 1965). Il fut employé avec succès pendant 10 ans mais ses défauts majeurs (fermentation, moisissure, texture irrégulière, durée d'action limitée) ont conduit à son remplacement par un appât commercial plus pratique, le Mirex 450. Cette dernière formulation granulée, à base de pulpe d'agrumes et de perchlordécone, est encore utilisée en 1981.

Le défrichage des terrains infestés a été quelque peu allégé par des layons de repérage tracés tous les 2 mètres environ. L'appât est cependant encore déposé à raison de 30 grammes dans l'entrée de chaque nid. Si le toxique en lui-même est très efficace, le Mirex 450 n'est toutefois pas l'idéal. Son attractivité encore trop faible empêche l'épandage à même le sol. Il faut rechercher chaque entrée de nid ce qui occasionne des frais de main-d'oeuvre importants. De plus sa faible résistance à l'humidité limite son efficacité en saison humide (attaque de moisissures au sol et délitage sous la pluie). Enfin le perchlordécone est un organochloré qui échappe encore à l'interdiction d'emploi frappant en France presque tous les produits de cette famille. Sa rémanence et sa toxicité vis-à-vis de l'environnement, soulignés par les travaux américains lors d'emploi massif, incitent les chercheurs à trouver un substitut (MALATO et KERMARREC, 1976).

Cette technique est en outre astreignante et onéreuse. Le Service de la Protection des Végétaux en Guadeloupe signale que le total des subventions accordées pour la lutte contre la fourmi-manioc entre 1959 et 1974 s'élève à 6.312.000F (TROUP, 1975). A l'heure actuelle les dépenses annuelles engagées sont de 800.000F. Pour l'année 1980, sur les 40 000 hectares infestés, 1600 ha ont été traités par ce service, soit la destruction de 27 200 nids. A ces chiffres doivent s'ajouter les résultats de la lutte effectuée par les agriculteurs eux-mêmes. L'action de la Protection des Végétaux est surtout focalisée sur le front d'avance de la fourmi. Mais il faut reconnaître qu'en dépit des importantes dépenses engagées, l'extension du ravageur se poursuit lentement de 100m à 1km par an.

1.2. L'ASSOCIATION FOURMI-CHAMPIGNON

1.2.1. Le nid et le comportement social

Les nids sont des constructions souterraines plus ou moins complexes et volumineuses suivant les genres d'Attines (WEBER, 1972). Les espèces d'*Acromyrmex* et d'*Atta* peuvent avoir des colonies de plusieurs millions d'individus.

Les nids des fourmis du genre *Atta* atteignent un degré de complexité impressionnant. Une coupe verticale d'une fourmilière d'*Atta sexdens* par exemple, met à jour un grand nombre de chambres. Parfois plusieurs centaines, reliées entre elles par des couloirs, communiquent avec la surface du sol par des cheminées. Ces édifices souterrains peuvent s'établir sur plusieurs dizaines de mètres cubes.

En Guadeloupe les nids d'*Acromyrmex octospinosus* sont formés de une ou deux chambres situées dans les anfractuosités rocailleuses du sol ou entre les racines des arbres. Ils sont pratiquement invisibles de l'extérieur.

Le nid contient la meule fongique fragile et de structure spongieuse. Celle-ci est constituée d'innombrables petits morceaux de substrat liés entre eux par la croissance d'un mycélium dense qui les recouvre entièrement (fig. 4).

Cette meule est le siège d'une activité sociale intense. Les fourmis champignonnistes du genre *Acromyrmex* possèdent trois castes distinctes : les ouvrières, les femelles et les mâles (fig. 5). Le genre *Atta* est caractérisé par une caste supplémentaire, les soldats, grands individus aux mandibules larges dont la fonction essentielle est la protection de la colonie.

Les ouvrières d'*Acromyrmex* présentent un polymorphisme accentué, les plus petites ayant une taille d'environ 2mm alors que les grandes atteignent une longueur de 9 à 10 mm. Bien que leur taille montre une variation graduelle continue, on distingue arbitrairement trois classes : celle des petites 2-3mm, des moyennes 4-6mm, et des grandes 7-9mm (WEBER, 1972). Le polymorphisme chez les ouvrières serait plus justement défini par "polyphénisme", vocable proposé par LUSCHER (1976) pour décrire tous les aspects de la différenciation entre les membres d'une même espèce (Différences morphologiques = polymorphisme et différences comportementales = polyéthisme). Il existe en effet une très nette corrélation entre la taille des ouvrières et la tâche accomplie à l'intérieur ou à l'extérieur du nid. Ce type de corrélation est considéré comme une forme avancée d'organisation sociale au niveau de la division du travail.



Figure n° 4 : Le jardin fongique d'un nid d'*Acromyrmex octospinosus*.

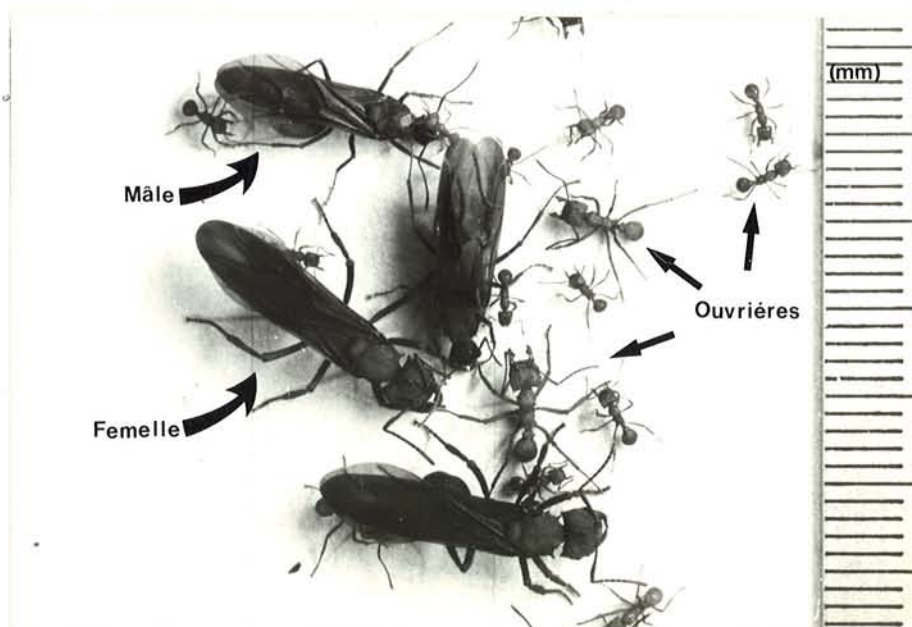


Figure n° 5 : Les 3 castes de fourmis chez *Acromyrmex octospinosus* : ouvrières (sans ailes), mâle (ailé à petite tête), femelle (ailée à grosse tête).

Les grandes ouvrières sortent du nid pour découper des morceaux de végétaux (fig. 6). A l'intérieur du nid, elles se préoccupent de retirer le substrat usé ainsi que les fourmis mortes. Ce groupe creuse le nid, aide à la construction et défend la colonie contre les attaques extérieures. Les petites ouvrières concentrent leur activité à l'intérieur du nid. Le substrat végétal apporté par les affourageuses est de nouveau travaillé par les petites ouvrières. Découpées en petits morceaux, les feuilles sont léchées, nettoyées et incorporées dans la meule. Après y avoir déposé une goutte de liquide rectal, les petites ouvrières inoculent ce substrat avec le champignon par une méthode de bouturage (WEBER, 1956). Leur rôle de nettoyage n'est pas négligeable et constamment, elles retirent tous les objets étrangers et les détritrus de la meule, pour les rejeter à l'extérieur du nid dans une véritable décharge de la société. Une autre fonction importante de ces petites ouvrières est l'entretien du couvain et des larves généralement enfouis dans les parties profondes du nid où seuls les individus de petite taille peuvent accéder.

Les ouvrières sont toutes des femelles diploïdes non fécondes. Au printemps apparaissent dans les nids deux nouvelles castes de fourmis : les sexués ailés, mâles et femelles. Ils ne participent pas aux différentes tâches sociales. Le mâle, haploïde, a une vie assez brève limitée au vol nuptial et à l'accouplement. La femelle fécondée au cours de cet essaimage tombe au sol, se libère de ses ailes et cherche une cavité pour l'installation de son nid. Grâce à une pelote de champignon provenant de la meule du nid parental et stockée dans sa poche infrabuccale, la jeune reine assurera le démarrage de sa myciculture. Elle utilise à cette fin les premiers oeufs pondus comme substrat (BAZIRE-BENAZET M., 1957), mais peut aussi sortir de sa loge à la recherche de substrat végétal (WEBER, 1972). La survie de la reine pendant la fondation de son nid est assurée grâce à la digestion de ses muscles alaires et du matériel de réserve, stocké au cours des stades larvaires dans le tissu adipeux de l'abdomen. Quelques mois plus tard apparaissent les premières ouvrières. La reine se désintéresse dès lors de l'entretien du nid et n'assure plus qu'une fonction de pondreuse. En raison de la difficulté d'observation, le développement de ces oeufs reste mal connu : chez *Atta insularis* la durée est de 15 à 16 jours (BRUNER et BARRY, 1949) chez *Atta sexdens rubropilosa* de 22 jours (AUTUORI, 1942). Chez *Acromyrmex octospinosus*, après 4 stades larvaires ou 5 pour les futurs sexués (TORREGROSSA et al, 1981) la larve passe à l'état de nymphe nue. Celle-ci est caractérisée par l'absence de pigmentation, la mélanisation ne s'installe que progressivement au cours des 18 jours de ce stade. A la suite d'une mue imaginale, les ouvrières adultes émergent très claires et à la démarche instable. Elles ont dès lors leur taille définitive et commencent à se nourrir seules du champignon.

1.2.2. Le champignon symbiotique

1.2.2.1. Morphologie

Dans un nid en activité on n'observe aucune fructification du champignon. La meule n'est formée que d'un enchevêtrement dense de filaments mycéliens ou hyphes qui couvrent l'ensemble du substrat et du couvain. L'intense activité mycicultrice des fourmis empêche la croissance aérienne de ces hyphes qui sont maintenus à la surface du substrat. A l'oeil nu ces filaments apparaissent blancs. Ils ont un diamètre de 10µm et plus chez *Atta* (WEBER, 1972). Les filaments du champignon d'*Acromyrmex octospinosus* ont un diamètre de l'ordre de 7µm. Ils sont divisés par des cloisons en articles de dimensions variables de l'ordre de 40 à 100µm. Les articles apicaux, généralement plus longs, peuvent atteindre 180 à 200µm (DECHARME, 1978). Les hyphes s'allongent irrégulièrement, se ramifient quelquefois et développent en masse ou de manière continue des renflements (fig. 7). Ces renflements sphéroïdes dont le diamètre est 5 fois supérieur à celui des hyphes furent observés dès 1893 par MOELLER. En raison de leur forme il les dénomma "tête de chou rave" (Kohlrabihaüfehen) ou *gongylidia*, ou encore mycotêtes vraisemblablement par analogie avec celles des termitières décrites un siècle plus tôt (KONIG, 1779). Les sphérules de *gongylidia* se constituant au sein du mycélium se présentent en amas que WEBER (1957) désigne sous le terme de *staphylae*. La taille moyenne de ces derniers est de 400 à 480µm pour le champignon d'*Atta cephalotes isthmicola* (WEBER, 1972). Pour celui d'*Acromyrmex octospinosus* le diamètre des *gongylidia* peut varier de 35 à 60µm (DECHARME, 1980).

1.2.2.2. Position taxonomique

L'identité et les qualités biologiques du champignon symbiotique des fourmis attines ont reçu relativement peu d'attention et de nombreuses questions sont encore loin d'être résolues. La principale difficulté est due à ce que le champignon ne peut former normalement des sporophores, structures fructificatives élaborées, nécessaires à la diagnose taxonomique classique.

Les recherches mycologiques sur ce champignon furent entreprises dès 1893 par A. MOELLER. A partir du champignon des nids d'*Acromyrmex*, abondants près de son laboratoire, MOELLER réussit à obtenir des stades sexués. Sa technique consistait à isoler une partie de la meule d'un nid et d'en retirer toutes les fourmis. Les *gongylidia* perdent généralement leur contenu dans les trois jours et les conidies commencent alors à se développer. Les conidiophores qui apparaissent ont une longueur d'environ 8µm et les spores un diamètre de 2µm. Une deuxième forme de conidiophores plus fragiles se développe par la suite. Les fourmis remises en présence de ces deux cas essaient, souvent sans résultat, de sectionner et d'éliminer cette évolution anormale.

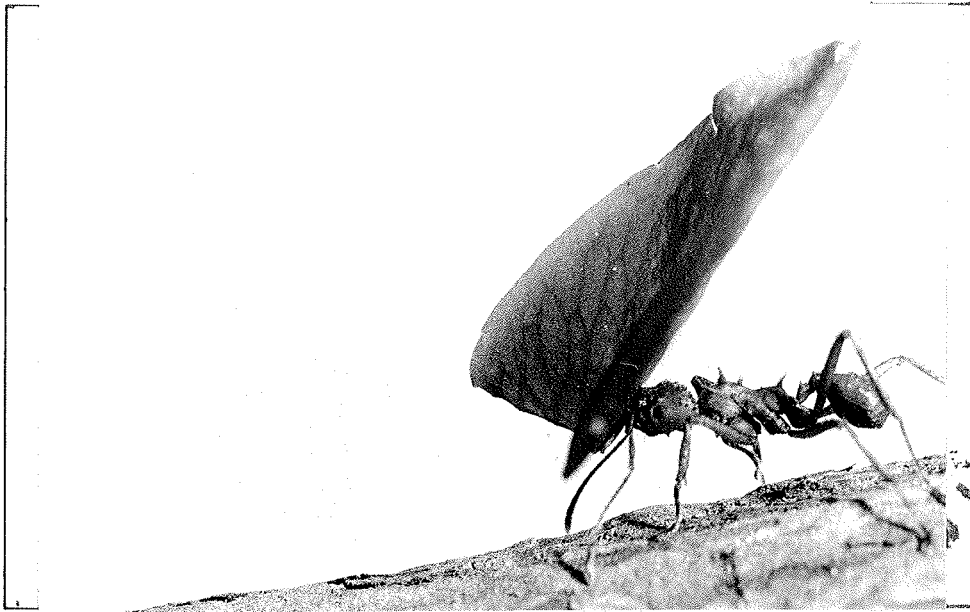


Figure n° 6 : Une grande ouvrière retournant au nid avec un morceau de feuille.

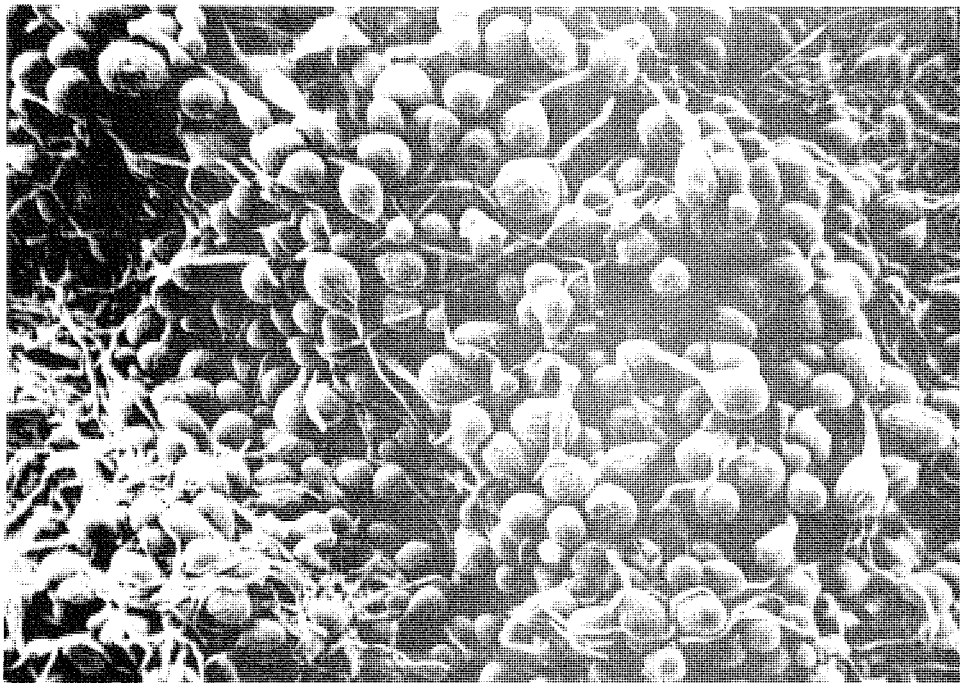


Figure n° 7 : Les hyphes et les *gongylidia* du champignon symbiotique
(photo M.Y. DECHARME, ENSH Versailles).x150

Par cette technique, MOELLER ne réussit pas à obtenir des sporophores. Il eut cependant par quatre fois la chance d'observer sur des nids abandonnés par les fourmis un développement lent (10-12 jours) du mycélium en sporophores matures. Les observations microscopiques des hyphes de la base de ce champignon, la germination sur milieu nutritif de spores, produisant des hyphes, des *gongylidia* et des *staphylae* similaires à ceux du champignon de la fourmi, furent la confirmation de l'identité sous une forme évoluée du champignon de l'Attine.

De même, l'obtention de ces formes par cultures de laboratoire à partir de prélèvements dans les nids d'Attines de différents genres restent l'exception. Les seuls résultats furent ceux de WEBER (1957) qui, sur un milieu stérile à base d'avoine, obtint des carpophores de *Lepiote* (Basidiomycète, *Agaricaceae*) à partir du mycélium de nids d'une Attine primitive *Cyphomyrmex costatus*.

De nombreux auteurs signalent également à la surface de meules d'Attines abandonnées, la présence de carpophores d'Ascomycètes, de Basidiomycètes (WEBER, 1938, 1957, 1966, 1972)¹. Mais en aucun cas, la preuve irréfutable de la continuité entre la forme végétative du champignon du nid actif et le carpophore ne semble avoir été établie.

Selon d'autres observations, la forme végétative du nid peut être celle d'un *Mycelia sterilia* du genre *Rhizomorpha* (LINQUIST et WRIGHT, 1964 cités par WEBER, 1966) ou être relié au stade parfait de l'un des Ascomycètes suivants : *Xylaria* (SPEGAZZINI, cité par WEBER, 1938), *Bargellinia* (LINQUIST et WRIGHT, cités par WEBER, 1966), *Auricularia* (WEBER, 1957). Enfin pour LEHMANN (1974, 1976) les *gongylidia* des fourmis champignonnistes correspondraient à un stade conidien avorté du genre *Aspergillus*.

Cependant l'étude ultrastructurale récente de ANGELI-PAPA et EYME (1979) du champignon symbiotique d'*Acromyrmex octospinosus* montre la présence de dolipores sur les parois transversales des hyphes et confirme son appartenance au groupe des Basidiomycètes supérieurs.

De même DECHARME (1980) classe par des observations morphologiques et cytologiques les champignons entretenus par trois Attines (*Atta sexdens*, *Atta cephalotes* et *Acromyrmex octospinosus*) dans le groupe des Basidiomycètes supérieurs et suggère que le symbiote de ces trois fourmis appartient à la même espèce.

¹ HEIM (Directeur de la Mycologie au Museum National d'Histoire Naturelle) a déterminé comme *Leucocoprinus gongylophora* (Basidiomycète) le carpophore trouvé sur une décharge d'un nid d'*Acromyrmex octospinosus* en Guadeloupe par KERMARREC (comm. pers.).

1.2.3. La symbiose Attines-champignon : alliance biochimique

1.2.3.1. Introduction.

Les insectes qui vivent en symbiose avec des micro-organismes sont divisés en deux groupes. Dans le premier, le champignon, les bactéries ou les protozoaires vivent à l'intérieur de l'insecte, soit dans le tractus digestif, soit dans des cellules spécialisées. Dans l'autre cas le champignon n'est plus interne mais vit dans le nid.

On notera par exemple dans ce groupe, les moucheron de la famille des *Itonididae* dont les larves vivent dans les galles de plantes en association avec un champignon ; les guêpes du bois des genres *Sirex*, *Tremex* et *Urocerus* et les champignons symbiotiques *Stereum* et *Daedalea* (Basidiomycètes). De nombreuses espèces de coléoptères foreurs du bois (*Scolytidae*, *Platypodidae* et *Lymexylonidae*) ne peuvent survivre sans leur champignon (plusieurs genres d'Ascomycètes et de champignons "imparfaits").

Mais, parmi les insectes myciculteurs, les plus évolués restent d'une part les termites *Macrotermitinae* qui entretiennent un Basidiomycète du genre *Termitomyces*, et d'autre part les Attines. Le rôle exact du champignon et les relations symbiotiques sont chez les termites toujours sujet à controverse. Chez les Attines, ces questions n'ont pas encore reçu de réponse. L'équipe de MARTIN à l'Université de Michigan (U.S.A.) a étudié l'aspect biochimique de cette alliance.

1.2.3.2. Apports du champignon à la fourmi.

HODGSON (1955) souligne que les mécanismes physiologiques des Attines développés en se nourrissant d'un champignon cultivé, ont contribué à leur conférer une position dominante dans la zoocénose des forêts, grâce au stock inépuisable de nourriture représenté par la biomasse végétale verte du biotope.

Cette interprétation implique l'existence, dans les plantes, de substances que les fourmis sont incapables de dégrader et qui ne sont rendues disponibles que par l'intervention du champignon. Les celluloses, molécules les plus abondantes dans le matériel végétal sont logiquement parmi ces substances. Très peu de métazoaires évolués sont capables de dépolymériser les celluloses et dépendent en conséquence de micro-organismes producteurs d'hydrolases spécifiques des polyglycanes.

Les fourmis champignonnistes semblent présenter ce type d'organisation dans leur conquête du milieu : MARTIN (1974) rapporte que le liquide digestif d'*Atta colombica tonsipes* n'est que faiblement actif dans la dégradation de la carboxyméthylcellulose. La dégradation de la cellulose par le champignon de cette espèce d'Attine, fut

démontré par MARTIN et WEBER (1969). Des cultures pures de ce champignon furent réalisées sur milieux synthétiques ne comprenant comme source de carbone que de la cellulose brute en poudre ou de la carboxylméthylcellulose sous forme de sel de sodium. Sur les cultures témoins, ne contenant pas de source de carbone, les auteurs ne constatent aucune croissance, tandis que sur les milieux précédents une croissance mycélienne significative est observée (120mg de poids sec mycélien en deux semaines). Le champignon d'*Acromyrmex octospinosus* est également capable de dégrader la cellulose, toutefois, celle-ci est trois fois moins utilisée que le glucose (DECHARME, 1978).

L'aptitude de ce champignon à métaboliser la cellulose est ainsi vérifiée. Il reste à démontrer qu'au niveau du nid, celui-ci dégrade la cellulose du matériel végétal. Ces mêmes auteurs (MARTIN et WEBER, 1969) apportent une première réponse à cette question en analysant la meule fongique ainsi que les rejets de substrats âgés. Le rapport cellulose/cendres pour la meule est de 1,57 contre 0,75 pour les rejets. Si l'on admet avec les auteurs, que la totalité de la fraction minérale formant les cendres de la meule persiste dans les déchets, alors 45% de la cellulose présente au départ est métabolisée à l'intérieur du nid. Evalué dans la même expérience, le rapport lignine/cendres ne diminue pas de façon significative : 0,27 dans la meule pour 0,25 dans les déchets. Ceci signifierait que le champignon n'utilise pas les lignines qui incrustent et cimentent les fibres cellulosiques de nombreuses plantes.

Alors que la plupart des animaux végétariens s'associent des micro-organismes anaérobies dans certaines parties de leur tube digestif, les Attines ont domestiqué un champignon aérobie qu'elles cultivent dans leur nid. Aussi lorsqu'elles ingèrent le cytoplasme mycélien, elles assimilent des nutriments dont les carbones proviennent des celluloses des végétaux supérieurs.

Une analyse qualitative et quantitative de certains nutriments dérivés du champignon d'*Atta colombica tonsipes* fut réalisée par MARTIN et al (1969b). Près de 56% du poids sec du champignon est utilisable comme nutriments solubles. Les hydrates de carbone constituent plus de 27% de ce poids sec, les acides aminés libres 4,5% , les acides aminés liés aux protéines 13% et les lipides 0,2%. Les oses identifiés sont le tréhalose, le mannitol, l'arabinitol et le glucose. La fraction lipidique contient l'ergostérol comme stérol principal. En désaccord avec ces auteurs qui n'ont observé aucun polysaccharide dans la fraction soluble, l'étude cytologique de DECHARME (1980) révèle que le mycélium cultivé par *Acromyrmex octospinosus* et en particulier les *gongylidia* stockent une quantité importante de glycogène. Ce polyoside de réserve est couramment

rencontré chez les champignons. Ces résultats permettent une approche de l'apport alimentaire du Basidiomycète. Celui-ci se révèle de bonne qualité : haute teneur en hydrates de carbone, sous forme aisément assimilable, couplée à une haute teneur en protéines riches en acides aminés essentiels.

Le jardin fongique a d'autres fonctions que la source d'aliments : il sert aussi de structure de base du nid où se développe le couvain. Rares sont les études menées dans ce sens sur les nids d'Attines, cependant le champignon a un rôle important dans le maintien d'un micro-environnement. Une étude de STAHEL et GEIJSKES (1940) montre qu'il n'y a pas d'évolution de température dans le nid d'*Atta cephalotes* par rapport à celle du sol avoisinant. Par contre, l'humidité à l'intérieur du nid est très élevée ($\approx 90\%$) et le taux de gaz carbonique est 4 fois plus important que dans l'air extérieur. Pour les termites (*Macrotermitinae*) qui cultivent un champignon, HESSE (1957) considère que sa fonction principale est de réguler le degré hygrométrique du nid, en contrôlant l'excès ou de déficit d'humidité. ABO-KHATWA (1977) pense qu'une thermorégulation est réalisée à l'intérieur du nid de termites d'Afrique tropicale (*Macrotermitinae*) par le mannitol présent dans le champignon.

1.2.3.3. Apports de la fourmi au champignon.

1.2.3.3.1. Déficience catabolique du symbiote.

Les premiers essais de cultures du champignon des Attines sur milieu artificiel⁽¹⁾ ont mis en évidence une croissance très faible. Cette croissance a pu être accélérée par l'addition d'acides aminés libres. La source d'azote de ce milieu se présentant sous forme de polypeptides, ceci suggère une déficience du champignon en polypeptidases. MARTIN et MARTIN (1970a) ont cultivé le champignon d'*Atta colombica tonsipes* sur deux milieux qui ne diffèrent que par la source d'azote : l'un reçoit un hydrolysât tryptique de caséine (peu de polypeptides courts et d'acides aminés libres) et l'autre un hydrolysât enzymatique de caséine (beaucoup d'acides aminés libres). La croissance du champignon en milieu liquide est de 6 à 8 fois plus importante dans ce dernier cas.

La mise en évidence de cette limitation dans le métabolisme fongique est d'une grande importance écophysiological : elle entraîne un désavantage compétitif important lorsque la source d'azote du milieu est principalement formée de polypeptides de haut poids moléculaire. Ainsi, le substrat végétal ne serait pas un milieu optimal pour ce champignon, puisque les acides aminés des feuilles sont sous forme de protéines.

(1) Milieu Sabouraud : Peptone Chapoteaut 10 g/litre
Glucose 20 g/litre
Gélose 15 g/litre

L'aptitude des fourmis à cultiver ce champignon sur un tel substrat permet de penser qu'elles ont développé une méthode de culture compensant la déficience métabolique de leur partenaire. L'observation des différents comportements intervenant dans la culture du champignon par les fourmis (bouturages, nettoyages, dépôts de salive et de liquide rectal sur le substrat végétal mâchonné, ...) a incité le développement des recherches dans ce sens.

1.2.3.3.2. Apport d'enzymes protéolytiques par la fourmi.

L'analyse des composés azotés contenus dans le liquide rectal de la fourmi d'*Atta colombica tonsipes* par MARTIN et MARTIN (1970a) révèle l'absence d'urée, d'acide urique, de créatine et de créatinine. Les deux plus importants produits azotés excrétés sont l'acide allantoïque et l'allantoïne (produits du métabolisme de la purine). L'ammoniaque ainsi que l'ensemble des 21 acides aminés communs ont pu être détectés de façon significative à l'état libre. Ces substances azotées, déposées sur le substrat végétal, ne peuvent être que bénéfiques à la croissance du champignon mais nécessairement avec un effet limité lié à leur courte durée de vie. Le plus important, pour que le champignon puisse maintenir une stratégie de compétition, reste l'apport supplémentaire d'enzymes protéolytiques. L'activité protéolytique du liquide rectal ainsi que celle des homogénéisats de différentes glandes (post-pharyngiennes, mandibulaires, maxillaires et labiales) ont également été évaluées (*op. cit.*) en tant que sources possibles des sécrétions lors de la préparation des feuilles en vue de leur incorporation dans la meule. Aucune activité protéolytique ne fut détectée dans ces glandes, cependant une activité significative fut mesurée dans l'intestin et surtout (2,5 à 5 fois plus) dans le liquide rectal. Aussi, il apparaît que ce liquide est non seulement une source de composés azotés directement assimilables par le jeune inoculum fongique, mais aussi une source de protéases hydrolysant les protéines des feuilles en acides aminés libres.

Pour tenter de confirmer et d'étendre cette constatation aux autres fourmis attines, MARTIN et MARTIN (1970b et 1971) ont mesuré systématiquement l'activité protéolytique de l'intestin et du rectum chez 17 espèces d'Attines appartenant à 7 genres différents et chez 35 espèces de fourmis non champignonnistes dans 22 genres différents. Pour toutes les espèces d'Attines on observe une activité protéolytique dans l'intestin mais toujours plus importante dans le rectum. Parmi les espèces non mycicultrices, 26 n'ont pas d'activité protéolytique détectable dans le rectum et les 9 autres ont une activité plus faible (maximum 16%) que dans l'intestin. Il semble donc que l'aptitude à concentrer les protéases dans le liquide rectal ne soit pas répandue chez les fourmis mais reste spécifique aux Attines.

1.2.3.3.3. Apport d'autres enzymes lytiques par la fourmi.

MARTIN et al (1973 et 1975) ont recherché dans une seconde étape la présence d'autres systèmes enzymatiques et en particulier des osidases. Le liquide rectal d'*Atta colombica tonsipes* est actif pour la dégradation enzymatique de l'amidon, la chitine, le xylane et la pectine. Ces fèces montrent aussi une activité caractéristique de pectine méthyl estérase et de α 1-4 glycosidase. Ces enzymes jouent probablement un rôle important dans la culture du champignon. Le xylane et la pectine sont les constituants des membranes cellulaires chez les plantes. La dégradation de ces deux substances facilite certainement la pénétration des tissus végétaux et ultérieurement des cellules par les hyphes du champignon. Aussi, l'application de ces solutions sur le substrat neuf lors de son incorporation à la meule doit contribuer efficacement au rendement de sa lyse. L'activité chitinolytique du liquide rectal peut aussi jouer un rôle important dans la myciculture. Les espèces des genres primitifs *Cyphomyrmes*, *Mycocrepurus* et *Myrmicocrypta* incorporent dans leur nid des carcasses chitineuses d'insectes. L'action chitinolytique du matériel fécal de ces fourmis autorise l'utilisation de ce polysaccharide par le champignon. Ces enzymes de la chitinolyse peuvent aussi intervenir dans la réduction des peuplements de certains compétiteurs potentiels du champignon dans le nid. Les parois cellulaires de la plupart des champignons sont formées de chitine et peuvent aussi être lysées. Le liquide rectal de la fourmi se présenterait dès lors comme un outil supplémentaire dans une stratégie biochimique co-évolutive en conférant aux champignons indifférents à ces chitinases un avantage compétitif. Bien que rien ne le confirme, on présume que le champignon de la fourmi, dont les parois cellulaires sont chitineuses, serait résistant à l'action chitinolytique du liquide rectal. La sensibilité des hyphes dépend principalement des propriétés physiques et chimiques des parois ; la chitine peut être protégée de l'action des chitinases.

1.2.3.3.4. Conclusion.

Les résultats de ces recherches laissent apparaître une complémentarité biochimique entre les Attines et leur symbiote :

- le champignon dégradant la cellulose en oses plus simples utilisables par la fourmi pour son alimentation ;
- la fourmi défécant des enzymes protéolytiques et pectinolytiques sur le substrat végétal pour une action plus efficace du champignon.

1.2.3.4. Maintien d'une culture pure du champignon dans le nid.

Il apparait, par l'observation superficielle ou sous le microscope, qu'il n'y a qu'un seul type de champignon à l'intérieur du nid de chaque espèce d'Attines. Si l'on élimine les fourmis d'un nid par intoxication sans nuire au symbiote (ou simplement en les enlevant à la main), d'autres champignons apparaissent dans les 48 heures avec une croissance rapide et une reproduction exponentielle. Très vite, ils envahissent l'ensemble du jardin fongique.

Cette simple expérience permet de constater que les fourmis sont indispensables au maintien d'une monoculture où tout envahissement par les compétiteurs potentiels du sol est interdit.

GARRETT (1950) a identifié cinq facteurs conférant à un champignon une compétitivité de haut niveau :

- 1- Un inoculum de départ élevé permettant au champignon de surmonter d'éventuelles contraintes liées au substrat.
- 2- Une croissance mycélienne rapide favorisant une colonisation étendue du substrat.
- 3- Une sécrétion d'enzymes favorisant une utilisation rapide des nutriments présents dans le substrat.
- 4- Une production d'antibiotiques réduisant la compétition.
- 5- Une tolérance aux antibiotiques produits par les autres organismes.

A la lumière de ces cinq conditions, différents aspects de l'activité des fourmis champignonnistes peuvent recevoir une explication simple :

Suite à la préparation et à l'incorporation du substrat végétal à la meule, les petites ouvrières l'inoculent avec du mycélium prélevé sur une autre partie du jardin. Cette activité de bouturage incessante assure au champignon un inoculum de départ élevé. FEVRE (comm. pers.) montre que sur 61 échantillons de 1 à 15mm² de jeunes meules (1 à 2 jours) il existe une moyenne de 5,6 touffes/mm² (écart-type = 1,4).

L'apport, par les fèces, de substances azotées directement assimilables, autorise une croissance rapide des inoculums.

Le champignon de la fourmi présente une déficience diastasique importante. Le liquide rectal dégradant activement les polypeptides, le xylane et la pectine, contribue efficacement à l'utilisation du substrat par le champignon.

L'hypothèse selon laquelle les Attines réussiraient dans le maintien d'une culture pure par l'application d'antibiotiques a été étudiée par différents auteurs.

MARTIN et al (1969a) ne purent mettre en évidence aucune activité antibiotique significative dans les extraits entiers d'ouvrières d'*Atta colombica tonsipes*. Ils remarquèrent cependant une faible inhibition de la croissance de trois souches de *Staphylococcus*, de deux espèces de *Mycobacterium*, de deux souches de *Proteus* et de trois souches de *Pseudomonas*, par les extraits totaux de la meule à champignon. Ils ne caractérisèrent pas ces substances bactériostatiques et ne leur attribuèrent aucune fonction significative. Ces travaux (*op. cit.*), contrairement aux suggestions de WEBER (1966), furent repris selon une méthode entièrement différente par MASCHWITZ et al (1970) et SCHILDKNECHT et KOOB (1970, 1971, 1973). Ceux-ci ont trouvé dans les glandes métathoraciques⁽¹⁾ d'*Atta sexdens*, de l'acide phénylacétique, de l'acide D.β hydroxydécanoïque (myrmicacine) et de l'acide indolacétique. Chez *Acromyrmex*, seulement l'acide indolacétique et la myrmicacine purent être détectées. Ces chercheurs suggèrent un rôle important de ces substances dans la culture du champignon : l'acide phénylacétique par ses propriétés bactéricides, l'acide D.β hydroxydécanoïque par sa capacité d'inhiber la germination des spores de champignons étrangers et l'acide indolacétique par ses propriétés d'hormone végétale (régulateur de la croissance des plantes : allongement cellulaire). Récemment, DECHARME (1978) démontre que le champignon d'*Acromyrmex octospinosus* (Reich) possède lui aussi des propriétés bactériostatiques. Cette action antibiotique a été mise en évidence vis-à-vis de divers champignons telluriques (*Pythium* ou *Pestalozzia*) ainsi que sur différentes bactéries saprophytes ubiquistes. Ces expériences confirment clairement l'existence de substances antibiotiques au niveau du mycélium et du jus de culture. Ces molécules paraissent labiles car les zones d'inhibition des bactéries ou des champignons sont colonisées au bout d'un temps variable, mais court. HERVEY et NAIR (1979) étudiant une collection de 36 champignons cultivés par différentes Attines ont isolé un nouveau composé antibiotique (la lépiochlorine) à partir du symbiote de *Cyphomyrmex costatus*.

1.2.3.5. Actualisation des connaissances sur le rôle des deux partenaires dans la symbiose.

En 1975, BOYD et MARTIN entreprirent la purification et la caractérisation des enzymes protéolytiques mises en évidence dans le liquide rectal. Cette activité protéolytique est, chez *Atta sexdens* et *Atta colombica tonsipes*, attribuable à trois enzymes séparables par filtration sur colonne de Sephadex G 75. La protéinase I apparait comme une serine-protéinase inhibée par le diisopropylphosphofluoridate (DFP) mais non par l'iodoacétate -p-chloromercuribenzoate ou l'EDTA. D'autres propriétés de la protéinase I montrent qu'elle est différente des serine-protéinases d'autres animaux, en

(1) Situées dans le thorax et se déversant à la base des pattes près des stigmates du 3ème segment thoracique.

particulier des invertébrés. Par exemple elle ne présente pas les caractéristiques spécifiques de la trypsine et chymotrypsine (pas d'effet inhibiteur de l'anti-trypsine du soja et du N-tosil-L-Lysyl-chlorométhyl-Kétone). D'un autre côté la protéinase I ressemble aux protéases sériques d'origine microbienne. Les protéinases II et III sont des métallo-endopeptidases. Ces deux enzymes sont inhibées par l'EDTA et le 1-10 phé-
nanthroline, mais sont insensibles au DFP. Le métal, indispensable à l'activité de ces protéases, semble être le zinc. Les métallo-endopeptidases sont communément produites par les bactéries ou les champignons, mais n'ont que rarement été isolées des sécrétions d'insectes. Même dans ces cas, leur production par des micro-organismes endosymbiotiques reste plausible.

Quelques années auparavant, MARTIN et MARTIN (1970b, 1971) suggéraient que les enzymes protéolytiques du liquide rectal étaient des enzymes digestives sécrétées dans l'intestin et concentrées dans le rectum. Les résultats précédemment exposés semblent indiquer que les protéases sont d'origine microbienne. *A priori*, deux origines sont possibles pour ces enzymes :

- une flore microbienne endosymbiotique à quelque endroit du tube digestif de la fourmi ;
- le champignon cultivé et consommé par la fourmi.

La présence de ces enzymes dans le cytoplasme mycélien sans qu'elles ne soient excrétées dans le milieu est entièrement plausible. BOYD et MARTIN (1975b) montrent en effet que des homogénéisats totaux du champignon d'*Atta texana* cultivé sur milieu artificiel présentent une activité protéolytique. Comme pour le liquide rectal ces auteurs purifient et caractérisent les protéinases de ce champignon. Les trois enzymes isolées présentent des propriétés physiques et enzymatiques identiques à celles isolées précédemment dans le liquide rectal (tableau I). Il semble donc que les enzymes protéolytiques de ce fluide aient leur origine dans la consommation du champignon cultivé. Une expérience complémentaire (BOYD et MARTIN, 1975b) confirme cette hypothèse : 350 fourmis sont isolées de leur nid d'origine et maintenues pendant sept jours sur un régime artificiel composé de glucose, de peptone bactériologique et d'un supplément vitaminique. Pendant leur isolement les fourmis continuent de consommer de la nourriture et d'éliminer des déchets. Le liquide rectal de ces fourmis est alors testé pour son activité de dégradation des protéines, de la chitine, de l'amidon, du xylane et du polypectate de sodium. Envers chacun de ces substrats, l'activité du liquide rectal des fourmis isolées est considérablement réduite par rapport aux fourmis restées dans le nid (tableau II). La réduction la plus importante est observée pour l'activité protéolytique. De plus, il est démontré que les deux groupes de fourmis ont la même proportion de protéinases sensibles au DFP ou à l'EDTA. Comme les enzymes sont éliminées par

Propriétés	Protéinase I		Protéinase II		Protéinase III	
	Origine		Origine		Origine	
	Fourmi	Champignon	Fourmi	Champignon	Fourmi	Champignon
1) PM estimé par :						
a) électrophorèse SDS	-	-	41.700	41.700	14.900	14.900
b) filtration sephadex G75	70.000	70.000	40.800	40.800	15.500	15.200
2) Pourcentage d'inhibition de l'activité par :						
a) DFP (10^{-3} M)	100	100	0	0	0	0
b) EDTA (10^{-2} M)	0	0	100	100	100	100
c) 1.10 phenanthroline (10^{-3} M)	0	0	> 95	> 95	> 95	> 95
3) Rapport de l'activité à pH 5,5 à l'activité à pH 7,5	0,40	0,42	0,81	0,81	0,80	0,82
4) Rapport de la vitesse d'hydrolyse du substrat indiqué à la vitesse d'hydrolyse du N-benzoyl-L-méthionine-méthyl-ester						
a) N Acétyl L-tyrosine méthyl ester	0,69	0,65	aucune activité estérasiq. dans chacune des enzymes		aucune activité estérasiq. dans chacune des enzymes	
b) N-CBZ-L-serine méthyl ester	0,43	0,41	aucune activité estérasiq. dans chacune des enzymes		aucune activité estérasiq. dans chacune des enzymes	

TABLEAU I : Comparaison des protéinases I, II et III dérivées d'un extrait de champignon et de liquide rectal de fourmis (d'après BOYD et MARTIN, 1975b).

Substrat (activité)	Pourcentage de l'activité d'origine restant après une semaine
Azocoll (protéolyse)	18
Amidon (amylase)	44
Xylan (xylase)	30
Chitine (chitinolyse)	24
Sodium/ (pectinolyse) polypectate	30

TABLEAU II : Activité enzymatique du liquide rectal d'ouvrières d'*A. colombica tonsipes* maintenues pendant une semaine sur un régime synthétique (d'après BOYD et MARTIN, 1975b).

le rectum avec les sécrétions propres de la fourmi, ce résultat implique que l'activité résiduelle n'est pas augmentée par la sécrétion d'une protéinase additionnelle dans l'intestin de la fourmi.

Les résultats de cette étude suggèrent aux auteurs, contrairement à leurs conclusions antérieures, que ce n'est pas par son équipement biochimique que la fourmi contribue à cette association mutualiste, mais plutôt par son rôle de vecteur. Les fourmis transporteraient simplement les enzymes du champignon d'un endroit de la meule où celui-ci est en phase de croissance rapide et où les enzymes sont largement présentes vers un site d'inoculation. L'application de ce supplément d'enzymes cataboliques actives facilite largement la macération des tissus végétaux et leur dégradation en nutriments. Ces conditions doivent permettre une rapide initiation de la croissance du champignon. En retour ce dernier apporterait aux fourmis des nutriments de faible poids moléculaire qui seraient absorbés facilement sans aucune digestion.

1.2.4. Les raisons possibles de la symbiose entre les Attines et leur champignon.

Pourquoi les fourmis attines cultivent-elles un champignon sur du végétal découpé, plutôt que de consommer directement ces feuilles comme le font la plupart des autres herbivores ?

La théorie qui a servi de point de départ aux travaux de l'équipe de MARTIN est celle de HOGSON (1955). Ce dernier, rappelons-le, suggère que la fourmi, incapable de dégrader les polysides des plantes, accède aux réserves cellulosiques du matériel végétal grâce à une association obligatoire avec un champignon cellulolytique.

Si l'analyse des enzymes cellulolytiques effectuées par MARTIN et WEBER (1969) confirme cette hypothèse, CHERRETT (1980) considère que l'utilisation du champignon pour l'obtention de l'énergie nécessaire aux fourmis n'est pas très efficace, comparée à l'ingestion directe des carbohydrates du jus des feuilles mastiquées. En effet, seulement 50% de la cellulose végétale est dégradée par le champignon ce qui ne représente pas plus de 25% du poids sec d'une feuille. En outre, toute l'énergie obtenue par le champignon ne sera pas reçue par la fourmi. Les rendements rencontrés communément entre un niveau trophique et le suivant sont de l'ordre de 10% (PHILLIPSON, cité par CHERRETT, 1980).

QUINLAN et CHERRETT (1979) montrent qu'au cours de la préparation d'un morceau de feuille, une ouvrière média d'*Atta cephalotes* de 1,0mg (poids sec) ingère 62,2µg d'hydrates de carbone dans environ 1µl de sève de plantes. L'énergie ainsi consommée (1,1 Joule) approvisionne les besoins de cette ouvrière pour 24 heures.

Les insectes ne peuvent synthétiser certains nutriments essentiels à leur besoin. Le champignon pourrait être une source de ces composés. MARTIN et al (1969b) montrent la production de l'ergostérol par le symbiote et PEREGRINE et al (1973) retrouvent celui-ci absorbé par les glandes post-pharyngiennes d'*Acromyrmex octospinosus*.

Les animaux sont constitués principalement de protéines (>50%) soit 7 à 14% d'azote (par rapport au poids sec), alors que les plantes contiennent en majorité des carbohydrates. La culture du champignon par les Attines peut trouver son explication dans l'augmentation de la teneur en protéines de leur alimentation. En effet, le pourcentage d'azote par rapport au poids sec de feuilles varie de 0,7 à 2,5%. Celui des champignons supérieurs s'étale de 2 à 8% (MATTSON, 1980). La teneur en protéines du champignon de certaines Attines est évaluée à 17% (MARTIN et al, 1969b ; QUINLAN et CHERRETT, 1979). Elle représente une nette augmentation comparée à 13%, moyenne calculée sur 400 espèces d'arbres et arbustes différents (RUSSEL, 1947 cité par CHERRETT, 1980).

L'avantage de la culture d'un champignon serait la production de certains nutriments et la valorisation du substrat végétal. Ces problèmes ont cependant été résolus par la plupart des autres insectes phytophages sans recours à une telle symbiose. CHERRETT (1980) souligne qu'un avantage écologique au moins semblable est acquis par le compagnon végétal dans l'association. Cet auteur propose une théorie fondée sur une alliance de ces deux organismes face aux défenses des plantes contre les herbivores.

Les peuplements végétaux sont sujets aux attaques de pathogènes et phytophages à tous les stades de leur cycle de vie. Les interactions complexes entre ces agresseurs et les plantes sont le résultat d'un processus de co-évolution long et continu. Toutes les tendances de cette évolution parallèle peuvent être divisées en deux aspects principaux (LEVIN, 1976) :

- développement de mécanismes de défenses par les plantes
- adaptation des pathogènes et phytophages contrecarrant ces derniers.

Une barrière physique efficace contre un champignon parasite ne le sera pas pour un insecte muni de fortes mandibules chitinisées. De même, les défenses chimiques des plantes contre les insectes, tels les inhibiteurs d'enzymes digestives ou les analogues de l'hormone juvénile, seront sans effet sur un champignon.

Les insectes herbivores se sont généralement adaptés aux défenses chimiques des plantes - soit par un comportement physiologique précis : les attaques précoces d'*Operophtera brumata*, parasite du chêne, correspondent à la période où les tannins condensés sont absents ou en concentration minimale (FENNY, 1968, 1970),

- soit par une attaque limitée à quelques espèces de plantes : les insectes monophages économisent leurs dépenses d'énergie en limitant leur rencontre à un petit nombre de substances partiellement toxiques.

Dans ce contexte, l'exploitation par les Attines d'une très large panoplie d'espèces végétales peut s'expliquer par la symbiose. En effet, selon CHERRETT (1980) la boisson directe de la sève par les fourmis peut être inhibée par certains composés chimiques (tannins,...). L'efficacité de cette protection se trouvera réduite à néant si un champignon est chargé d'extraire de la plante les nutriments convoités. L'indifférence du symbiote reposerait sur une moindre sensibilité à ces molécules ou même sur un pouvoir de détoxification par voie métabolique.

Les champignons des litières et du bois utilisent une très grande variété de substances phénoliques, maillons de la lignine. Ils possèdent de ce fait des enzymes telles les polyphénol-oxydase, laccase et tyrosinase qui peuvent oxyder de très nombreuses substances toxiques. GARLING (1979) en complément, considère que le symbiote dérive d'un champignon mycorhizien du biotope des Attines ancestrales.

Il n'existe pas actuellement de preuves directes d'une détoxification par le champignon des composés insecticides secondaires des plantes. Cependant, LITTLE et al (1977) notent que l'analogue de l'hormone juvénile (Altozar^(R)) est efficace *in vitro* sur le développement des larves. Introduit dans un nid contenant le champignon, il reste sans effet.

Les bénéfices que le champignon retire de cette alliance sont divers : découpe du végétal en petits morceaux et préparation de sa surface (QUINLAN et CHERRETT, 1977 ; DECHARME, 1980) ; sélection de jeunes feuilles dans la forêt tropicale humide (CHERRETT, 1972) pourvoyant le mycète en substrat nutritif à faible concentration en composés secondaires fongicides, en particulier les précurseurs des phytoalexines, principes antifongiques produits par les plantes en réponse à leur infestation (DEVERALL, 1976).

1.3. CONCLUSION.

L'organisation sociale d'un nid d'Attines et les différentes propriétés de la symbiose laissent prévoir une lutte chimique ou biologique classique difficile. Une méthode de contrôle efficace *in vitro* au niveau individuel pourra être totalement inopérante *in vivo*.

Différents axes de recherches ont été privilégiés.

Le premier est focalisé sur la symbiose fourmi-champignon. Le blocage à un niveau qui reste à préciser entrainerait le déséquilibre puis la disparition de cet ensemble.

Le second axe, à l'étude, permettrait de contourner les contraintes imposées par l'homéostasie d'un nid (KERMARREC et al, 1977). Tout agent de destruction individuelle devient inutilisable au niveau de la colonie. Les sujets atteints sont immédiatement éliminés. L'emploi d'insecticides à effet-retard est envisagé. Leur diffusion, amplifiée par la trophallaxie, s'effectuerait alors à l'intérieur du nid (MALATO et al, 1977). L'effet-retard pourrait être obtenu par encapsulation de l'agent actif (insecticides, spores pathogènes, bio-agents ...) dans une gaine digérée à l'intérieur du nid par les différentes sécrétions des Attines (salive, sucs intestinaux), par les excréments fongiques, etc.

Ces buts ne peuvent être atteints que par une meilleure connaissance des éléments fondamentaux de Biologie et de Physiologie des Attines. C'est la raison principale de l'étude des aspects enzymatiques de la physiologie digestive chez *Acromyrmex octospinosus*.

2- MORPHOLOGIE ET FONCTIONNEMENT DU FILTRE INFRABUCAL CHEZ *ACROMYRMEX OCTOSPINOSUS*
(REICH). ROLE DE LA POCHE INFRABUCCALE.

<< *In hic tam parvis, atque tam nullis, quae ratio, quanta vis, quae
inextricabilis perfectio !* >>.

PLINE l'ancien,
Historia Animalium XI, 2

2.1. INTRODUCTION.

Les différentes parties du tractus digestif des fourmis présentent des parois modifiées permettant de les reconnaître. Une des premières modifications se situe au niveau de la cavité préorale. Celle-ci fermée dorsalement par le labre, sur les côtés par les maxillaires et à la partie inférieure par la langue extensible, conduit à un court tube buccal dilaté ventralement en un sac sphérique : la poche infrabuccale.

Ce sac infrabuccal existe aussi chez d'autres Hyménoptères. Chez l'abeille, creusé dans la région hypopharyngienne, il n'a qu'une existence temporaire, dépendant de l'état de rétraction de la trompe. Chez les fourmis, par contre, il est permanent et très développé. JANET (1895) le nomme "poche gnathale".

WHEELER (1910) suggère pour cette poche un rôle de réceptacle des particules fines léchées par la langue. Après aspiration de la phase liquide du matériel ainsi stocké, les particules restantes sont éjectées sous forme d'une petite boulette (JANET, 1895). Le seuil de filtration des particules par la poche infrabuccale de *Camponotus pennsylvanicus* (DE GEER) est estimé à 150µm (EISNER et HAPP, 1962). Chez les Formicines et les Dolichoderines les plus évoluées, ce filtre prévient le blocage du proventricule qui joue un rôle de réservoir du liquide échangé par trophallaxie (*op. cit.*). Chez les Myrmicines ce rôle semblerait moins important (EISNER, 1957).

Pour d'autres sous-familles des *Formicidae* la poche infrabuccale peut avoir des fonctions spéciales : les ouvrières *Pseudomyrmicinae* nourrissent leurs larves avec des boulettes de nourriture compactée dans la poche infrabuccale et déposées dans le réceptacle postoral des larves (BAILEY, 1920).

Il est démontré chez les Attines que la poche infrabuccale a un rôle primordial lors de la fondation d'un nouveau nid. C'est en effet grâce à une pelote de champignon symbiotique prélevée sur le nid parental et stockée dans cette chambre gnathale que la jeune reine fécondée assurera le démarrage de la myciculture (Von IHERING, 1898 ; HUBER, 1905). En dehors de ce rôle fondamental, mais éphémère, lié au maintien de la souche du champignon au cours des essaimages, la poche infrabuccale a, chez tous les individus, la fonction de filtrer l'alimentation. A l'aide de carborundum, QUINLAN et CHERRETT (1978) montrent que seules les particules d'un diamètre inférieur à 10µm pénètrent au-delà du sac infrabuccal.

Dans le présent travail, nous avons cherché à donner une description fine du filtre infrabuccal chez une Attine : *Acromyrmex octospinosus*, grâce à l'examen au microscope optique des têtes en coupes sagittales et au microscope électronique à balayage de différentes pièces buccales. D'autre part, l'observation de la prise de nourriture et de son ingestion permet d'approcher le mécanisme de filtration. A la lumière de l'analyse des boulettes et de leur temps de stockage, le rôle de la poche infrabuccale est discuté.

2.2. MATERIEL ET METHODES.

Les animaux utilisés proviennent de nids du laboratoire, gardés à 25-30°C, 70-80% HR et approvisionnés quotidiennement avec du matériel végétal varié sur lequel les fourmis cultivent le mycélium symbiotique.

Pour la réalisation des coupes semi-fines, les têtes de fourmis sont fixées pendant 2h30 dans un mélange de glutaraldéhyde (2%), de paraformaldéhyde (0,5%) et de tampon phosphate 0,1 M ; pH : 7,4. Après un lavage de 24 heures dans un tampon phosphate 0,175 M à pH 7,4, on procède à une post-fixation osmique (2% acide osmique dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4) pendant 2 heures. Après 4 rinçages rapides à l'eau distillée, on effectue une déshydratation progressive à l'acétone. L'inclusion des têtes de fourmis est réalisée dans de l'Epon (Epon 812, Shell Chemical Corporation, CIPEC). Les coupes effectuées à l'aide d'un couteau de verre ont une épaisseur de 2µm. Après élimination de la résine par la soude alcoolique, on procède à une coloration au bleu de toluidine à 0,5% dans du Na₂CO₃ à 2,5% (pH : 11).

Pour l'observation au microscope électronique à balayage, les pièces buccales disséquées sont, comme précédemment, soumises à une fixation aldéhydique suivie d'une post-fixation osmique. Après déshydratation progressive à l'acétone on procède au séchage. Afin de ne pas léser les structures par évaporation rapide de l'acétone, on emploie un dispositif qui substitue du gaz carbonique liquide à l'acétone et on sublime celui-ci au point critique. Les pièces ainsi séchées sont fixées sur des porte-objets et métallisées à l'or, sous vide. Les observations sont effectuées avec un microscope électronique du type Stéréoscan 600.

L'étude du mécanisme de filtration est complétée par l'observation, à l'aide d'une loupe binoculaire ou au vidéoscope, de fourmis se nourrissant sur le champignon symbiotique.

Deux expériences sont conduites pour estimer le temps de stockage de la boulette dans la poche infrabuccale. Une première expérience où les fourmis sont placées par groupe de 10 dans une boîte de Petri (Ø 90mm), contenant un morceau de la meule du champignon (≈ 10 cm³) et une gaze saturée d'eau ; 250 fourmis sont ainsi testées. Dans une seconde expérience 40 fourmis sont isolées individuellement dans les mêmes conditions.

2.3. RESULTATS ET DISCUSSION.

2.3.1. Morphologie interne de la cavité buccale

La morphologie interne de la tête chez les Hyménoptères a été étudiée notamment chez *Apis* par SNODGRASS (1942). Pour les fourmis il faut remonter aux travaux de JANET (1905). En tenant compte des remarques de ces auteurs et de nos propres observations, les différentes parties de la cavité buccale sont localisées sur les figures générales 8a et 8b.

2.3.1.1. Le Labium.

Comme il est classique de l'observer chez les Hyménoptères, le post-labium de *Acromyrmex octospinosus* est court. Le prélabium allongé est composé d'une pièce impaire (le prémentum) qui porte distalement les 2 palpes labiaux à 3 articles. Les lobes comprennent une glossa (Gl) impaire. Celle-ci est contractile et tapissée d'un grand nombre de rangées de soies formant une véritable râpe (fig. 9). Cette morphologie est directement adaptée à la méthode de préparation du substrat végétal par les fourmis. Avant d'implanter le champignon symbiotique, celles-ci lèchent avec leur langue les fragments de feuilles pour en retirer les cires épicuticulaires ainsi que les micro-organismes (QUINLAN et CHERRETT, 1977 ; DECHARME, 1980). La base de la glossa est enveloppée dans les paraglosses (Pgl) entre lesquelles débouche le canal salivaire impair provenant des glandes labiales situées dans le thorax.

2.3.1.2. La poche infrabuccale et le prépharynx (fig. 10).

L'hypopharynx (Hp) à la suite du labium est formé antérieurement par la lingua (Lng). Après celle-ci, la poche infrabuccale (Pib), d'un volume permanent relativement important, est creusée dans le domaine hypopharyngien. La partie postérieure de l'atrium est transformée en prépharynx par soudure de l'hypopharynx (lèvre inférieure de la prébouche : Lip) et de l'épipharynx (Ep). Ainsi se constitue une pompe alimentaire, composée du prépharynx et d'une partie du pharynx, équipée dorsalement de puissants muscles dilatateurs provenant du clypéus (Cl), du front, ainsi que ventralement, du tentorium (T).

2.3.1.3. Le filtre.

L'examen des coupes transversales de la tête permet de localiser avec précision le filtre à l'entrée du prépharynx (Pph) où l'on observe (fig. 11) une accumulation de petits fragments solides. Pour décrire la morphologie fine de ce filtre

nous avons observé cette région (fig. 12) en microscopie électronique à balayage. Le transit des fragments solides à l'intérieur du prépharynx est empêché par la présence de soies très denses qui tapissent la lèvre inférieure de la prébouche d'une part et l'épipharynx d'autre part. Ces soies sont dirigées vers l'extérieur, en direction de la poche infrabuccale assurant ainsi une plus grande efficacité de la filtration. Leur morphologie est différente sur les deux parois. L'épipharynx est recouvert de soies simples et allongées ($\approx 20\mu\text{m}$), alors que la surface de la lèvre inférieure de la prébouche est garnie de digitations épicuticulaires alignées sur de nombreuses rangées qui se terminent d'une manière discontinue par des séries d'une dizaine de soies courtes (5 à $10\mu\text{m}$) (fig. 13).

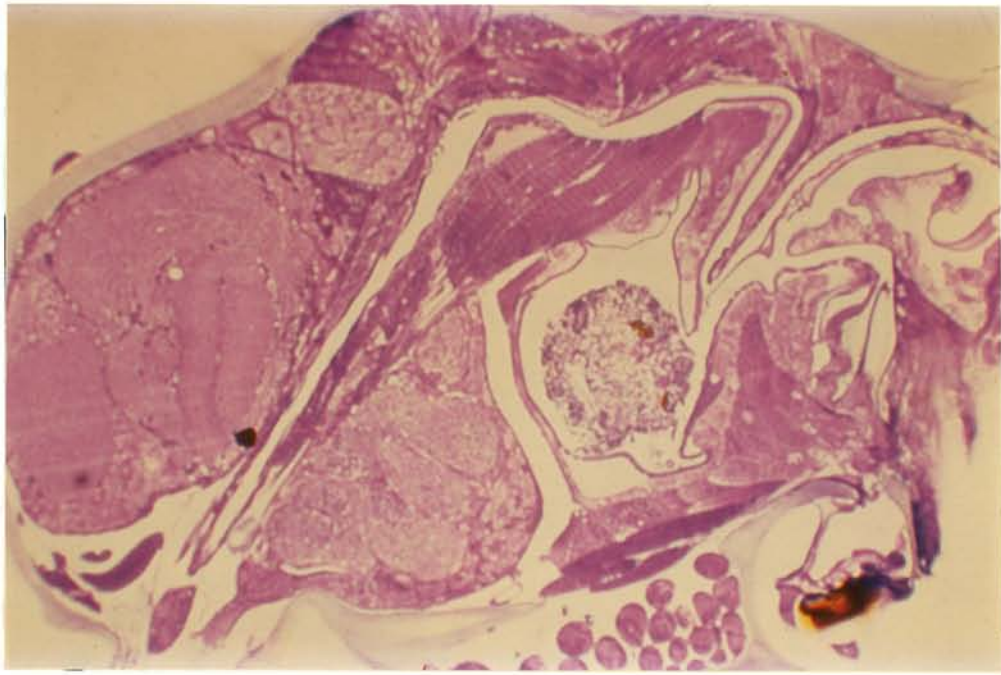
2.3.2. Prise de nourriture et filtration des particules solides.

La prise de nourriture chez *Acromyrmex octospinosus* a été plus particulièrement observée lors de la consommation du champignon symbiotique cultivé dans le nid. A l'aide de ses mandibules la fourmi prélève de petites quantités de *staphylae* (renflements terminaux des hyphes) et/ou d'hyphes du champignon. Un mouvement tournant imprimé par la glosse, les mandibules et les palpes contribue à former une boulette. A la suite de plusieurs extensions et rétractions du prémentum et des maxilles (Mx), celle-ci est ingérée puis, guidée par les maxilles légèrement écartées, pénètre dans la poche infrabuccale.

Le passage direct dans le prépharynx est rendu impossible par différentes dispositions. La première, observable sur la figure 8a, est liée au fait que le prépharynx ne se trouve pas dans l'axe de l'ouverture de la bouche mais vers la partie antérosupérieure de la tête. Ainsi lors de l'ingestion, la boulette alimentaire est obligatoirement entraînée vers la poche infrabuccale. De même, lors du mouvement de rétraction des maxilles, les lacinia (Lc) viennent obstruer en grande partie la prébouche et empêchent le passage dans le prépharynx.

Par rétraction du prémentum et des maxilles, l'orifice oral est fermé. La pompe alimentaire aspire alors le liquide contenu dans la poche infrabuccale. Dans ce mouvement, des petits fragments solides peuvent être entraînés, mais ils sont alors arrêtés efficacement par le filtre. L'accumulation de ces particules et l'obstruction du prépharynx sont évitées grâce à une morphologie particulière de la lacinia dont l'arrière présente une série de denticules (fig. 14). Lors des mouvements de va-et-vient de la maxille, cette brosse vient nettoyer les digitations épicuticulaires de la lèvre inférieure de la prébouche. Les particules sont décrochées et reviennent ainsi dans la poche infrabuccale.

(A)



200 μ m

(B)

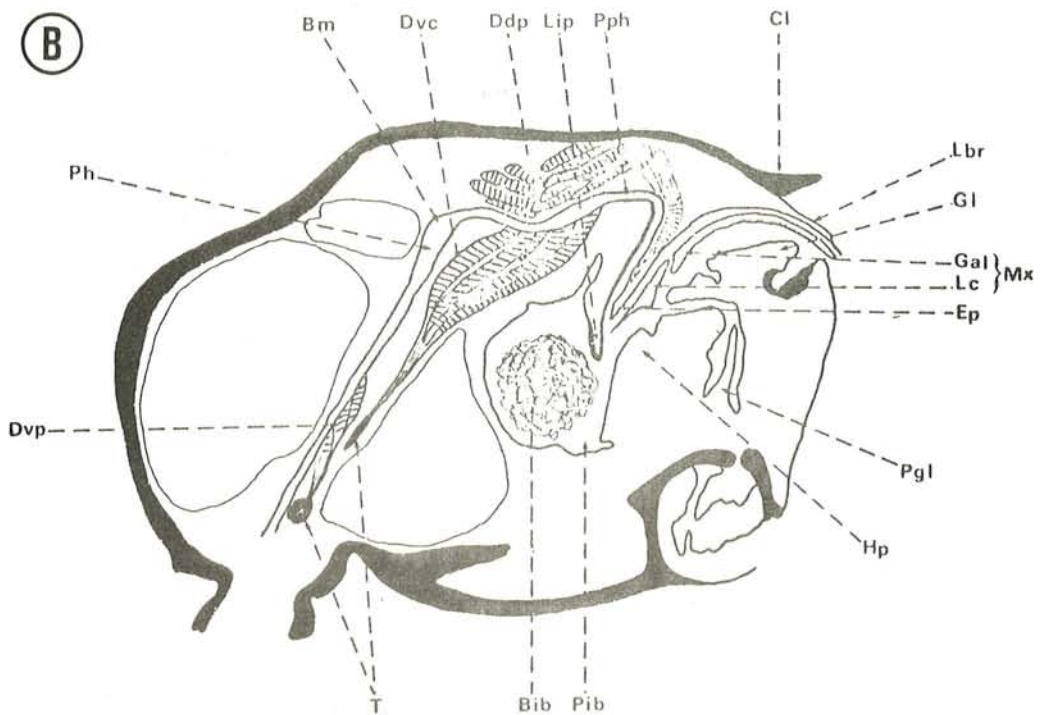


Figure n° 8 : A : Tête d'*Acromyrmex octospinosus* en coupe sagittale.

B : Schéma de la coupe sagittale de la tête d'*A. octospinosus*.

Bib = boulette infrabuccale ; Bm = bouche morphologique ; Cl = clypeus ; Ddp = dilatateurs dorsaux du prépharynx ; Dvc = dilatateurs ventraux du cibarium ; Dvp = dilatateurs ventraux du pharynx ; Ep = épipharynx ; Gal = galea ; Gl = glosse ; Hp = hypopharynx ; Lbr = labre ; Lc = lacinia ; Lip = lèvre inférieure de la prébouche ; Mx = maxille ; Pgl = paraglosse ; Ph = pharynx ; Pib = poche infrabuccale ; Pph = prépharynx ; T = tentorium.

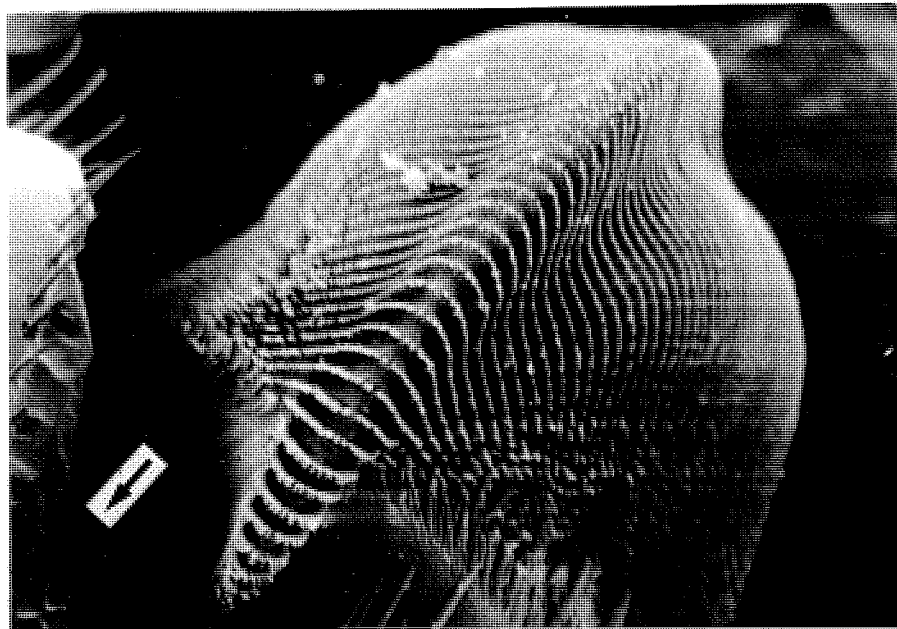


Figure n° 9 : La glosse organe d'ingestion et de nettoyage.
La flèche indique la direction de la poche infrabuccale.

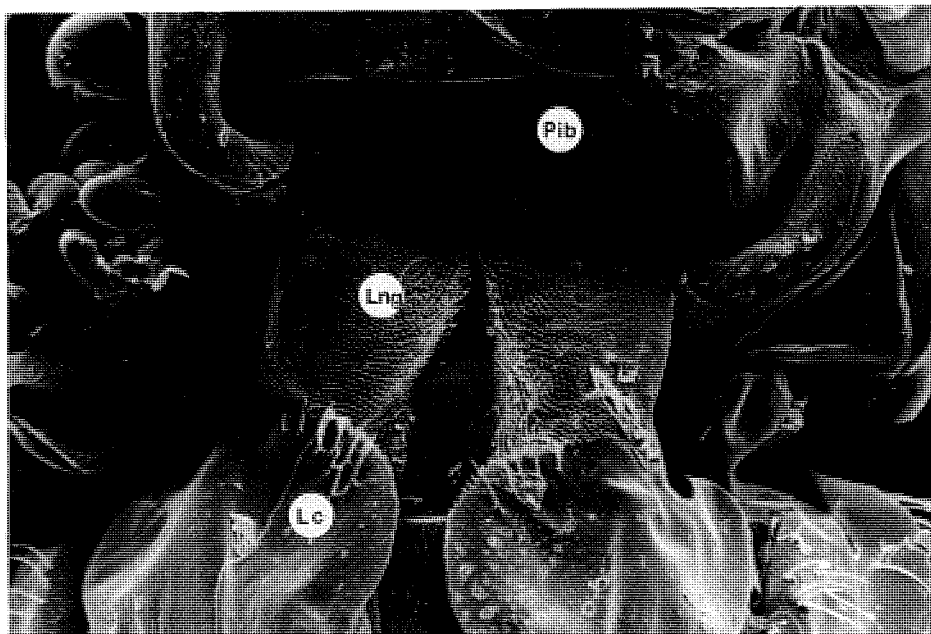


Figure n° 10 : Vue de face de l'hypopharynx, après extension des pièces buccales : la lingua (Lm) suivie de la poche infrabuccale. Au premier plan les lacinia (Lc).

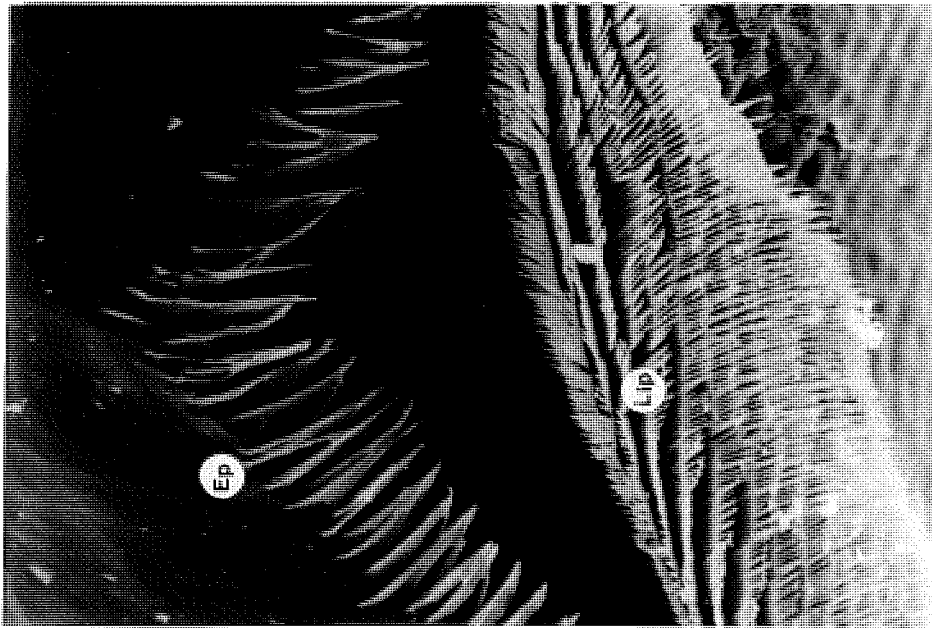


Figure n° 12 : Bouche fonctionnelle vue de face :
 le filtre infrabuccal. Ep : épipharynx,
 Lip : lèvre inférieure de la prébouche.

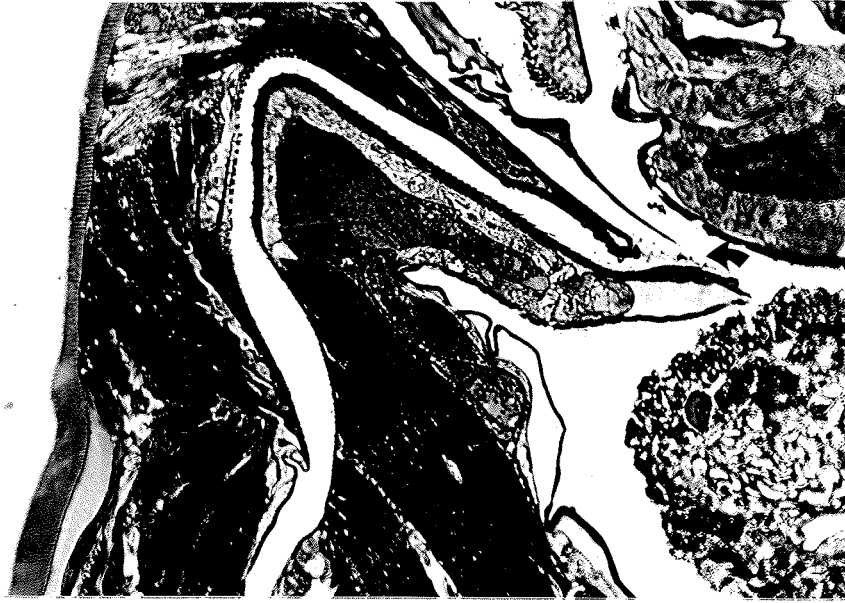


Figure n° 11 : Accumulation de particules solides à
 l'entrée du prépharynx. Coupe sagittale.

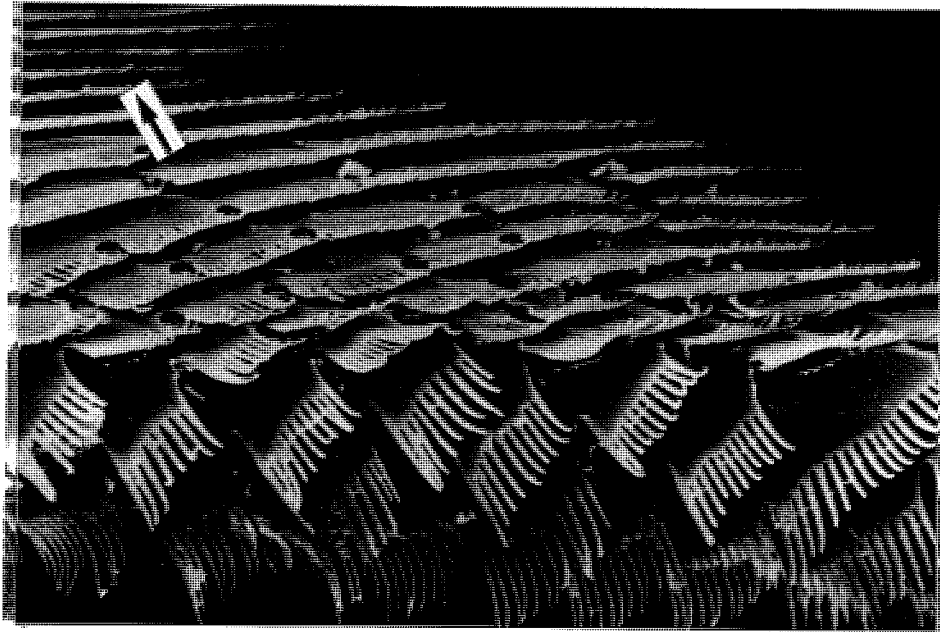


Figure n° 13 : Détails des digitations épicuticulaires de la lèvre inférieure de la prébouche. La flèche indique le sens de l'ingestion.

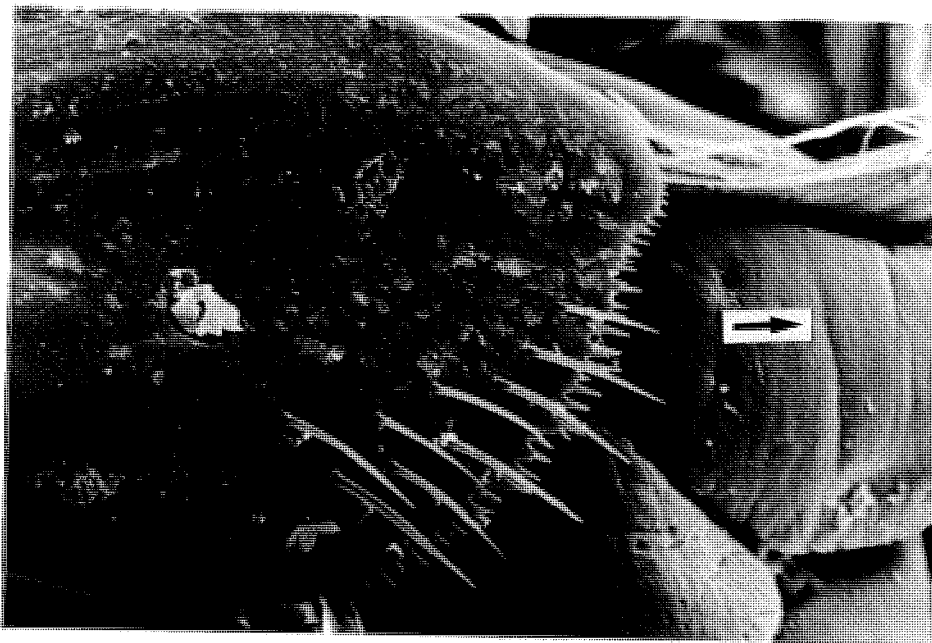


Figure n° 14 : La lacinia : organe de nettoyage du filtre. La flèche indique la direction de la poche infrabuccale.

2.3.3. Rôle de la poche infrabuccale.

Il paraît indiscutable que le rôle essentiel de la poche infrabuccale est le stockage du bol solide afin d'éviter le blocage du proventricule. Le seuil de filtration particulièrement bas chez les Attines (QUINLAN et CHERRETT, 1978), dont les échanges trophallactiques sont restreints (EISNER, 1957), permet de retenir les fins éléments solides dès la première ingestion du liquide. Ceci s'oppose aux Formicines dont le filtre infrabuccal laisse pénétrer des particules de 150µm dans le proventricule. Mais les régurgitations et les réingestions au cours des échanges trophallactiques entre ouvrières, plus fréquents chez les Formicides, réduisent les inconvénients d'une moins bonne filtration (EISNER et HAPP, 1962).

Toutefois, la poche infrabuccale n'a-t-elle qu'un rôle passif de filtration et de rétention des déchets solides ?

L'observation au microscope optique de nombreuses boulettes infrabuccales prélevées sur l'animal et dilacérées dans une goutte d'eau, révèle une composition complexe. Outre les hyphes du champignon ingérés au cours de l'alimentation de la fourmi, il est courant de retrouver des particules végétales. De plus, nous constatons que certaines boulettes renferment des Helminthes, principalement de l'ordre des Rhabditides. La présence de ces nématodes, décrite par ailleurs (KERMARREC, 1975) est liée au nettoyage constant du nid par les ouvrières.

On observe au niveau des boulettes la présence d'une abondante microflore. Cette microflore révélée par la mise en culture sur milieu Sabouraud (peptone Chapeaut 10 g/litre, glucose 20 g/litre et gélose 15 g/litre) est confirmée par l'observation en microscopie optique sur frottis de matériel frais ou après coloration suivant la méthode de GRAM, ainsi qu'en microscopie électronique à balayage.

Le séjour de la boulette dans la poche infrabuccale atteint plusieurs jours. Si on observe un pic de rejet des boulettes au bout de deux jours, ce n'est qu'après une semaine que 50% de celles-ci seront régurgitées. (QUINLAN et CHERRETT, 1978).

La durée de stockage associée à l'abondance de la microflore suggèrent la biodégradation des déchets organiques dans la poche infrabuccale et la récupération éventuelle d'éléments nutritifs par l'insecte. Dans l'expérience de QUINLAN et CHERRETT (1978), les fourmis ne sont pas en présence d'une source alimentaire. Si la régurgitation de la boulette est liée à la compression de la poche infrabuccale, un biais peut être induit dans l'évaluation du temps de stockage. Nous avons de ce fait entrepris une nouvelle estimation du rythme de rejet des boulettes sur des fourmis ayant accès au champignon symbiotique, source trophique naturelle.

Dans une première expérience réalisée sur 25 lots de 10 fourmis, nous avons comptabilisé dans chaque boîte, après une période de 24 heures, le nombre de boulettes régurgitées. Les résultats (fig. 15) montrent que pour la plus grande fréquence des cas observés, 12 boulettes sont recrachées en 24 heures par lot de 10 fourmis. Sur 25 lots observés, 21 (84%) ont rejeté plus de 10 boulettes. La moyenne théorique du nombre de boulettes recrachées par 10 fourmis est de 13,4 (SE : 1,0) en 24 heures.

Dans une seconde expérience réalisée sur 40 fourmis prises isolément, le nombre de boulettes régurgitées est comptabilisé toutes les 24 heures pendant 4 jours. Les résultats (figs. 16 et 17) ne tiennent compte que de 34 fourmis, 6 étant mortes au cours de l'expérience. L'histogramme de la figure 16 montre que pour la plus grande fréquence des cas observés une seule boulette est rejetée en 24 heures. Sur 136 périodes de 24 heures (34 fourmis x 4 périodes) on dénombre 102 cas (75%) où une fourmi a rejeté au moins une boulette. La figure 17 représente le nombre de boulettes rejetées par les fourmis sur une période de 4 fois 24 heures et visualise pour chaque fourmi la rapidité de régurgitation. Comme pour beaucoup de phénomènes biologiques, la courbe obtenue à une allure en cloche dissymétrique avec un étalement sur la droite. Ce résultat corroborant les précédents indique également une durée de stockage de la boulette de l'ordre de 24 heures. Cependant l'étalement de la courbe n'est pas négligeable : 25% des fourmis ont régurgité, pendant cette période de 4 jours, plus de 8 boulettes (soit en moyenne plus de 2 boulettes par jour).

Ces expériences révèlent que les fourmis, lorsqu'elles ont accès à leur source de nourriture, expulsent beaucoup plus rapidement leur boulette infrabuccale que dans les expériences décrites par QUINLAN et CHERRETT (1978) où les fourmis étaient isolées de leur champignon. Ce résultat vient appuyer l'hypothèse de l'inconfort, lié à la réplétion de la poche infrabuccale, déclenchant le rejet. D'un autre point de vue, le temps de stockage très court, comparé aux phénomènes de dégradation bactérienne, permet de rejeter l'hypothèse d'une digestion microbienne des substances organiques dans la poche infrabuccale. L'observation de la microflore contenue dans de nombreuses boulettes révèle, de plus, qu'il existe une grande diversité de formes. Selon le nid dans lequel sont prélevées les fourmis, selon le végétal fourni comme source d'affouragement, les souches bactériennes dominantes dans les boulettes sont très variables. Aussi il semble probable que ces bactéries, originaires du milieu extérieur, sont ingérées par les fourmis qui les stockent lors du nettoyage du matériel végétal et du nid.

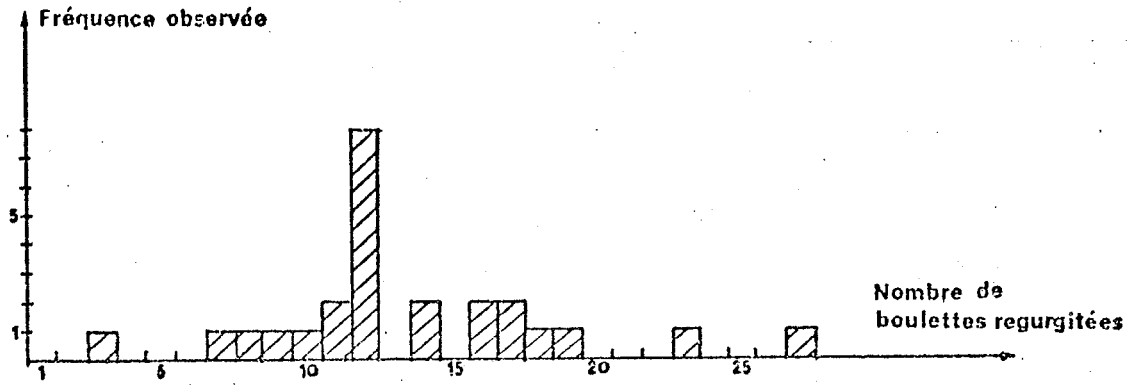


Figure n° 15 : Fréquence de régurgitation des boulettes infrabucales observée en 24h sur 25 lots de 10 fourmis.

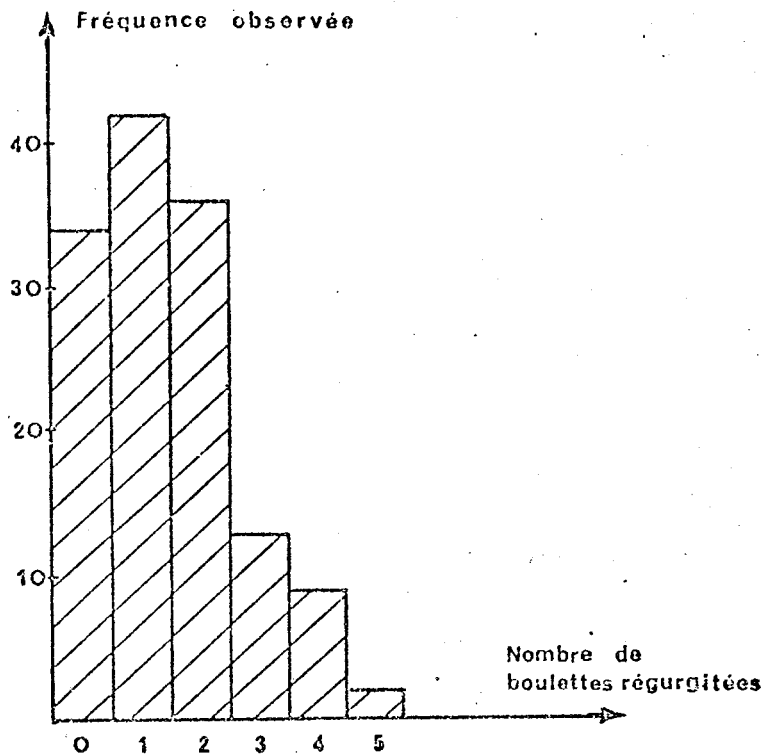


Figure n° 16 : Fréquence de régurgitation des boulettes infrabucales observée toutes les 24h sur 34 fourmis isolées pendant 4 jours.

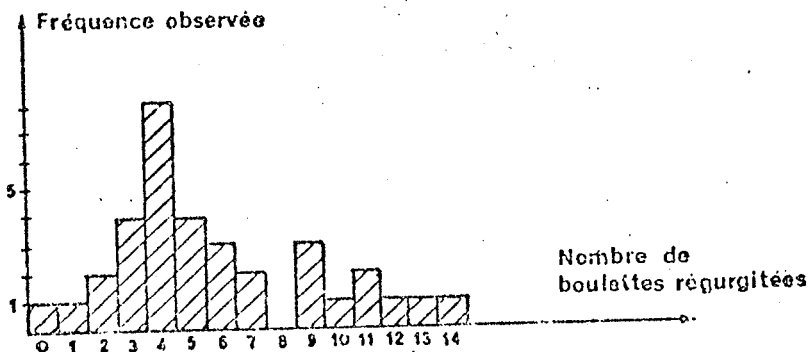


Figure n° 17 : Fréquence de régurgitation des boulettes infrabucales observée en 4 jours sur 34 fourmis isolées.

2.4. CONCLUSION.

L'étude morphologique du tube buccal d'*Acromyrmex octospinosus* et l'observation de la prise de nourriture ont permis de localiser le filtre infrabuccal et d'en comprendre le mécanisme.

Jusqu'ici seul un rôle passif de stockage des particules solides peut être retenu pour la poche buccale. Celle-ci se remplit pendant l'alimentation et lors des différents comportements de nettoyage. Sa vidange a lieu en moyenne une fois par jour en raison de la gêne causée par sa distension. Durant ce laps de temps assez court, la microflore abondante mais variable, ne paraît jouer aucun rôle notable dans la digestion des déchets organiques. Cependant ces quelques heures pourraient être suffisantes pour permettre certaines dégradations enzymatiques. En effet, bien qu'aucune glande digestive ne débouche directement dans la poche infrabuccale, on remarque que le contenu de la glande labiale, située dans le thorax, se déverse en avant de celle-ci, au niveau des paraglosses. Les aliments sont donc imprégnés de salive avant d'être stockés dans le sac infrabuccal. Il est dès lors possible que les activités enzymatiques de la salive interviennent.

3- ACTIVITES ENZYMATIQUES DES GLANDES SALIVAIRES ET DE L'INTESTIN MOYEN DES ADULTES
ET DES LARVES D'ACROMYRMEX OCTOSPINOSUS (REICH).

<< L'originalité de la chimie des êtres vivants réside surtout dans les enzymes. C'est grâce à la spécificité de la catalyse enzymatique, à sa précision, à son efficacité que peut se tisser le réseau de toutes les opérations chimiques...>>.

JACOB F. 1970

La logique du vivant

Une histoire de l'hérédité

3.1. INTRODUCTION.

Le champignon des Attines était considéré jusqu'en 1972 comme leur seule source de nourriture (BELT, 1874 ; MULLER, 1874 ; WHEELER, 1907 ; WEBER, 1972). L'analyse chimique du symbiote d'*Atta colombica tonsipes* (SANTSCHI) indique qu'il est composé de 27% d'hydrates de carbone, 4,7% d'acides aminés libres, 13% d'acides aminés liés aux protéines et 0,2% de lipides (MARTIN et al, 1969b) et WEBER (1972) considère celui-ci comme une excellente alimentation pour les fourmis. Cependant différents auteurs ont montré qu'elles consomment aussi des liquides ; ECHOLS (1966) rapporte l'ingestion apparente d'huile végétale chez *Atta texana* (BUCKLEY). L'absorption de la sève des plantes à partir du végétal découpé, signalée par BARRER et CHERRETT (1972) est démontrée à l'aide de marqueurs radioactifs par LITTLEDYKE et CHERRETT (1976). Quelle que soit la source de nourriture (le végétal supérieur ou le symbiote), chez les fourmis adultes, seule la partie liquide de l'alimentation est ingérée jusqu'au niveau de l'estomac. En effet comme nous venons de le voir, les éléments solides, dont la taille est supérieure à 10µm, sont retenus dans la poche infrabuccale (QUINLAN et CHERRETT, 1978). En conditions normales d'alimentation, ces "déchets" sont retenus pendant environ une journée.

Les larves (immobiles) sont nourries directement par les ouvrières au moyen de boulettes de *staphylae* (groupe dense de renflements terminaux des hyphes) collectées sur la meule fongique. La boulette, malaxée entre les mandibules, les maxilles et la glosse, (parfois par plusieurs ouvrières consécutives), est déposée sur la larve au niveau des pièces buccales (observations personnelles au vidéoscope). Les larves, contrairement aux fourmis adultes, ingèrent les éléments solides et en particulier les parois des hyphes. Le champignon cultivé dans le nid semble être la seule source de nourriture du couvain. En consommant le jus des *staphylae*, les ouvrières et la reine ne disposent pas de l'énergie suffisante pour leurs besoins respiratoires. Les larves ingèrent les *staphylae* en totalité et se procurent ainsi assez d'énergie pour leur respiration et leur croissance (QUINLAN et CHERRETT, 1979).

Lors de la préparation du substrat végétal pour l'implantation du champignon, les ouvrières déposent des gouttes de liquide rectal. Aussi nombreux sont, dans le cadre du fonctionnement de la symbiose champignon-insectes, les travaux qui ont décrit récemment les activités enzymatiques du liquide rectal des Attines (MARTIN et MARTIN, 1970, 1971 ; MARTIN et al, 1973, 1975 ; BOYD et MARTIN, 1975a, b).

Aucune étude ne porte toutefois sur la présence et l'identification d'une gamme d'enzymes digestives chez les Attines. De telles informations devraient permettre de mieux appréhender les problèmes nutritionnels par le biais des capacités digestives de ces fourmis et de préciser l'existence d'une digestion des éléments organiques contenus dans la poche infrabuccale. Les activités enzymatiques digestives d'*A-cromyrmex octospinosus* (REICH) (adultes et larves) sont analysées ici au moyen d'une micro-méthode semi-quantitative.

Cette étude n'a pu être réalisée qu'après description de l'anatomie du tractus digestif adulte et larvaire.

3.2. ANATOMIE DU SYSTEME DIGESTIF.

3.2.1. L'adulte.

L'appareil digestif des ouvrières d'*Acromyrmex octospinosus* a été étudié par PAPARO (1972). Son anatomie est très similaire à celle des *Formicidae*. Lors des dissections nous n'avons pas observé de différence entre les ouvrières de taille différente.

Le tractus digestif chez *A. octospinosus* s'étend sur toute la longueur du corps. Il débute par la cavité préorale entourée des pièces buccales. Viennent ensuite la poche infrabuccale, le tube buccal, le pharynx avec les glandes post-pharyngiennes, l'oesophage, le jabot, le proventricule, l'estomac, l'intestin dans lequel débouchent les tubes de Malpighi et, le rectum (fig. 18).

La cavité préorale ainsi que la poche infrabuccale sont traitées dans le chapitre précédent.

Le pharynx est aplati dorsoventralement, ses bords sont sclérifiés et il se termine postérieurement en fuseau. A l'arrière du pharynx, dans sa partie dorsale, arrivent deux conduits latéraux qui proviennent chacun de 6 à 7 tubules courts des glandes post-pharyngiennes (fig. 19). Les tubules de ces glandes s'étendent jusqu'au-dessus des lobes antennaires du cerveau, vers les parois latérales de la tête et jusqu'au milieu du pharynx.

Immédiatement à l'arrière des conduits des glandes post-pharyngiennes, le pharynx plonge ventralement et se rétrécit pour former l'oesophage. Ce dernier traverse la tête, le thorax et le pétiole pour entrer dans l'abdomen. L'oesophage, de diamètre uniforme le long du thorax, se rétrécit légèrement au niveau cervical et lorsqu'il traverse le pétiole.

A son entrée dans l'abdomen l'oesophage se dilate considérablement pour former le jabot dont la paroi mince est encore chitinisée. Cet organe se situe dans la portion dorsale du 4ème segment abdominal.

De la paroi ventrale du jabot part un court tube : le proventricule. Sa partie postérieure pénètre dans l'estomac et forme la valvule cardiaque (ou stomodéale). L'estomac est usuellement ovoïde, et de taille variable. Il s'étend généralement le long des 4ème et 5ème segments abdominaux et débouche sur un intestin en forme d'S. L'intestin est tubulaire et d'un diamètre constant sur toute sa longueur ; la valvule pylorique (ou proctodéale) le sépare du rectum.

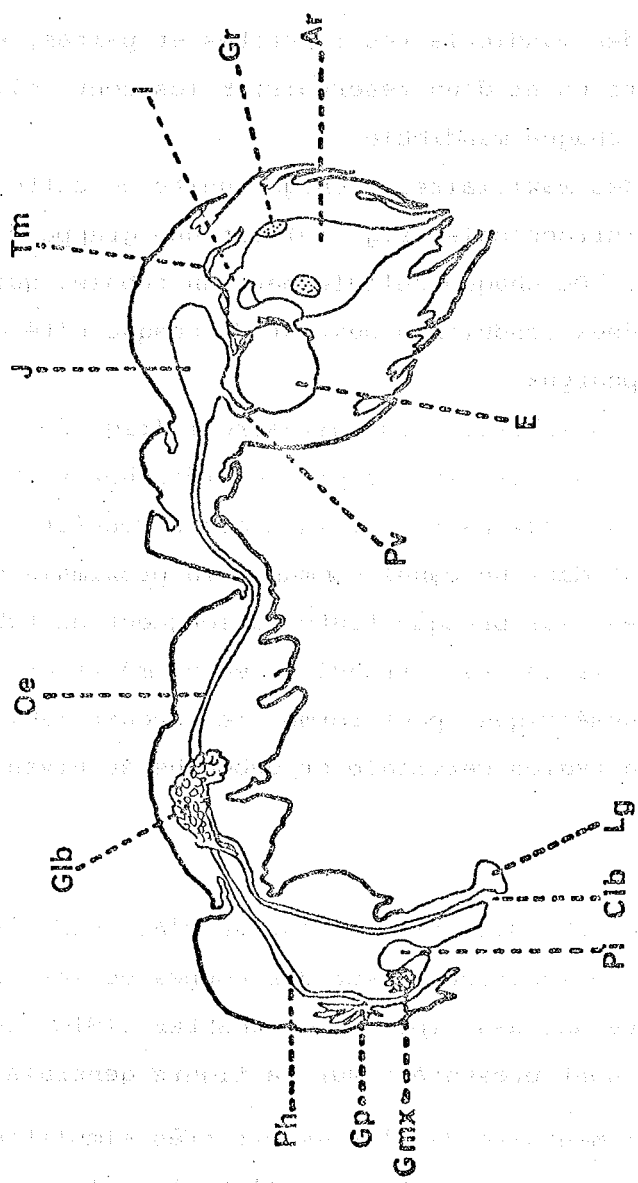


Figure n° 18 : Schéma de l'anatomie du tube digestif et des glandes annexes de la fourmi (d'après JANET).

Ar : ampoule rectale, *Clb* : canal terminal de l'appareil labial, *E* : estomac,
Glb : glandes labiales, *Gmx* : glandes maxillaires, *Gp* : glandes post-pharyngiennes,
Gr : glandes rectales, *I* : intestin, *J* : jabot, *Lg* : langue, *Oe* : oesophage, *Ph* : pharynx,
Pi : poche infrabucale, *Pv* : proventricule, *Tm* : tubes de Malpighi.

Les tubes de Malpighi se déversent individuellement dans le tube digestif à la jonction de l'estomac et de l'intestin. Uniformes, ils sont libres dans l'abdomen. On compte généralement six tubes de Malpighi, mais pour près de 10% des fourmis disséquées, ce nombre était de huit.

Le rectum des Attines est un large sac très dilaté à paroi mince. Sa partie antérieure est coiffée de trois pelotes rondes : les glandes rectales. L'orifice anal est situé sur le 10ème segment abdominal.

Trois paires de glandes, dites tégumentaires, sont en relation avec le tube digestif. Ce sont :

- Les glandes mandibulaires : petites et paires, elles sont formées chacune de cellules sécrétrices et d'un réservoir. Elles sont collées contre la paroi de la tête à la base de chaque mandibule.

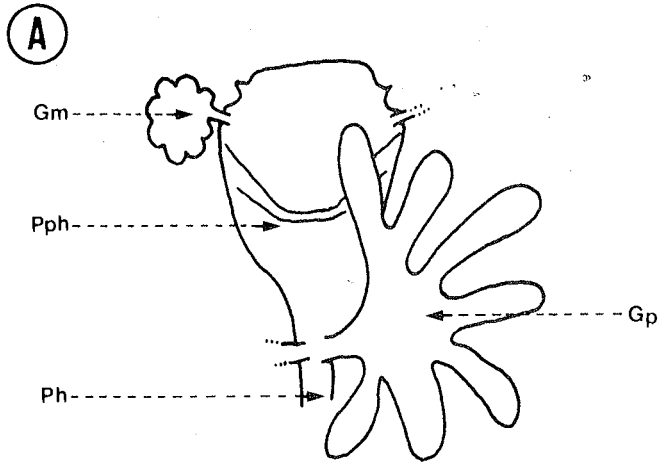
- Les glandes maxillaires : chaque unité de cette glande située de part et d'autre de la poche infrabuccale (fig. 19) est une grappe d'environ quarante grandes cellules sécrétrices. De chaque cellule part un tubule, qui se rejoignent et forment un conduit commun. Les deux conduits s'ouvrent de chaque côté du tube buccal immédiatement à l'avant du prépharynx.

- Les glandes labiales (ou salivaires) (fig. 20) : elles sont situées dans les régions dorsale et latérale des pro- et mésothorax. Elles sont paires et chaque unité est formée de deux parties : la distale consiste en une série de tubules enroulés qui se déversent dans un canal commun ; la proximale est formée de rangées de cellules qui s'étendent sur presque toute la longueur du tube provenant de la portion distale. Le conduit labial est irrégulier en diamètre et se poursuit antérieurement en rejoignant son symétrique, pour former le conduit labial commun. Ce dernier traverse ventralement la région cervicale et débouche au niveau du labium.

3.2.2. La larve.

L'anatomie du tube digestif des larves d'Attines n'a jamais été décrite. Nous l'avons étudiée par dissection et sur des coupes de larves d'*Acromyrmex octospinosus*. En tenant compte des descriptions de WHEELER (1910) chez les *Formicidae*, les différentes parties sont présentées sur la figure générale n° 21.

Le tractus alimentaire des larves est très simplifié par rapport à celui des adultes. Il ne comporte aucun filtre buccal et tous les aliments sont ingérés. Cependant la morphologie des pièces buccales révèle de façon évidente que ces aliments sont broyés avant d'être absorbés.



(B)

250µm



(C)

100µm

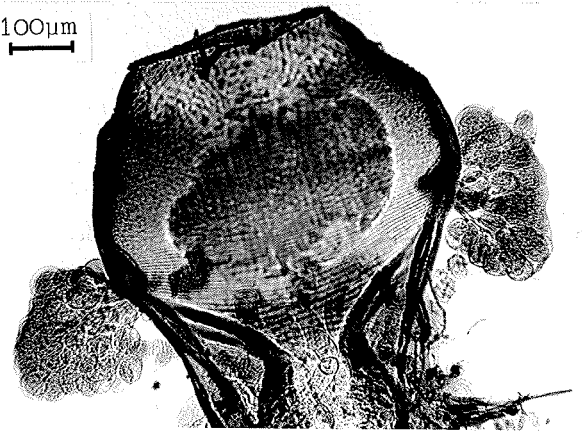
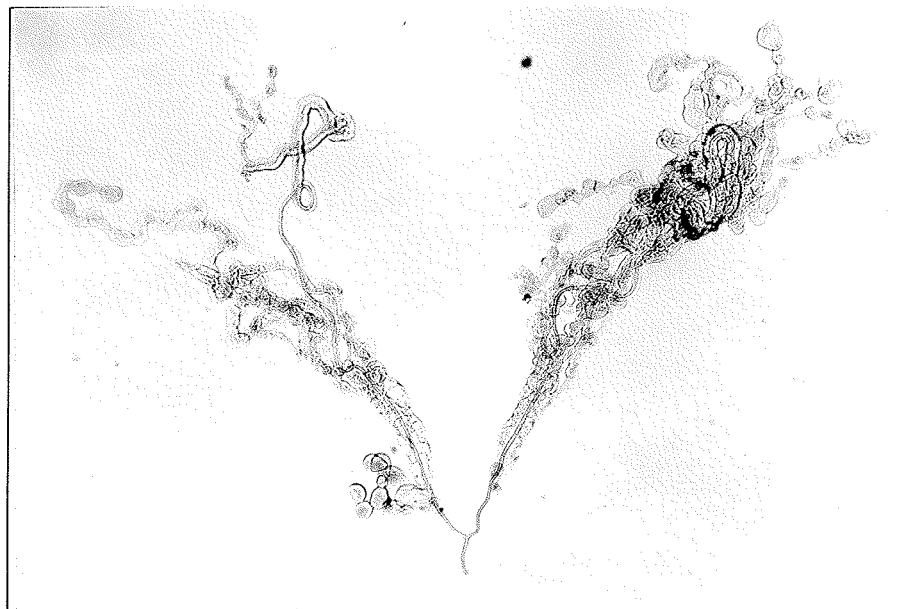


Figure n° 19 : A : Schéma positionnant les glandes post-pharyngiennes et maxillaires. Gm : glandes maxillaires ; Gp : glandes post-pharyngiennes ; Ph : pharynx ; Pph : prépharynx
 B : Les glandes post-pharyngiennes.
 C : Les glandes maxillaires.



500 µm

Figure n° 20 : Les glandes labiales

(A)



300 μ m

(B)

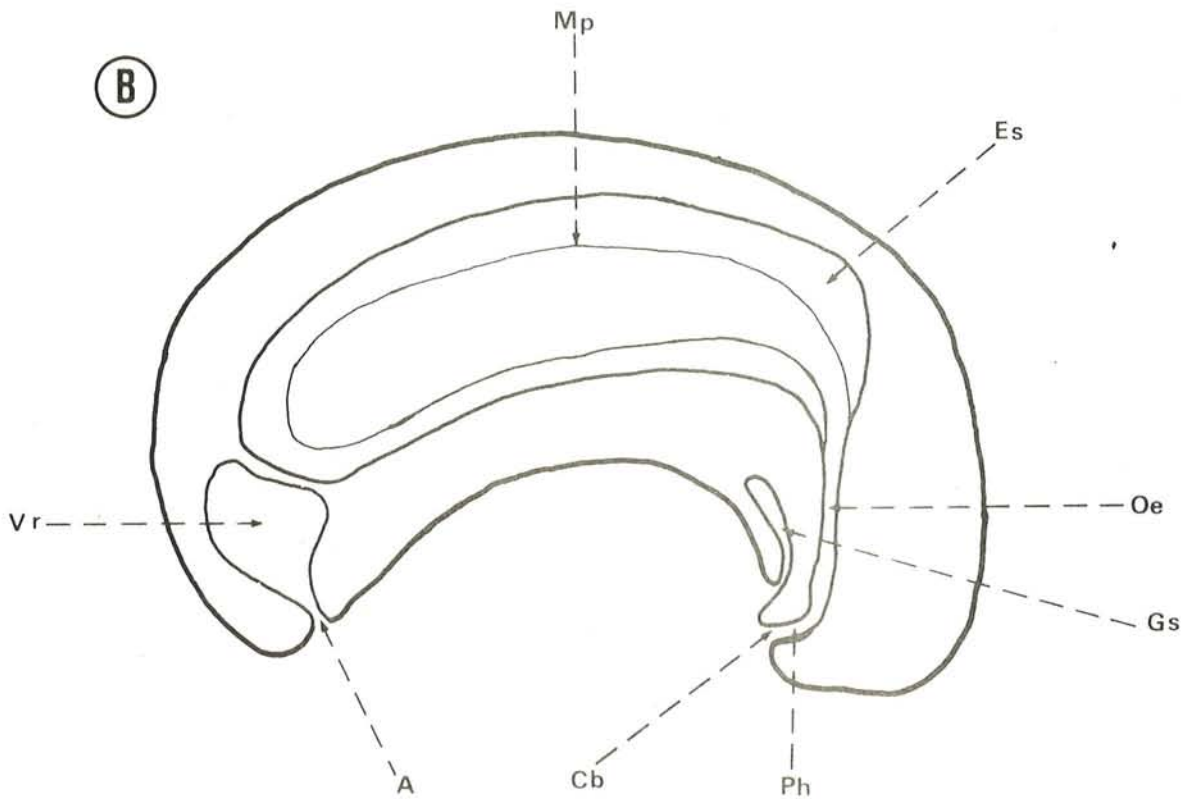


Figure n^o 21 : A : larve d'*Acromyrmex octospinosus* en coupe sagittale.

B : Schéma de cette coupe : A : anus, Cb : cavité buccale, Es : estomac, Gs : glande salivaire, Mp : membranes péritrophiques, Oe : oesophage, Ph : pharynx, Vr : vésicule rectale.

Les mandibules de forme attoïde (WHEELER et WHEELER, 1976), larges et courtes, sont terminées à l'apex par une longue dent pointue. Leur rôle consiste à percer et à prélever le mycélium déposé ventralement par les ouvrières sur les somites thoraciques.

La cavité buccale est fermée dorsalement par le labre et ventralement par le labium qui forment, selon WHEELER et WHEELER (1976), le trophorhinium. Ces deux parois opposées sont tapissées d'une multitude de denticules chitininés qui par frottement, triturant les aliments avant leur passage dans le pharynx.

Le court pharynx et l'oesophage sont d'origine ectodermique. Le pharynx est asymétrique : sa paroi ventrale est épaisse et fortement chitinisée (fig. 22). Des muscles relient sa paroi dorsale, ainsi que les parties latérales au tégument. Ils fonctionnent comme dilatateurs durant les mouvements d'aspiration de la larve.

Dans sa partie postérieure l'oesophage s'ouvre par une valvule cardiaque dans l'estomac (fig. 23) qui, allongé et clos, occupe la plus grande partie du corps de la larve. Le bol alimentaire est enfermé dans une série de membranes péritrophiques protectrices, caractéristiques des insectes à alimentation solide (SNODGRASS, 1935). A la mue nymphale ces membranes, contenant les aliments non digérés, seront rejetées et formeront le méconium.

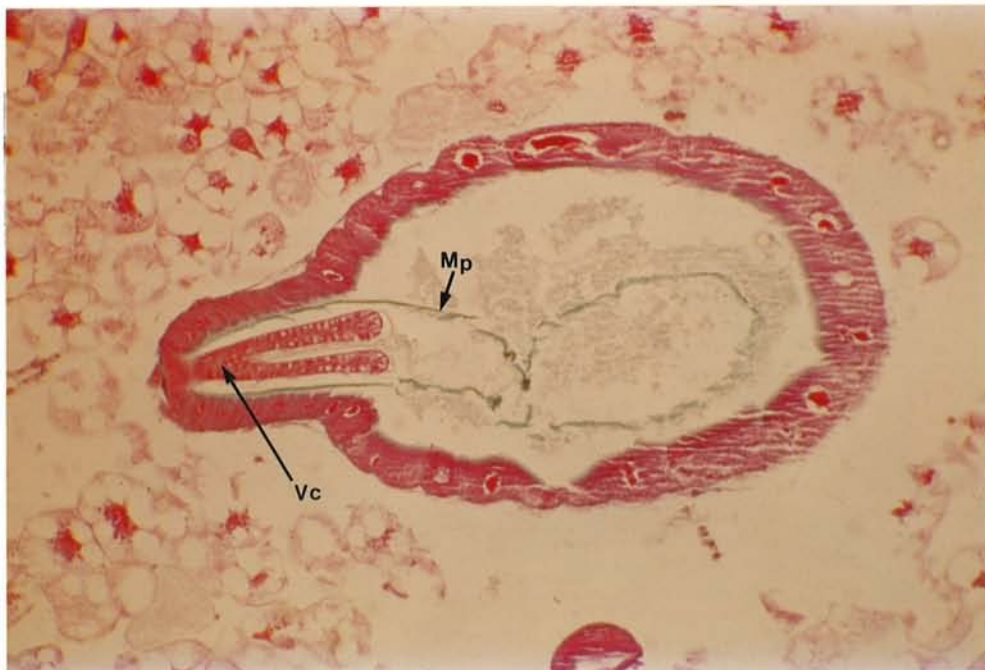
La vésicule rectale (fig. 24), est formée par une invagination de l'ectoderme. Elle reçoit les tubes de Malpighi et débouche sur l'extérieur par un anus fonctionnel. Bien qu'il n'y ait aucune communication directe entre l'estomac et le rectum, leurs parois sont intimement soudées ce qui laisse entrevoir un rôle de dialyse stomacale.

Face ventrale, dans la cavité générale, on trouve une paire de glandes salivaires. Ce sont les seules glandes exocrines connues chez la larve. Elles donneront les glandes labiales de l'adulte (GRASSE, 1951). Ces glandes ne sécrètent de la soie (glandes séricigènes) que chez les fourmis dont la nymphose se déroule dans un cocon. Chez les Attines les nymphes restent nues et nous n'avons jamais pu observer chez *Acromyrmex octospinosus* une quelconque sécrétion de soie. Ces deux glandes tubulaires se réunissent en un canal commun qui s'ouvre ventralement à l'extérieur au niveau du 1er somite thoracique (fig. 25).



40 μ m

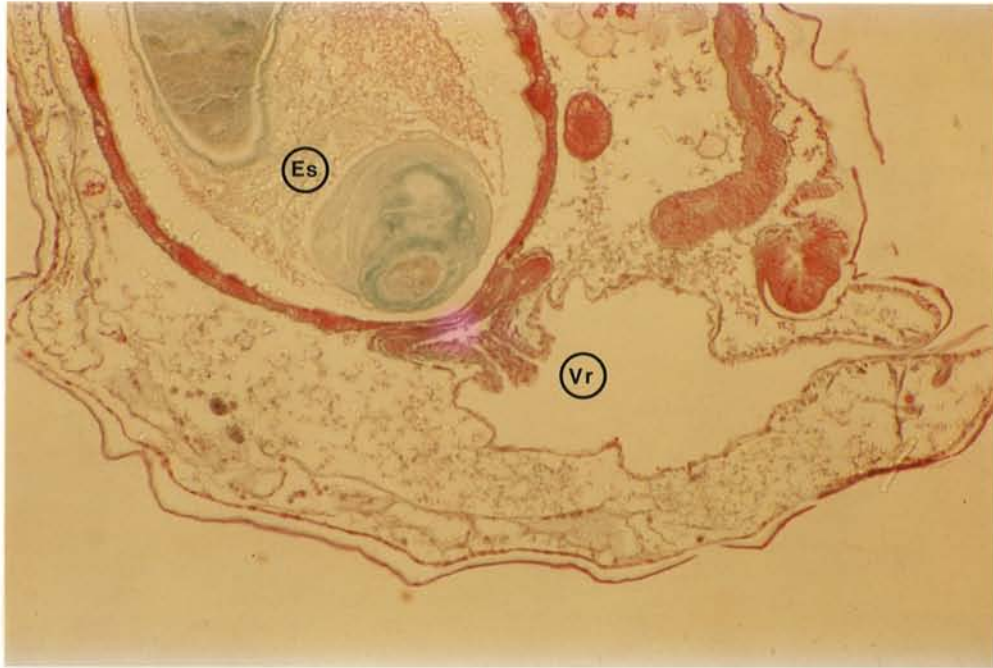
Figure n° 22 : Le pharynx : Pv : paroi ventrale du pharynx fortement chitinisée ; Ddp : muscles dilatateurs dorsaux du pharynx.



100 μ m

Figure n° 23 : Jonction de l'oesophage et de l'estomac : Vc : valvule cardiaque ; Mp : membranes péritrophiques.

COUPE LONGITUDINALE D'UNE LARVE DE 4^{ème} STADE



150 μ m

Figure n° 24 : Parois de l'estomac (Es) et de la vésicule rectale (Vr) intimement accolées.

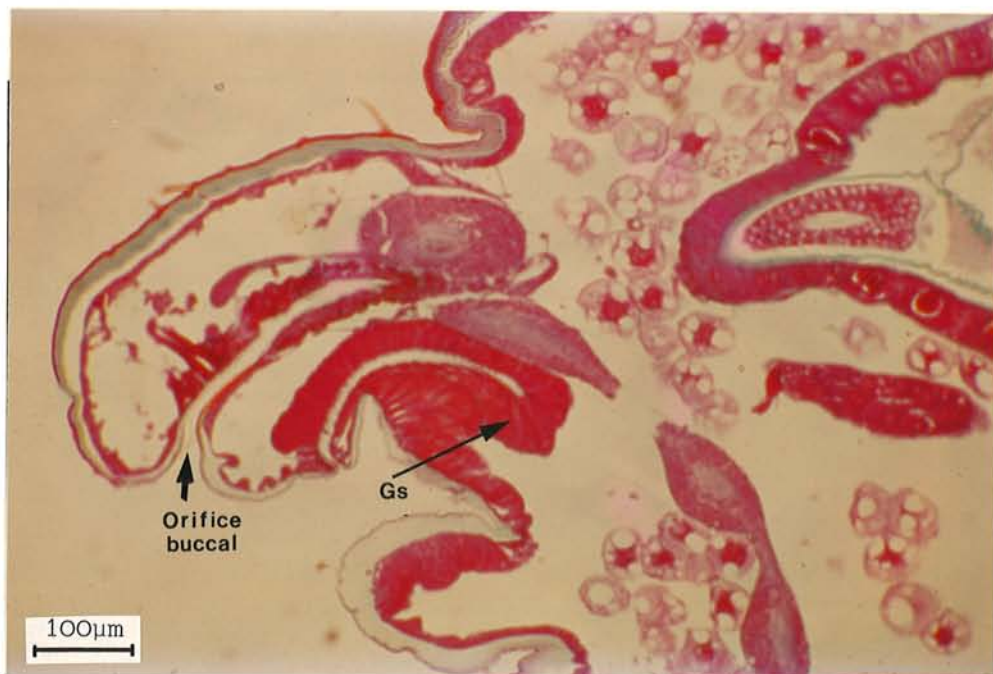


Figure n° 25 : Ouverture vers l'extérieur des glandes salivaires (Gs).

3.3. ENZYMOLOGIE DES GLANDES SALIVAIRES ET DE L'INTESTIN MOYEN : MATERIEL ET METHODES.

3.3.1. Principe de la méthode.

Les activités enzymatiques sont mises en évidence à l'aide de la micro-méthode Apizym, décrite par NARDON et al (1976). Elle peut s'appliquer aussi bien aux cellules, tissus et organes qu'aux liquides biologiques. Le dispositif comprend différentes plaquettes à cupules contenant le substrat tamponné de l'activité recherchée. Cette technique permet ainsi de déceler rapidement et simultanément des activités enzymatiques différentes dans un même extrait biologique. Celles retenues pour cette étude figurent au tableau n° III. Cette méthode, d'utilisation facile, a cependant ses limites (MONGET, 1978). L'emploi d'un échantillon biologique brut peut produire des interférences, liées d'une part à la présence éventuelle d'inhibiteurs dans l'extrait, d'autre part à ce que la positivité d'une activité peut être le résultat de plusieurs enzymes. Certains caractères manquent de spécificité. En effet, des enzymes distinctes sont capables de scinder un même substrat et à l'inverse une enzyme peut hydrolyser plusieurs substrats différents. En raison de ces limites il convient de parler d'*activités* enzymatiques plutôt que d'enzymes au sens strict, même si des commodités de langage nous font parfois utiliser ce vocable.

3.3.2. Protocole opératoire.

Les animaux utilisés proviennent de nids du laboratoire, gardés à 25-30°C, 70-80% HR et approvisionnés quotidiennement avec du matériel végétal varié. La dissection des fourmis est réalisée sous la loupe binoculaire dans le liquide de Yeager⁽¹⁾ de pression osmotique : 440m Osm et de pH : 6,8. Les tissus à tester sont broyés mécaniquement dans 6ml d'eau distillée ; les broyats ainsi obtenus sont centrifugés pendant 10 minutes à 12000g. Toutes ces opérations sont effectuées entre 0 et 4°C. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux enzymes excrétées par les tissus et seules les diastases solubles dans l'eau sont recherchées. Les culots de centrifugation, et par conséquent les enzymes éventuellement adsorbées sur ceux-ci, sont écartés. Deux gouttes, soit environ 40µl de surnageant, sont disposées dans chaque cupule des galeries Apizym. Les plaquettes sont mises à incuber à 37°C pendant 4 heures. La révélation de l'activité enzymatique de chaque cupule se fait par addition, pour les substrats au nitrophénol, d'une goutte de soude 1N (passage en milieu alcalin) et pour les substrats au naphтол, d'une goutte de solution chromogène au Fast Blue BB. Après formation du colorant azoïque (5 à 10 mn), l'excès de Fast Blue BB est éliminé par l'exposition à une lumière intense. Les intensités des colorations obtenues dans chaque cupule

(1) Composition du liquide de Yeager : NaCl : 10g ; KCl : 1,5g ; CaCl₂ : 0,5g ; NaHCO₃ : 0,18g ; NaH₂PO₄ : 0,01g ; Glucose : 1g ; Lévéulose : 0,4g ; Maltose : 15g ; complété à 1 litre avec de l'eau distillée.

Groupes d'enzymes	Enzymes	Substrats	pH de la cupule
Osidases	α D-galactosidase	6.br -2 naphtyl - α D- galactopyranoside	5,4
	β D-galactosidase	-2 naphtyl - β D- galactopyranoside	5,4
	α D-glucosidase	-2 naphtyl - α D- glucopyranoside	5,4
	β D-glucosidase	6 br -2 naphtyl - β D- glucopyranoside	5,4
	N-acétyl- α D-glucosaminidase	p- nitrophenyl -N-acétyl- α D- glucosaminide	5,4
	N acétyl- β D-glucosaminidase	1- naphtyl -N-acétyl- β D- glucosaminide	5,4
	α L-fucosidase	2- naphtyl - α L- fucopyranoside	5,4
	β L-fucosidase	p- nitrophenyl - β L- fucopyranoside	5,4
	β D-fucosidase	p- nitrophenyl - β D- fucopyranoside	5,4
	β D-lactosidase	p- nitrophenyl - β D- lactoside	5,4
	α D-mannosidase	6 br -2 naphtyl - α D- mannopyranoside	5,4
	β D-mannosidase	p- nitrophenyl - β D- mannopyranoside	5,4
	α D-xylosidase	p- nitrophenyl - α D- xylopyranoside	5,4
	β D-xylosidase	p- nitrophenyl - β D- xylopyranoside	5,4
Endopeptidases	Trypsine	N- benzoyl -DL arginine -2- naphtylamide	8,5
	Chymotrypsine	N- benzoyl -DL phenyl alanine -2- naphtylamide	7,1
Exopeptidases	Leucine arylamidase	L- leucyl -2- naphtylamide	7,5
	Valine arylamidase	L- valyl -2- naphtylamide	7,5
	Cystine arylamidase	L- cystyl -2- naphtylamide	7,5
Estérase - Lipase	Estérase (C4)	2- naphtyl butyrate	7,1
	Estérase-Lipase (C8)	2- naphtyl caprylate	7,1
	Lipase (C14)	2- naphtyl myristate	7,1

TABLEAU III : Liste des enzymes retenues pour cette étude. Dans ce tableau figure également le substrat de chaque enzyme et le pH correspondant.

sont proportionnelles aux activités enzymatiques correspondantes. On évalue semi-quantitativement les intensités par une note de 0 à 5 : la valeur 0 correspond à une absence de coloration semblable au témoin (cupule n° 1), la valeur 5 (intensité maximale) correspond à la libération enzymatique de 40 (et plus) nanomoles de naphтол (MONGET, 1978).

3.3.3. Les différents tissus étudiés.

La recherche des enzymes intervenant dans la digestion est effectuée sur les adultes (ouvrières et sexués mâles ou femelles) et sur les larves âgées (avant-dernier stade larvaire) en rejetant toutefois les prénymphe (dernier stade larvaire âgé contenant déjà la nymphe). Les stades larvaires ont été définis par ailleurs (TORREGROSSA et al, 1981).

Sur les adultes 3 glandes salivaires paires (maxillaires, labiales et post-pharyngiennes) sont étudiées. Les glandes mandibulaires ne sont pas considérées dans ce travail car elles ne paraissent pas avoir, chez les fourmis, de rapport avec les processus de digestion. Chez les Attines, elles sécrètent des phéromones d'alarme (MOSER et al, 1968 ; CREWE et BLUM, 1972 ; RILEY et al, 1974). Pour le tube digestif nous avons retenu la partie la plus riche en cellules sécrétrices : l'intestin moyen ou estomac. Avant d'être broyé celui-ci est vidé de son contenu et rincé. Le jabot, simple poche sans rôle sécrétoire, est omis.

Les enzymes des larves sont recherchées dans l'intestin moyen isolé, sur la membrane sécrétrice ainsi que sur la membrane péritrophique contenant l'ingesta. Nous avons aussi retenu la paire de glandes salivaires de la larve.

Les activités enzymatiques du champignon symbiotique sont également recherchées. Celui-ci, unique nourriture des larves et pour partie des adultes, pourrait être un fournisseur d'enzymes pour les fourmis. En effet, BOYD et MARTIN (1975b) montrent la présence des enzymes du symbiote dans le liquide rectal de *Atta texana*. Ces protéines enzymatiques d'origine alimentaire ne sont pas dégradées dans le tube digestif de l'animal. Cette étude est effectuée sur du champignon cultivé en milieu semi-synthétique liquide (Yeast Nitrogène base : 6,7g ; Glucose : 10g ; Asparagine : 1g ; extrait de levure : 1g ; complété à 1 litre avec de l'eau distillée). Avant d'être broyé, le mycélium est rincé plusieurs fois à l'eau distillée.

Pour chaque tissu étudié, des essais préliminaires déterminent les concentrations en matériel biologique en vue d'une réponse optimale des galeries Apizym.

Pour un volume de 6 ml d'eau distillée les concentrations ainsi déterminées sont de :

30 à 40 paires de glandes

ou 15 à 20 estomacs

ou 100mg (poids frais) de champignon.

Les résultats correspondent aux moyennes de 3 répétitions par tissu testé.

Chaque lot de plaquettes Apizym est contrôlé par un témoin soumis à l'eau distillée.

3.4. RESULTATS ET DISCUSSION.

3.4.1. Activités enzymatiques révélées chez les adultes.

Les activités enzymatiques des différents tissus étudiés chez les adultes sont présentées dans le tableau n° IV. Les zymogrammes de l'estomac et des glandes labiales sont respectivement similaires chez les ouvrières et chez les sexués (mâles ou femelles), si l'on fait exception de quelques différences mineures dans l'intensité de certaines activités.

3.4.1.1. Les glandes post-pharyngiennes.

Les glandes post-pharyngiennes sont des diverticules ectodermiques du tube digestif antérieur. Seules des activités α glucosidasique et estérasique sont décelées. Leur faible niveau d'intensité (note maximale 1) permet d'éliminer un rôle digestif pour ces enzymes qui se rattachent vraisemblablement au métabolisme de base des cellules. Des études enzymatiques ont été réalisées sur ces glandes chez différentes espèces de fourmis ; *Formica polyctena* (PAULSEN, 1971) ; *F. integra*, *F. fusca*, *Acanthomyops claviger*, *Camponotus herculeanus*, *C. pennsylvanicus* (AYRE, 1967) ; *Messor capitatus* (DELAGE, 1968) ; *Myrmica rubra* (ABBOTT, 1978). Aucune osidase ou endopeptidase ne furent trouvées. Trois exopeptidases ont été mises en évidence chez *Messor*, mais l'auteur semble leur attribuer une origine alimentaire et non pas endogène. La lipase, usuellement présente dans les glandes post-pharyngiennes des fourmis, en particulier chez les espèce prédatrices, n'est pas détectée chez *Acromyrmex octospinosus*.

Le rôle de cette glande chez les fourmis est controversé. FORBES et Mc FARLANE (1961) pensent que sa fonction primaire est digestive, mais BRUGNION (1930) suggère un rôle dans le nourrissage des larves par régurgitation. Cette dernière hypothèse trophallaxique est reprise par AYRE (1963, 1967). Comme pour beaucoup d'espèces de fourmis (DELAGE, 1966), la pénétration directe de la fraction liposoluble de l'alimentation dans ces glandes est observée chez les Attines : par ECHOLS (1966) chez *Atta texana*, par PEREGRINE et al (1972) chez *Atta cephalotes* et par PEREGRINE et al (1973, 1974) chez *Acromyrmex octospinosus*. Ces derniers n'observent pas le transfert du contenu de la glande aux larves mais attribuent néanmoins à celle-ci un rôle nutritif en soulignant la haute valeur énergétique des triglycérides qu'elle contient.

3.4.1.2. Les glandes maxillaires.

Comme pour les glandes post-pharyngiennes, aucune mise en évidence d'activité enzymatique digestive n'a pu être faite dans les glandes maxillaires. La littérature signale que seules deux espèce *Formica polyctena* et *Myrmica rubra* présentent des activités osidasiques (invertase, tréhalase, maltase). Aucune protéinase ni lipase

Enzymes	Tissus biologiques			Estomac vidé et lavé			Glandes labiales			Glandes post-pharyngiennes		Glandes maxillaires	
	Ouvrière	Femelle	Mâle	Ouvrière	Femelle	Mâle	Ouvrière	Femelle	Mâle	Ouvrière		Ouvrière	
α D-galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β D-galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α D-glucosidase	5	5	5	2	5	1	2	1	1	1	1	1	1
β D-glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N acetyl - α D-glucosaminidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N acétyl - β D-glucosaminidase	-	-	-	5	-	5	-	5	-	-	-	-	-
α L-fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β L-fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β D-fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β D-lactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α D-mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β D-mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α D-xylosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β D-xylosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trypsine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chymotrypsine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	4	4	4	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1
Valine arylamidase	1	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cystine arylamidase	1	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Estérase	3	3	3	4	5	4	4	5	4	4	1	1	1
Estérase-lipase	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
Lipase	1	1	1	+	+	+	+	+	1	1	1	1	1

TABLEAU IV : Zymogrammes des glandes salivaires et des estomacs des adultes d'*Acromyrmex octospinosus* (+ = trace <1, - absence de coloration).

ne sont révélées. Un rôle digestif ne doit pas toutefois être écarté pour ces glandes qui, n'ayant ni lumière, ni réservoir verront leurs sécrétions collectées par le gésier sans qu'aucune enzyme ne soit réellement active à leur niveau (ABBOTT, 1978).

3.4.1.3. Les glandes labiales.

L'analyse enzymatique de ces glandes révèle deux fortes activités sécrétées : l' α glucosidase et la N-acétyl- β -D-glucosaminidase. Aucune endopeptidase n'est détectée, cependant il apparaît une faible activité exopeptidasique. L'activité lipasique existe sous forme de traces pour les longues chaînes de carbone, toutefois l'activité est plus forte pour les courtes chaînes.

Rappelons quelques résultats obtenus chez d'autres fourmis par les auteurs précédemment cités. Sur 9 espèces différentes, 3 seulement (*Myrmica rubra*, *Formica integra* et *F. fusca*) ne présentent aucune activité enzymatique. Une amylase est révélée pour les 6 autres. Maltase et invertase sont aussi présentes chez *Messor*. Aucune endopeptidase n'est décrite dans les glandes labiales des 9 espèces, mais *Messor* possède 3 exopeptidasases et une lipase.

Comme chez *Messor capitatus*, les glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus* sont riches en enzymes et leur rôle digestif paraît important.

* α glucosidase.

Cette enzyme a la particularité de couper les liaisons α 1-4 entre deux glucoses. Elle peut avoir une activité assez large, mais reste généralement spécifique d'un substrat : le maltose (maltase), le tréhalose (tréhalase), l'amidon et le glycogène (amylase). La méthode Apizym utilisant des substrats artificiels ne permet pas de préciser la spécificité de l' α glucosidase ainsi révélée, mais il est possible de souligner l'intérêt de cette enzyme chez *Acromyrmex octospinosus* en examinant son alimentation :

- Cytoplasme du champignon symbiotique : l'analyse des sucres du symbiote d'*Atta colombica tonsipes* (MARTIN et al, 1969b) met en évidence une forte concentration en tréhalose. DECHARME (1978) révèle, par cytochimie, le glycogène en tant que polyside de réserve du basidiomycète d'*Acromyrmex octospinosus*.

- Sève des plantes : l'amidon, en général le polyside de réserve des végétaux, est ingéré lors des opérations d'affouragement et de compostage.

* β -N acétylglucosaminidase.

L'activité β -N-acétylglucosaminidasique est souvent associée à une activité chitinasique (JEUNIAUX, 1967). Dans ce cas on la nomme chitobiase et elle hydrolyse le chitobiose, résultat de la dégradation de la chitine par les chitinases, en 2 molécules de N-acétyl-glucosamine. Dans cette hypothèse la fonction digestive de cette enzyme peut paraître à priori surprenante, d'autant plus qu'elle n'est jamais décrite comme telle chez les fourmis mais seulement dans quelques cas particuliers d'insectes se nourrissant de carapaces d'autres arthropodes. Il faut cependant rappeler que les parois des champignons sont composées en proportions variables de chitine. Les Basidiomycètes, auxquels appartient le champignon symbiotique cultivé par *Acromyrmex octospinosus*, sont les mieux pourvus en chitine pariétale (75%), le reste étant constitué d'autres glycanes (BARTNICKI-GARCIA, 1968). Récemment, DECHARME (1980) a montré l'existence de cette chitine pariétale pour les trois champignons cultivés par *Atta sexdens*, *A. cephalotes* et *Acromyrmex octospinosus*.

A la lumière de ce fait, la β -N-acétylglucosaminidase mise en évidence dans les glandes labiales pourrait s'apparenter à une chitobiase et contribuer à la dégradation des parois du champignon symbiotique. Nous avons déjà signalé que celles-ci ne transitent pas dans le tube digestif, mais sont stockées dans la poche infrabuccale. Or, le débouché des glandes labiales se situe entre les paraglosses en avant de la poche infrabuccale. Ainsi, lors de l'ingestion, le champignon est humecté par la salive et l'enzyme pourrait alors dégrader le chitobiose au cours du séjour dans le sac infrabuccal. Cette enzyme n'étant pas retrouvée dans l'estomac, il semble bien que son action se limite au niveau de la sphère buccale.

3.4.1.4. L'estomac.

L'estomac est le siège d'une intense digestion. Comme pour la plupart des fourmis étudiées, une large panoplie d'enzymes est révélée chez *Acromyrmex octospinosus*. En ce qui concerne le métabolisme azoté, les trois exopeptidases sont présentes dans l'estomac et, en particulier, la leucine arylamidase avec une forte activité. Cependant, aucune endopeptidase n'est décelée. Une lipase est détectée avec une activité plus importante que dans les glandes labiales. De toutes les osidases testées, seule l' α glucosidase est révélée, et ce, avec une très forte activité. Cette activité osidasique vient ainsi compléter l'action des glandes labiales. Le fait que seule l' α glucosidase soit décelée est probablement lié aux polyosides que la fourmi consomme (polymères α 1-4 du glucose).

Les fourmis adultes ont essentiellement de grands besoins en énergie (locomotion, travaux sociaux ...), celle-ci est apportée par la digestion des polysides et des lipides à haute valeur énergétique pour lesquelles elles possèdent les enzymes. La croissance des fourmis adultes étant nulle, les besoins en acides aminés sont limités au renouvellement des tissus. La présence d'exopeptidases peut suffire à pourvoir l'organisme en acides aminés libres à partir de petits oligo-peptides ingérés. Il est possible aussi, comme l'observent MASCHWITZ (1966) chez *Tetramorium caespitum*, *Myrmica ruginodis* et *Formica sanguinea* et WUST (1973) chez *Monomorium pharaonis*, que les fourmis adultes trouvent leurs besoins en acides aminés libres dans la consommation des sécrétions stomodéales des larves. En effet, de tels échanges de substances entre ouvrières et larves sont signalés chez les Attines par BAZIRE-BENAZET (1974).

3.4.2. Activités enzymatiques révélées chez les larves

Les activités enzymatiques révélées chez les larves apparaissent au tableau n° V.

Les glandes salivaires présentent les β -N-acétylglucosaminidase et estérase-lipase comme précédemment signalées dans les glandes labiales de l'adulte. Ce résultat ne doit pas surprendre car les glandes salivaires des larves deviendront les glandes labiales de l'adulte. (GRASSE, 1951).

Les résultats obtenus pour l'estomac larvaire montrent la présence d'une grande variété d'enzymes. Certaines, telles les α et β galactosidase, β glucosidase, α mannosidase et α et β xylosidase, peuvent avoir une origine alimentaire. En effet ces enzymes sont aussi détectées dans le champignon symbiotique (tableau n° V). De plus, chez les larves, leur activité est trouvée principalement au niveau des aliments ingérés enfermés dans les membranes péritrophiques.

En supplément de ces activités, l'estomac est une importante source d'enzymes endogènes. Comme chez l'adulte on observe pour le métabolisme des polysides une activité α D-glucosidasique importante. Le tableau V montre aussi la présence de β D-fucosidase et de β D-mannosidase non décelées dans le champignon. Ces enzymes interviennent vraisemblablement dans le fonctionnement du tube digestif (dégradation des glycoprotéines, des mucosubstances ...). En ce qui concerne les protéinases, outre la très forte activité des trois exopeptidases, une activité endopeptidasique du type chymotrypsine est décelée, alors qu'elle ne l'est pas chez l'adulte. Cette activité est primordiale au plan qualitatif, car les larves en pleine croissance forment de nouveaux tissus. Pour ces synthèses, elles ont un besoin important en acides aminés libres et

Enzymes	Tissus biologiques	Larve			Champignon symbiotique
		Paroi de l'estomac lavée	Aliments ingérés enfermés dans les membranes péritrophiques	Glandes salivaires	
α D-galactosidase		2	2	-	2
β D-galactosidase		1	1	-	2
α D-glucosidase		5	5	-	-
β D-glucosidase		5	3	-	3
N acétyl - α D-glucosaminidase		-	-	-	-
N acétyl - β D-glucosaminidase		-	5	5	-
α L-fucosidase		-	-	-	-
β L-fucosidase		-	-	-	-
β D-fucosidase		2	4	-	-
β D-lactosidase		-	1	-	-
α D-mannosidase		1	1	-	-
β D-mannosidase		+	4	-	2
α D-xylosidase		+	4	-	1
β D-xylosidase		+	4	-	+
Trypsine		-	-	-	-
Chymotrypsine		1	1	-	-
Leucine arylamidase		5	4	-	2
Valine arylamidase		3	1	-	1
Cystine arylamidase		2	1	-	1
Estérase		2	-	2	3
Estérase-Lipase		2	1	1	1
Lipase		1	-	-	1

TABLEAU V : Zymogrammes des glandes salivaires et estomacs de larves d'*Acromyrmex octospinosus* et du champignon symbiotique (+ = trace <1, - absence de coloration).

la seule action des exopeptidases sur les oligopeptides présents dans l'alimentation ne saurait suffire. Estérases et lipases sont aussi sécrétées par l'estomac des larves.

Rares sont les études enzymatiques effectuées sur les larves de fourmis. DELAGE (1968), travaillant sur les fourmis moissonneuses (*Messor*), trouve chez les larves une gamme d'enzymes très actives. Leur salive contient en particulier une endopeptidase du type trypsine qui n'est pas retrouvée dans les glandes labiales de l'adulte. Cet auteur prétend, pour expliquer la présence de ces enzymes, que les larves représentent un état primitif carnivore, à partir duquel les *Messor* ont évolué. A la métamorphose, l'adulte acquiert des enzymes mieux adaptées à un régime essentiellement végétarien.

3.5. CONCLUSION.

Les enzymes détectées chez les insectes et leurs activités relatives reflètent assez fidèlement le type de nourriture normalement ingéré. Les larves et adultes à l'alimentation variée tendent à avoir un bagage complet en protéinases, lipases et carbohydrases, à l'opposé de la maigre panoplie de certains insectes au régime plus strict. Comparée à d'autres fourmis, *Acromyrmex octospinosus* possède un bagage enzymatique restreint. Deux osidases ont été mises en évidence chez les adultes :

- Une α glucosidase qui pourrait dégrader des polyosides importants présents dans l'alimentation (tréhalose, glycogène, amidon) ;

- Une β N-acétylglucosaminidase dans les glandes labiales, reflétant bien, par sa spécificité, le régime particulier de ces fourmis. Fongivores, elles ont probablement la possibilité de dégrader les parois du champignon si une activité chitinolytique précède l'action de cette enzyme. Les glandes labiales débouchent au niveau des paraglosses. L'action de cette enzyme peut être au niveau de la poche infra-buccale où les parois du champignon sont accumulées.

Les niveaux d'activités lipasiques et protéinasiqes chez *Acromyrmex octospinosus* sont très nettement inférieurs à ceux trouvés chez des fourmis carnivores. Chez l'adulte nous n'avons pas décelé d'endopeptidase. Pour satisfaire les besoins en acides aminés libres, deux hypothèses peuvent être retenues :

- les acides aminés libres en provenance du symbiote et ceux résultant de la dégradation des oligopeptides par les exopeptidases présentes dans l'estomac sont suffisants ;

- les adultes dépendent, comme d'autres Hyménoptères (MASCHWITZ, 1965, 1966 ; ISHAY et IKAN, 1968 ; WUST, 1973) des sécrétions larvaires pour la fourniture d'un supplément en acides aminés.

L'analyse des enzymes digestives des Attines n'avait jamais été entreprise. Des recherches ont été effectuées sur les protéases excrétées par l'anus des ouvrières (MARTIN et MARTIN, 1970, 1971). D'autres enzymes ont également été mises en évidence dans le liquide rectal : chitinases, amylases, cellulases (MARTIN et al, 1973, 1975). Ces auteurs ont conclu que les enzymes révélées dans ce liquide ont pour seule origine le champignon consommé et que l'adaptation des Attines à leur symbiote a entraîné la cessation de la production de leurs propres protéinases digestives (BOYD et MARTIN, 1975b).

La β glucosidase, enzyme qui intervient dans l'étape ultime de la dégradation de la cellulose en glucose, est présente dans le champignon mais n'est pas sécrétée par la fourmi. S'il semble que les enzymes cellulolytiques proviennent bien du symbiote, cette étude montre par contre que l'animal sécrète lui-même les α glucosidase et β -N-acétyl glucosaminidase, dont les activités seront retrouvées au niveau des fèces. Quant aux protéinases, aucune endopeptidase n'a pu il est vrai être mise en évidence : il existe toutefois une activité exopeptidasique importante sécrétée par l'intestin moyen.

Cette méthode d'étude des activités enzymatiques est riche en enseignement. Elle nous a permis, entre autres, de révéler l'existence de deux activités osidasiques importantes chez l'adulte : la β -N-acétyl glucosaminidase et l' α -glucosidase. Cependant la présence de la première nous permet seulement de suspecter une fonction chitinolytique dans les sécrétions salivaires d'*Acromyrmex octospinosus*. Cette méthode, reposant sur l'utilisation de substrats artificiels, ne nous autorise pas à conclure sur la spécificité de l'activité α glucosidasique décelée. Nous avons donc cherché à préciser, par les méthodes classiques d'enzymologie, la nature des systèmes chitinolytique et amylolytique de *Acromyrmex octospinosus*.

4- ETUDE DU SYSTEME CHITINOLYTIQUE DIGESTIF DES ADULTES D'*ACROMYRMEX OCTOSPINOSUS*
(REICH).

4.1. INTRODUCTION.

° 4.1.1. Définitions.

La chitine est décrite pour la première fois par BRACONNOT (1811). Au cours de ses études sur les champignons il isole une nouvelle substance insoluble qu'il appelle fungine. Parallèlement, ODIER (1823) montre que ce même composé forme la structure de la cuticule des Insectes. Il le dénomme chitine du mot grec signifiant enveloppe. Sa structure chimique est étudiée et précisée au cours des années suivantes (LASSAIGNE, 1843 ; LEDDERHOSE, 1878 ; GILSON, 1894), mais sa formule ne fut élucidée que récemment (PURCHASE et BRAUN, 1946).

La chitine (fig. 26) est un homopolysaccharide, ou homoglycane, de structure linéaire. L'hydrolyse acide ménagée de la chitine fournit le diholoside de la N-acétylglucosamine (fig. 26) ou chitobiose (ZECHMEISTER et TOTH, 1931) ainsi qu'un triholoside, le chitotriose.

L'hydrolyse enzymatique de la chitine en acétylglucosamine (fig. 27) est catalysée par un système comprenant deux hydrolases : la chitinase (chitine glycanohydrolase, EC. 3.2.1.14) et la chitobiase (chitobiose acétyl aminodéoxyglucohydrolase, EC. 3.2.1.29). On notera au cours de la première étape, qu'une petite quantité d'acétylglucosamine libre peut être produite à côté du chitobiose et du chitotriose. Le chitobiose constitue jusqu'à 99% de la quantité des produits d'hydrolyse (JEUNIAUX, 1963).

Une autre enzyme, la β -N-acétylglucosaminidase (β -2-acétamino -2-déoxy-D-glucoside acétamino déoxyglucohydrolase, EC. 3.2.1.30) semble souvent associée à l'activité chitinasique (JEUNIAUX, 1967). Dès 1939, ZECHMEISTER et TOTH avançaient que les chitobiasés pourraient constituer des enzymes distinctes des β -N-acétylglucosaminidasés. Pour POWNING et IRZIKIEWICZ (1964), ces activités sont le fait d'une seule et même enzyme. La β -N-acétylglucosaminidase des plantes aurait une activité chitinolytique propre (POWNING et IRZIKIEWICZ, 1965). D'autres auteurs considèrent être en présence de deux enzymes distinctes (DIXON et WEBB, 1958 ; KIMURA, 1977). JEUNIAUX (1961, 1967) ne se prononce pas et la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie (1961) opère une distinction sous deux numéros : EC. 3.2.1.29, la chitobiase dont le substrat type est le chitobiose et EC. 3.2.1.30 pour la β -glucosaminidase dont le substrat type est le β -phényl -2-acétylamino -2-déoxy-D-glucoside.

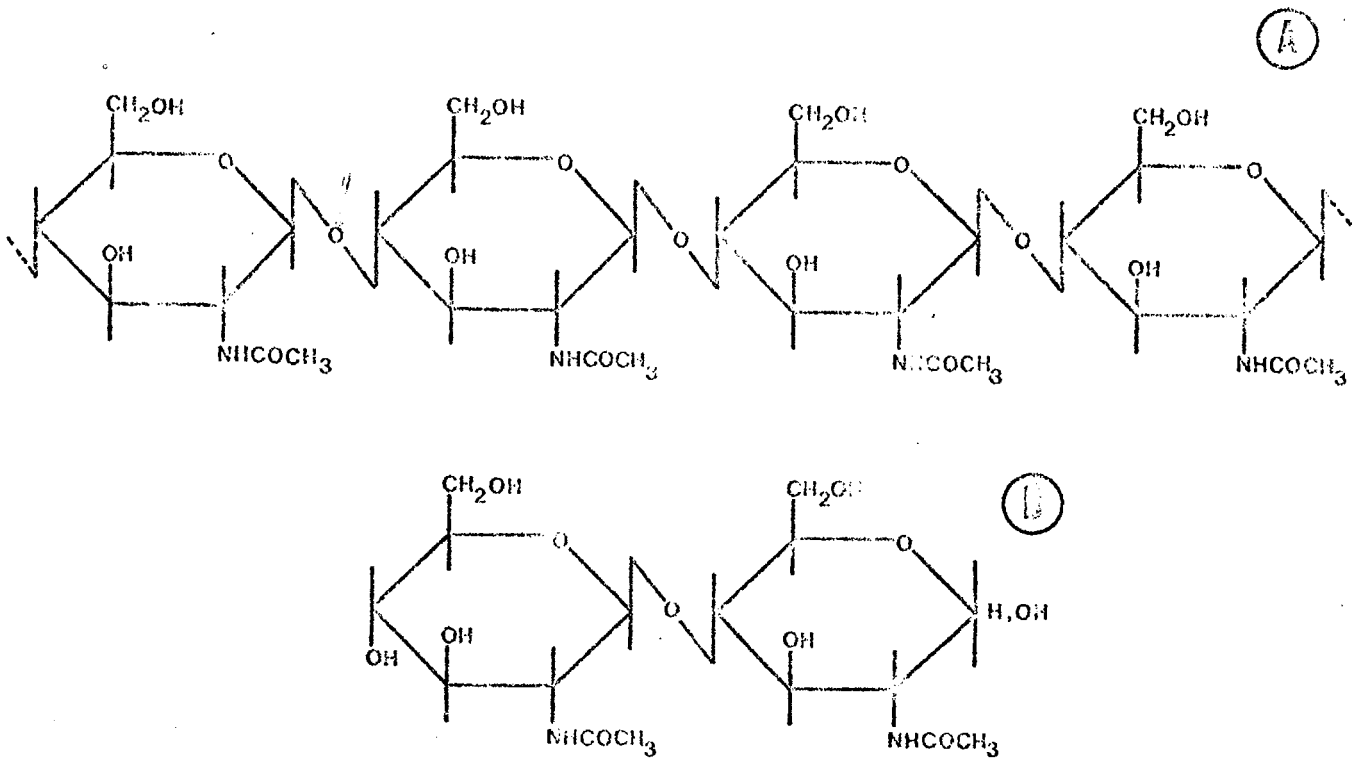


Figure n° 26 : A. Structure de la chitine
B. Structure du chitobiose

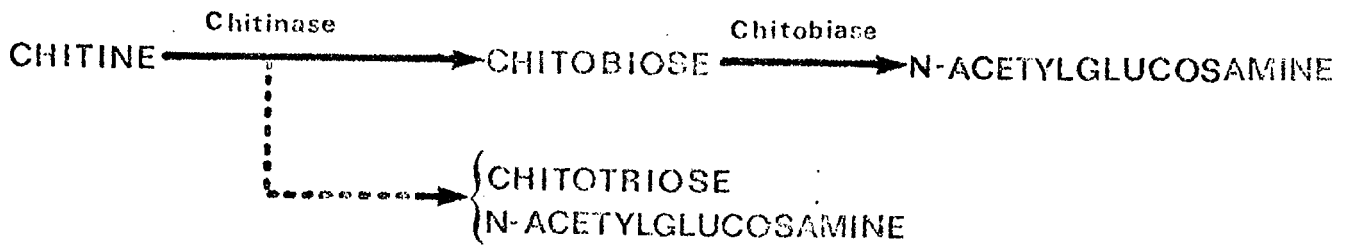


Figure n° 27 : Hydrolyse enzymatique de la chitine

4.1.2. La chitinolyse.

BENECKE met en évidence la fonction chitinolytique chez les bactéries dès 1905 (cité par PREVOT, 1970). Cette fonction est commune à un grand nombre d'espèces bactériennes des dépôts marins et du sol (CAMPBELL et WILLIAMS, 1951 ; VELDKAMP, 1957). JEUNIAUX (1955, cité par PREVOT, 1970) estime que 98% des souches de *Streptomyces* d'origine tellurique sont chitinolytiques. Certaines bactéries, du genre *Arthrobacter*, isolées de la rhizosphère de l'oignon, sont utilisées pour leur pouvoir chitinolytique dans le contrôle biologique de champignons phytopathogènes tels les *Fusarium* (KOTHS et GUNNER, 1967 ; MORRISSEY et al, 1976). LYSENKO (1976) attribue la toxicité de *Serratia marcescens* pour les insectes à la synthèse d'une chitinase.

Le rôle lytique de la β -N-acétylglucosaminidase des bactéries et des champignons est évoqué par de nombreux auteurs. REYES et al (1977) montrent que l'autolyse de *Neurospora crassa* s'accompagne d'un rejet dans le milieu de culture de β -N-acétylglucosaminidase et de chitinase. Les filaments mycéliens du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* (souche *Oryctes rhinoceros*) excrètent une β -N-acétylglucosaminidase à l'origine de la pénétration de la cuticule de l'insecte (RATAULT et VEY, 1977). WICKER (1979) étudie le rôle de la β -N-acétylglucosaminidase des ovaires de *Sitophilus oryzae* en rapport avec la lyse des bactéries symbiotiques du mycétome ovarien.

La production de chitinase est également signalée chez certains Vertébrés. MICHA et al (1973) montrent que les espèces de Reptiles, Batraciens et Poissons à l'alimentation riche en chitine, sécrètent une chitinase au niveau de la muqueuse gastrique et parfois aussi dans le pancréas, la muqueuse intestinale et le foie. CORNELIUS et al (1975) examinent les sécrétions de chitinase pour six espèces de Mammifères carnivores. Ils n'en trouvent que dans la muqueuse gastrique de deux espèces dont la créophagie n'est pas absolue : le chien et le renard. Les espèces strictement carnivores (l'hermine, le furet, la martre et le chat) ne la sécrètent pas. La chitinase n'est pas une enzyme inductible chez les Vertébrés (MUZZARELLI, 1977).

Chez les Invertébrés, KARRER et HOFMANN (1929) signalent l'existence d'une chitinase dans le liquide intestinal de l'escargot de Bourgogne *Helix pomatia*. JEUNIAUX (1950) souligne le rôle essentiel joué par les bactéries symbiotiques dans la production de cette chitinase. Une microflore chitinolytique est aussi trouvée chez de nombreux Gastéropodes pulmonés terrestres (JEUNIAUX, 1954).

La cuticule des arthropodes est formée d'un complexe chitine-protéines lysé lors des mues. Ils ont de ce fait suscité de nombreux travaux.

Outre une chitinase, KIMURA (1974) signale, chez *Bombyx mori*, l'existence de deux chitobiases distinctes :

- l'une, dans le liquide exuvial, opère pendant la mue lors du renouvellement de l'exosquelette (JEUNIAUX, 1961 ; KIMURA, 1977) ;

- l'autre, dans l'hémolymphe, permet la désintégration des structures chitineuses de l'endosquelette (JEUNIAUX, 1961). Seule l'enzyme présente dans le liquide exuvial a une activité chitinolytique (KIMURA, 1977). Celle de l'hémolymphe serait une véritable β -N-acétylglucosaminidase dont le site de synthèse et le rôle restent à élucider.

Chitinase et chitobiase sont également décrites dans le liquide exuvial de Diptères (WINICUR et MITCHELL, 1974 ; SPINDLER, 1976), d'Orthoptères (ZIELKOWSKI et SPINDLER, 1978), de Lépidoptères (BADE et STINSON, 1978) mais une seule enzyme, indifféremment dénommée β -N-acétylglucosaminidase ou chitobiase, aurait les propriétés de la β -N-acétylglucosaminidase.

Si la réalité des chitinasés du liquide exuvial est indiscutable, la littérature n'apporte presque rien sur d'éventuelles chitinasés digestives des Insectes.

Avant 1960, deux insectes sont cités avec de telles activités : *Platydemus tricuspis* (Coléoptère mycétophage) et *Pseudogenia carbonaria* (Hyménoptère ectoparasite d'araignées). JEUNIAUX (1954) considère que ce sont des erreurs d'interprétation ou de traduction colportées de traité en traité. FLORKIN (1957) souligne "Aucun insecte n'a donc été jusqu'à présent identifié comme utilisant la chitine ou comme possédant une chitinase digestive".

Depuis, WATERHOUSE et al. (1961a, b) identifient une activité chitinolytique dans le tube digestif de *Periplaneta americana*. Sans toutefois démontrer l'excrétion de la chitinase par l'épithélium de l'intestin moyen, ces auteurs ne retiennent pas l'hypothèse d'une synthèse par des micro-organismes. La présence de glucosamine et N-acétylglucosamine dans le jus stomacal suggère pour cette chitinase une véritable fonction digestive. L'absence de chitine dans l'alimentation de l'insecte n'éclaircisse pas ce rôle. L'hypothèse d'une digestion continue ("turnover") de la membrane péri-trophique depuis sa formation jusqu'à son excrétion est proposée (*op. cit.*).

La β -N-acétylglucosaminidase existe dans les glandes salivaires et l'intestin de *Chrysopa carnea*, *Ch. perla* et *Semiadalia 11 notata* (FERRAN et al, 1976), et au niveau intestinal de diverses espèces d'insectes étudiées par PLANTEVIN et NARDON (1972). L'association éventuelle avec une activité chitinolytique n'a pas été recherchée.

MARTIN et al (1976) signalent la présence de chitinase dans le jus digestif de 7 espèces de fourmis. Cette étude très préliminaire ne doit être considérée qu'avec grande prudence. Les essais sont uniques et les résultats très imprécis.

4.1.3. Focalisation de nos recherches.

Il a été montré, dans les chapitres précédents, l'existence dans les glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus* une forte activité β -N-acétylglucosaminidasi- que. La consommation de champignon par la fourmi nous donne à penser que cet insecte digère la chitine. Comme l'identité entre β -N-acétylglucosaminidase et chitobiase n'est pas prouvée, il nous fallait rechercher et étudier la β -N-acétylglucosaminidase, la chitobiase et la chitinase dans les extraits de glandes salivaires d'*A. octospinosus*.

4.2. MATERIEL ET METHODES

° 4.2.1. Préparation du matériel biologique.

Les animaux proviennent de nids du laboratoire gardés à 25-30°C, 70-80% HR et alimentés quotidiennement avec du matériel végétal varié et appétent (fleurs et feuilles d'*Hibiscus* ; feuilles de manioc (*Manihot*), patate douce (*Ipomoea*), amandier (*Terminalia*),...

L'influence du jeûne est étudiée en isolant des fourmis de leur source de nourriture, par groupe de 10 en boîte de Petri (Ø 90mm). Le jeûne total n'est pas réalisable, car en 24 heures plus de 80% des fourmis sont mortes. De l'eau dans les coupelles améliore la survie. Le délai léthal 50%, calculé sur un lot de 50 fourmis, est de 153 ± 21 heures. L'apport de glucose à la concentration de 20g/litre permet de prolonger celui-ci jusqu'à 420 ± 60 heures (Annexe n° 1). Les fourmis dites "en jeûne" sont des animaux n'ayant accès qu'à une coupelle d'eau glucosée (20 g/l).

Dans certains cas, les fourmis sont pesées individuellement avant dissection, sur une microbalance analytique (SETARAM γ 21N) qui assure pour des pesées de 1 à 10mg une sensibilité de 10^{-2} mg et de 10^{-1} mg entre 10 et 100mg. Les dissections sont effectuées sous la loupe dans un liquide physiologique (liquide de YEAGER ; composition au § 3.3.).

Le broyage des glandes labiales isolées est réalisé en deux étapes dans de l'eau distillée : manuellement dans un potter de verre, puis par ultrasons durant 90 sec. (SONIFLIER-BRANSON. B.15, réglage de puissance graduation 3). Le broyat est centrifugé pendant 10 min à 10 000g (SORVALL RC 2B). Seul le surnageant est récupéré pour les différents dosages enzymatiques. Il apparaîtra dans la suite du texte sous le vocable d'"extrait enzymatique soluble".

Toutes ces opérations sont effectuées à une température comprise entre 0 et 4°C.

Des broyats d'animaux entiers ou de certaines parties du corps (tête, thorax, abdomen) sont utilisés selon la même méthode.

La préparation des échantillons pour les techniques électrophorétiques est légèrement différente. Les tissus biologiques sont broyés dans 50 μ l de tampon tris-glycine (pH 9) contenant 30% de saccharose. Le broyat, repris dans un tube hématocrite, est centrifugé durant 10 min à 18 500g (centrifugeuse ZANETZKI TH II). Le surnageant est récupéré à l'aide d'une microseringue.

4.2.2. Etude de l'activité β -N-acétylglucosaminidase.

4.2.2.1. Technique histoenzymologique.

Le substrat employé est un composé au naphthol AS.BI. L'insolubilité quasi totale du produit final de la réaction (naphthol AS.BI.) ainsi que du colorant azoïque qui en dérive, permet une localisation très précise de l'enzyme recherchée. (PUGH et WALKER, 1961 ; HAYASHI, 1965).

Nous utilisons le naphthol AS.BI-N-acétyl- β -D-glucosaminide (SIGMA-N 4006). L'enzyme libère le groupement naphthol qui se couple très rapidement avec un sel de diazonium (Fast Blue BB ; SIGMA-F 0250). Les zones à activité β -N-acétylglucosaminidase se colorent en bleu.

La technique employée est celle de WICKER (1979) légèrement modifiée :

- les tissus testés sont fixés dans du liquide de YEAGER contenant 10% de formol neutre, pendant 5 min. Les traces de formol pouvant inhiber la réaction enzymatique sont éliminées par lavage dans du YEAGER ;

- les tissus sont ensuite mis à incuber dans un tampon acide citrique (0,1M), phosphate disodique (0,2M) à pH : 6,0 en présence de substrat (1mM) et de Fast Blue BB (1mg/ml). L'incubation se fait à 37°C pendant 15 à 30 minutes. Le substrat, peu soluble dans l'eau, est préalablement dissout dans du N.N'. diméthylformamide (0,1ml pour 10ml de tampon).

4.2.2.2. Techniques électrophorétiques.

a- gel de polyacrylamide (PAA) homogène.

Gel d'acrylamide (6%) pH : 9,5. Le tampon de migration est du tris-borate EDTA (pH : 9,0). La migration est réalisée en plaques verticales pendant 50 minutes : 15 min sous 100V (35 mA) et 35 min sous 300V (90 mA).

b- gel de polyacrylamide à gradient de porosité.

Les gels à gradient de concentration en PAA sont utilisés afin d'estimer la masse, ou plutôt l'encombrement stérique des protéines (LAMY et al, 1971).

Ils sont commercialisés prêt à l'emploi (PHARMACIA) et ont un taux de polyacrylamide continu de 2 à 16%. La migration (tampon identique au précédent) s'effectue pendant 20 min sous 70V et 15 heures sous 125V.

c- gel de polyacrylamide à gradient de pH.

Ils permettent de déterminer de façon précise le pHi d'une protéine. Le gradient de pH des gels utilisés s'établit de 3,5 à 9,5 (L.K.B. - PAG plates 1804 - 101). La migration dure 105 min sous un voltage maximal de 1500V.

La détermination du gradient de pH est réalisée après migration en découpant des morceaux de gel de 5 mm de longueur (dans le sens du gradient) sur 10 mm de largeur. Après dissociation de chaque morceau dans 4 ml d'eau distillée, le pH est mesuré au pH mètre KNICK 642.

d- révélation de la β -N-acétylglucosaminidase.

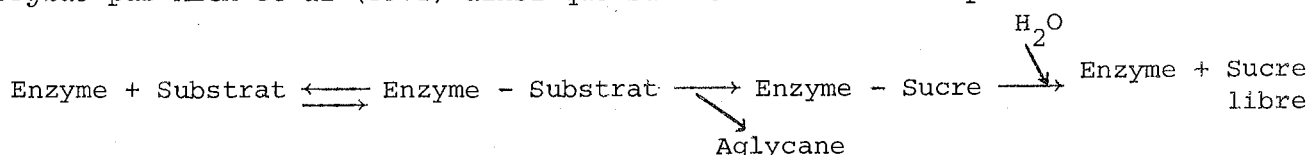
Les différentes électrophorèses sont conduites à une température inférieure à 10°C. Après la migration, les gels sont placés dans un tampon acide citrique (0,1M), phosphate disodique (0,2M), pH : 6,0, en présence de naphthol AS.BI. N-acétyl β -D-glucosaminide (1mM) et de Fast Blue BB (1mg/ml). L'incubation à 37°C dure de 1 à 2 heures. Un bain d'acide acétique 7% permet de fixer les protéines et de conserver les gels.

4.2.2.3. Dosage de la β -N-acétylglucosaminidase.

Principe.

Le substrat employé est le para-nitrophényl-N-acétyl-glucosaminide (SIGMA-N 9376). BORDAH et al (1957) ont montré qu'il est le plus sensible pour l'estimation de cette activité enzymatique.

L'hydrolyse du substrat opérée en deux temps est démontrée chez *Aspergillus oryzae* par MEGA et al (1972) ainsi que sur le foie de boeuf par TANAKA et al (1977) :



Dans le cas du p-nitrophényl-N-acétylglucosaminide, l'enzyme libère le groupement p-nitrophénol (pNP) qui se colore en jaune à pH alcalin.

Technique de dosage.

La technique de dosage est établie à partir de celle de WICKER (1979).

Le milieu réactionnel comprend :

- 200 μ l d'extrait enzymatique
- 200 μ l de tampon acide citrique (0,2M), phosphate disodique (0,4M), pH : 6,0
- 200 μ l de substrat (0,7mM final) dans le tampon précédent dilué de moitié, pH : 6,0.

L'incubation est effectuée dans des tubes à hémolyse placés dans un bain-marie à 37°C. En fin de réaction l'addition de soude 1N (200µl) bloque l'hydrolyse enzymatique et permet le développement de la coloration jaune du p-nitrophénol. Celle-ci est aussitôt lue à 410 nm (Spectronic 20, BAUSCH et LOMB). Le substrat n'absorbant pas à 410nm et ne se décomposant pas dans les conditions de l'expérience, les témoins sont réalisés en remplaçant le substrat par la même quantité de tampon.

Dans certaines études les conditions expérimentales sont différentes et précisées en temps opportun.

Droite étalon.

L'activité de la β-N-acétylglucosaminidase est exprimée par la quantité de p-nitrophénol libéré par unité de temps. Une courbe étalon donnant la correspondance entre la Densité Optique (DO) et la quantité de pNP libre, est établie dans les mêmes conditions que le dosage enzymatique :

- quantité connue de pNP (SIGMA-N 104.1) dans 600µl de tampon acide citrique (0,1M), phosphate disodique (0,2M), pH : 6,0
- 200µl de soude 1N
- et lecture immédiate de la DO à 410 nm.

Avec des concentrations en p-nitrophénol (dans les 600µl) de zéro à 70 nmoles/ml, les courbes représentant la DO en fonction de la concentration en pNP sont linéaires. Pour une bonne assurance dans le calcul de la droite de régression (Annexe n° 2), 12 mesures différentes de 8 concentrations en pNP sont effectuées (de 0 à 70 nmoles/ml dans 600µl).

Celle-ci passe, aux erreurs expérimentales près, par l'origine et a pour équation :

$$DO (410) = 1,243 x + 0,009$$

x représente la concentration de pNP exprimée en 10^{-7} M/ml dans les 600µl du milieu réactionnel.

4.2.3. Etude de l'activité chitobiasique.

4.2.3.1. Principe de dosage.

La chitobiase est étudiée en utilisant son substrat naturel : le chitobiose (N.N'-diacétyl chitobiose, SIGMA-D 2513). L'action de l'enzyme libère la N-acétylglucosamine, dosée selon la méthode de REISSIG et al (1955).

4.2.3.2. Réaction enzymatique.

Le milieu réactionnel comprend :

- 250µl d'extrait enzymatique
- 250µl de substrat (0,5mM final) dans du tampon acide citrique (0,2M), phosphate disodique (0,4M) pH : 7,0.

L'incubation est effectuée à 37°C pendant 30 min et la réaction enzymatique est stoppée en plongeant les tubes dans un bain de glace fondante. Les témoins sont réalisés de la même manière après avoir dénaturé les enzymes de l'extrait (5 minutes au bain-marie à 100°C).

Dans certains cas, les conditions générales sont différentes et précisées au moment opportun.

4.2.3.3. Dosage de la N-acétylglucosamine.

Réactif A : 10g de p-diméthyl formamide (DMAB) (SIGMA-D 2004) dissous dans 100ml d'acide acétique glacial contenant 12,5% (V/V) d'acide chlorhydrique 10N. Dilution au 10ème dans de l'acide acétique glacial avant emploi.

Réactif B : Tétraborate de potassium (0,2M).

Réaction colorimétrique :

- 0,5ml de mélange réactionnel + 0,1ml de réactif B
- 3 min à 100°C
- refroidissement dans la glace
- 3ml de réactif A
- 20 min à 37°C
- lecture de la coloration violette à 585nm (SPECTRONIC 20, BAUSCH et LOMB).

4.2.3.4. Droite étalon.

L'activité de la chitobiase est exprimée par la quantité de N-acétylglucosamine libérée par unité de temps. Une courbe étalon donne la correspondance entre la DO et la concentration en N-acétylglucosamine.

La courbe est réalisée dans les mêmes conditions que le dosage enzymatique, soit :

- quantité connue de N-acétylglucosamine (SIGMA-A 8625) dans 500µl de tampon acide citrique (0,1M), phosphate disodique (0,2M), pH : 7,0 ;
- réaction avec le tétraborate de potassium et le réactif au DMAB
- lecture de la DO à 585nm.

Une bonne référence de la correspondance DO à 585nm - quantité de N-acétylglucosamine est assurée par 9 mesures différentes de 14 concentrations en N-acétylglucosamine (s'étalant de 0 à 80µg dans 500µl). Pour des concentrations en N-acétylglucosamine de 0 à 100µg/ml, la variation de la DO est linéaire. Cette linéarité n'est plus respectée aux concentrations supérieures (Annexe n° 3). La droite de régression calculée (concentrations comprises entre 0 et 100µg/ml) passe, aux erreurs expérimentales près, par l'origine et a pour équation :

$$DO = 0,01445 x + 0,0064$$

x représente la quantité de N-acétylglucosamine en µg dans 500µl de milieu réactionnel.

4.2.3.5. Technique électrophorétique.

Des électrophorèses en gel de polyacrylamide homogène permettent de comparer les vitesses de migration des 2 enzymes, N-acétylglucosaminidase et chitobiase.

La technique électrophorétique est décrite au § 4.2.2.2. (première partie). Le gel, formé de six puits, est découpé après migration. Les deux puits extérieurs révèlent par incubation la position de la bande d'activité N-acétylglucosaminidasi- que. On prélève sous les 4 puits restants une bande de gel correspondant à la zone de migration de la N-acétylglucosaminidase. Ces morceaux sont dilacérés dans 2ml d'eau distillée. Après centrifugation le surnageant est utilisé comme extrait enzymatique pour les dosages de la N-acétylglucosaminidase et de la chitobiase. Dans ce cas précis, la durée d'incubation pour le dosage de la première enzyme est réduite à 2 minutes et augmentée à 1 heure pour la chitobiase. Cette modification est liée à la grande différence de sensibilité des deux méthodes de dosage.

Le rapport des deux activités enzymatiques présentes dans le gel d'électrophorèse est comparé au rapport des activités enzymatiques présentes dans un extrait de glandes salivaires et dosées dans les mêmes conditions.

4.2.4. Etude de l'activité chitinasique.

4.2.4.1. Principe de dosage.

Nous avons décrit précédemment la digestion de la chitine en N-acétylglucosamine par l'action successive de deux enzymes : la chitinase et la chitobiase.

Dans l'étude d'une hydrolyse, résultat d'une succession de réactions catalysées par des enzymes différentes, il est généralement préférable de mesurer la disparition du substrat plutôt que l'apparition de produits finaux.

Le dosage de la chitine peut être effectué par une méthode chimique (minéralisation du résidu et dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl) ou néphélométrique (mesure du trouble, fonction linéaire de la concentration en chitine pour des suspensions contenant moins de 0,75mg/ml, JEUNIAUX; 1954). Ces méthodes exigent un équipement spécialisé et n'ont pu être envisagées.

L'activité de la chitinase est mesurée par dosage du produit d'hydrolyse, (GRASSMAN et al, 1934 ; ZECHMEISTER et TOTH, 1931, 1932, 1939).

L'extrait enzymatique est incubé avec une suspension de chitine. Après un temps déterminé, la N-acétylglucosamine formée est dosée par la méthode de REISSIG et al (1955).

4.2.4.2. Réaction enzymatique.

Le milieu réactionnel comprend :

- 4mg de chitine,
- 800µl de tampon : acide citrique (0,1M), phosphate disodique (0,2M),
pH : 7,0,
- 200µl d'extrait enzymatique,
- 2 gouttes de toluène.

Le substrat utilisé est la chitine purifiée pour l'analyse de la chitinase (SIGMA-C 3641). WATERHOUSE et al (1961a) montrent que l'état physique du substrat a un effet important sur l'activité chitinasique. Nous avons également constaté qu'une hétérogénéité des grains de chitine entraîne une grande variabilité dans les mesures de l'activité enzymatique. La chitine est insoluble et l'enzyme s'adsorbe sur les grains. Son activité sera directement liée à la surface présentée. En conséquence la chitine est pilée dans un mortier et tamisée à 75µm avant utilisation.

Le toluène est utilisé comme agent bactériostatique pour éviter le développement d'une microflore chitinolytique pendant une incubation de plusieurs heures. Celle-ci s'effectue à 37°C dans de petits piluliers en agitation continue pendant 24 heures. Les témoins sont réalisés selon le même protocole opératoire avec l'extrait enzymatique dénaturé (5 min à 100°C).

Dans certains cas, les conditions générales décrites ci-dessous sont différentes et précisées au moment opportun.

4.2.4.3. Dosage de la N-acétylglucosamine.

La réaction enzymatique est stoppée par refroidissement des piluliers dans de la glace. Le milieu réactionnel est centrifugé 5 minutes à 10 000g. Sur 0,5ml du surnageant on procède au dosage de la N-acétylglucosamine comme décrit au § 4.2.3.3.

4.2.4.4. Droite étalon.

L'activité de la chitinase est exprimée par la quantité de N-acétylglucosamine libérée par unité de temps. Cette quantité est calculée par la droite étalon décrite au § 4.2.3.4. et annexe n° 3.

4.2.4.5. Digestion de la chitine du champignon symbiotique.

La partie insoluble du champignon est utilisée comme substrat pour éprouver la capacité lytique des extraits glandulaires sur le symbiote des fourmis.

Le champignon symbiotique est cultivé sur un milieu organique liquide (yeast-nitrogen base : 6,7g, glucose : 10g, asparagine : 1g, extrait de levure : 1g, eau distillée : 1000ml), en agitation continue et à température ambiante. La souche provient de repiquages successifs, sur milieu solide au chloramphénicol, d'hyphes prélevés sur la meule fongique d'un nid.

L'essai est mené sur des cultures âgées de 24 jours. Sur milieu liquide agité le champignon n'élabore pas de *gongylidia*, structures caractéristiques de ce dernier. La vérification de l'identité du champignon est effectuée par repiquage de mycélium de la culture liquide sur milieu solide. Après 2 à 3 jours l'apparition des *gongylidia* peut être observée au microscope par écrasement entre lame et lamelle dans du lactophénol bleu coton.

Le mycélium de plusieurs fioles de culture est rassemblé, rincé à l'eau distillée et égoutté sur papier filtre. Le rapport poids sec/poids frais est mesuré sur une partie aliquote (48 heures à 65°C). Le mycélium restant, pesé, broyé dans un potter avec de l'eau distillée, est placé 5 minutes dans un bain-marie à 100°C pour dénaturer les enzymes d'autolyse. Les éléments solubles sont éliminés par 5 centrifugations suivies d'une reprise du culot par de l'eau distillée. Le dernier culot est mis en suspension dans 10ml de tampon acide citrique (0,1M), phosphate disodique (0,2M), pH : 7,0. Cette suspension est utilisée en tant que substrat de la chitinase, dosée comme précédemment.

4.2.5. Dosage des protéines.

Les activités enzymatiques sont exprimées soit par individu, soit par gramme de poids frais ou encore par rapport aux protéines.

Le dosage des protéines, selon la méthode de LOWRY et al (1951), est effectué sur 150 μ l de l'échantillon. Les essais sont réalisés en double et, parallèlement, en suivant le même protocole, une gamme étalon est établie avec de l'albumine de boeuf (SIGMA-A 4503). Les concentrations varient de 0 à 200 μ g/ml dans de l'eau distillée.

Pour certains échantillons, la concentration en protéines est inférieure à la sensibilité de la méthode. Dans ce cas 1,5ml sont lyophilisés (Flexi-dry -FTS Systems, INC). Le lyophilisat est repris avec 150 μ l d'eau distillée. Le dosage des protéines est réalisé sur cette solution concentrée au 10ème. La gamme étalon d'albumine de boeuf est effectuée avec des concentrations variant de 0 à 20 μ g/ml.

4.3. RESULTATS ET DISCUSSION.

4.3.1. Etude de l'activité β -N-acétylglucosaminidasique.

4.3.1.1. Localisation histologique.

L'enzyme n'est décelée chez l'adulte qu'occasionnellement dans les tubes de Malpighi qui prennent alors une teinte bleue pâle diffuse. Parmi les glandes tégumentaires associées au tube digestif, seule la labiale se colore en bleu intense (fig. 28A). Cette coloration confirme le résultat du Chapitre 3 : les glandes labiales renferment une activité β -N-acétylglucosaminidasique.

On observe la teinte bleue foncée principalement dans les globules de la partie distale de la glande, lieu probable de la synthèse enzymatique (fig. 28B). La partie proximale ainsi que le conduit évacuateur ont une teinte plus claire.

Observés au microscope, les globules de la partie distale sont formés de grandes cellules sécrétrices. Le cytoplasme est le siège d'une activité β -N-acétylglucosaminidasique mise en évidence par la présence d'une multitude de grains bleus de précipitation du colorant azoïque (fig. 28C).

Il est à noter que certains globules de la partie distale de la glande, totalement exempts de cette enzyme, restent blancs.

4.3.1.2. Electrophorégrammes, pHi et estimation du poids moléculaire.

4.3.1.2.1. Electrophorèse en gel de PAA homogène.

L'électrophorèse est effectuée au préalable sur des broyats d'ouvrières entières. Les résultats présentés figure 29 montrent la présence de 2 bandes d'activité β -N-acétylglucosaminidasique : bande S (Slow) et bande F (Fast).

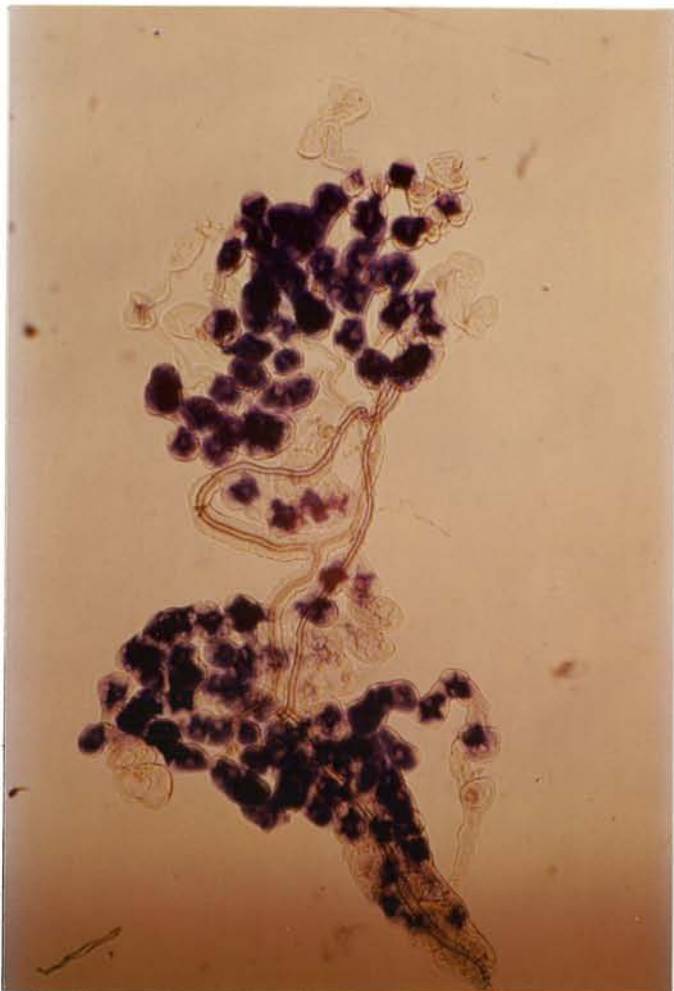
Les enzymes sont nettement localisées par électrophorèse de broyats de têtes, thorax, abdomens et glandes labiales d'ouvrières (fig. 29). Les deux bandes (S et F) sont retrouvées simultanément dans le thorax. La bande F est présente dans la tête et l'abdomen. Dans les broyats des glandes salivaires seule la bande S est révélée. Chez les fourmis sexuées (mâles ou femelles) les résultats sont similaires. Les distances de migration des bandes S et F sont les mêmes pour les ouvrières et les sexués.

Les études précédentes ne laissaient entrevoir l'existence que d'une seule β -N-acétylglucosaminidase. Ces électrophorèses révèlent la présence de deux enzymes distinctes. L'enzyme n° 1 (bande S) présente uniquement dans les glandes salivaires

(A)



(B)



(C)

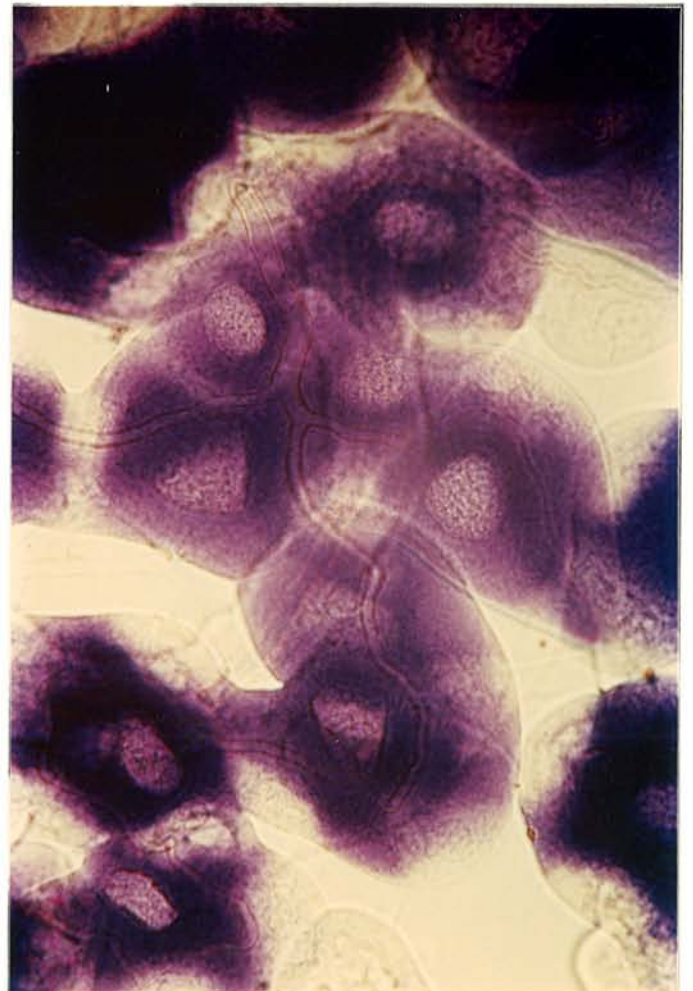


Figure n° 28 : Révélation histochimique de l'activité β -N-acétylglucosaminidasiq.

- A : vue des glandes labiales émergeant à l'arrière de la tête
B : coloration des globules de la partie distale des glandes labiales.
C : vue microscopique des globules formés de grandes cellules sécrétrices (10x100).

Puits de dépôts des différents broyats :

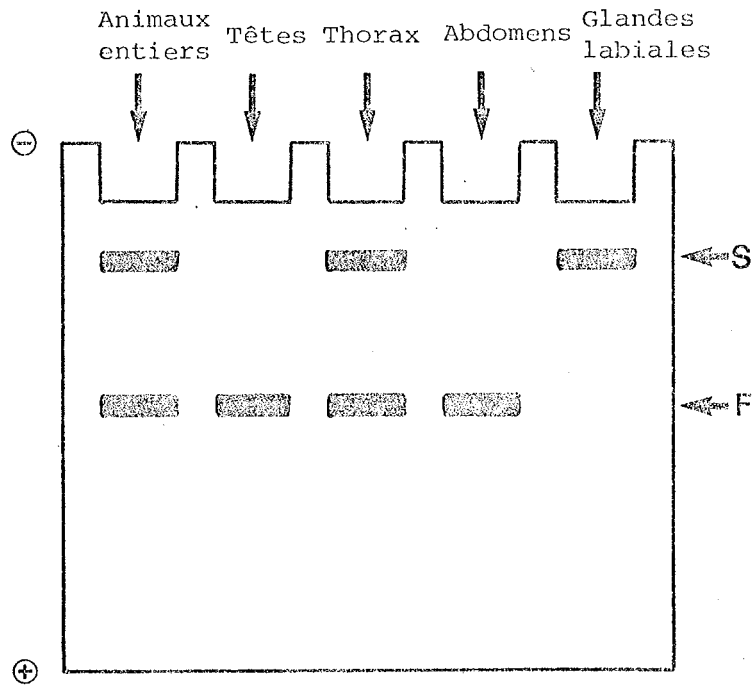


Figure n° 29 : Zymogramme obtenu en gel de polyacrylamide homogène (6%) avec différents broyats d'*Acromyrmex octospinosus*. Révélation de l'activité β -N-acétylglucosaminidasique.

est celle qui était décelée jusqu'ici. Elle se retrouve dans les broyats d'animaux entiers et les broyats de thorax où les glandes labiales s'étendent. L'enzyme n° 2 (bande F) est présente dans tout le corps. Elle n'a pas pour origine le tube digestif car elle aurait été révélée par l'histoenzymologie. Comme son activité est présente de la tête à l'abdomen, cette seconde β -N-acétylglucosaminidase pourrait être localisée dans l'hémolymphe, milieu circulant de l'insecte.

La fonction d'une β -N-acétylglucosaminidase circulante chez une fourmi adulte qui a terminé son cycle de mues, reste à élucider. Chez d'autres insectes adultes, cette activité n'a pas été recherchée. Cependant nous noterons chez la larve de *Bombyx mori*, la présence d'une β -N-acétylglucosaminidase dans l'hémolymphe différente de celle du liquide de mue (KIMURA, 1977). ZIELKOWSKY et SPINDLER (1978) révèlent aussi deux β -N-acétylglucosaminidases chez les larves de *Locusta migratoria*, une dans le tégument, l'autre dans le liquide de mue. Le rôle de ces enzymes demeure encore inconnu.

4.3.1.2.2. Electrofocalisation.

L'électrofocalisation sur gel de polyacrylamide de broyats d'animaux entiers, de têtes, thorax, abdomens et glandes salivaires permet de confirmer l'existence de deux β -N-acétylglucosaminidases (fig. 30B). Les résultats sont identiques pour les trois castes de fourmis étudiées : ouvrières, sexués mâles et femelles.

Le gradient établi en fin d'électrophorèse est mesuré pour la détermination de pH isoélectrique (fig. 30A). Sa forme sigmoïde lui confère une bonne linéarité entre les zones de pH 5 et 8,5. Le pHi d'une protéine dans cet intervalle peut être évalué de façon précise.

L'enzyme des glandes salivaires migre jusqu'à des pH très alcalins. Dans cette zone le gradient de pH s'établit d'une façon qui n'est pas régulière, ni reproductible et la détermination du pHi de la β -N-acétylglucosaminidase digestive reste imprécise. Les différentes observations nous permettent seulement de la situer dans un intervalle de pH de 8,5 à 10.

La β -N-acétylglucosaminidase de l'hémolymphe se stabilise dans une zone de pH neutre. La détermination de son pHi est plus précise, et celui-ci se situe entre les valeurs 7,0 et 7,5.

Les deux bandes d'activité β -N-acétylglucosaminidasique sont dédoublées (fig. 30B). A 2mm de chaque bande de forte coloration il existe une bande de très faible intensité, parfois à peine perceptible. Cette activité jumelle témoigne de l'existence d'une isoenzyme (de pHi légèrement inférieur) pour chacune des deux enzymes.

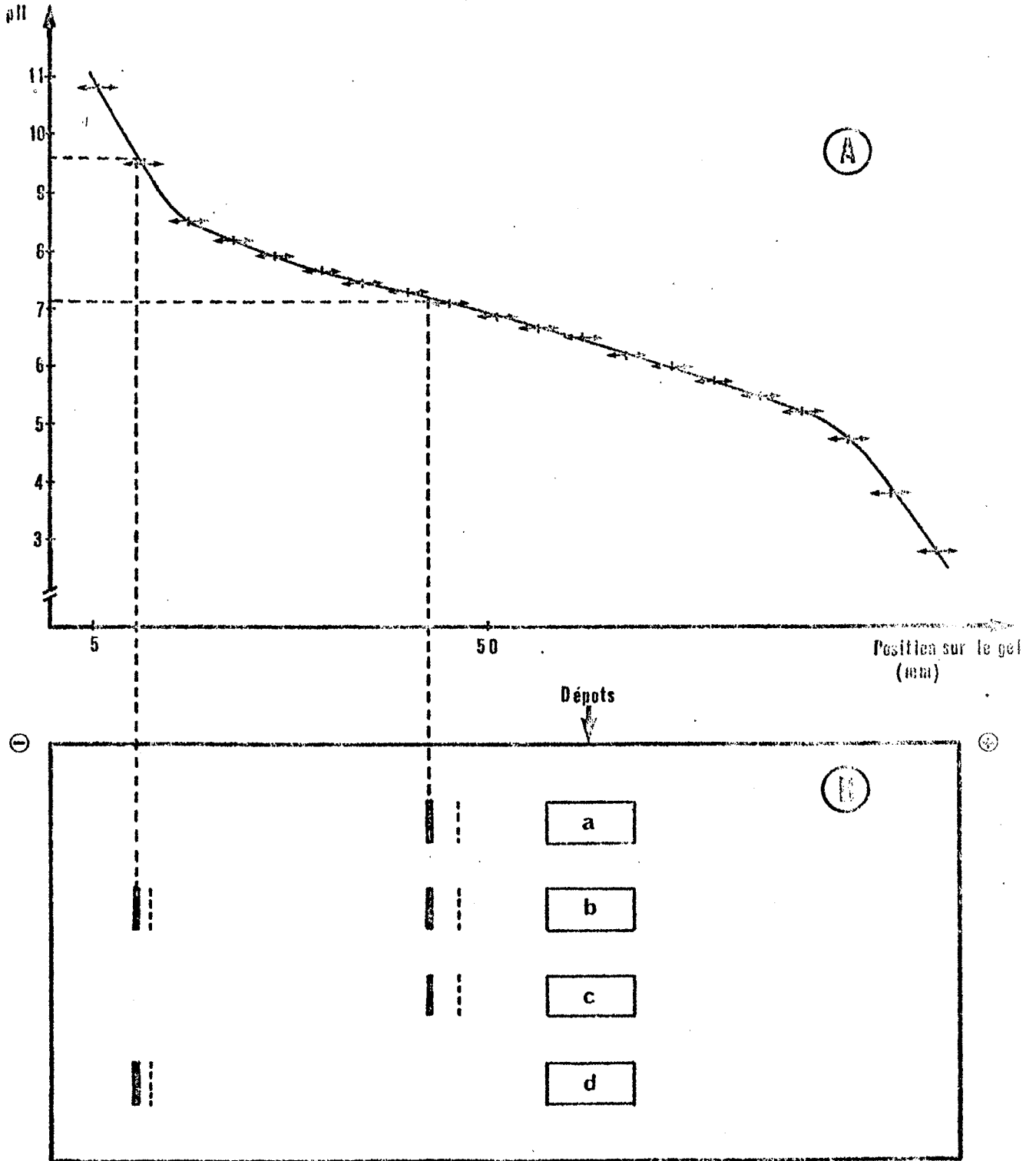


Figure n° 30 : Electrofocalisation en gel de polyacrylamide. Révélation de l'activité β -N-acétylglucosaminidase.
A : Gradient de pH établi en fin d'électrophorèse
B : Zymogramme de différents broyats d'*Acromyrmex octospinosus*
a : têtes - b : thorax - c : abdomens - d : glandes labiales.

La description de deux isoenzymes A et B composant la β -N-acétylglucosaminidase peut être trouvée dans la littérature (GEIGER et al, 1974 ; ROBINSON et STIRLING, 1968 ; SRIVASTAVA, 1974 ; WICKER, 1979). Toutefois dans le sang humain, les pHi de ces deux isoenzymes sont très différents : pH 5 et pH 7,3 (POTT et al, 1978) et l'activité de la première compte pour 38% de l'activité totale.

4.3.1.2.3. Electrophorèse à gradient de polyacrylamide.

Le poids moléculaire de l'enzyme digestive est déterminé au moyen de la courbe étalon (distance de migration en fonction du logarithme du poids moléculaire des protéines) établie par le fabricant des gels (fig. 31). Pour une électrophorèse effectuée dans ces conditions, la distance de migration de la β -N-acétylglucosaminidase digestive est de 51mm correspondant à un poids moléculaire de 420 000 daltons.

Cette valeur n'est qu'une estimation d'autant plus exacte que la protéine sera globulaire.

4.3.1.2.4. Conclusions.

Les différentes techniques électrophorétiques mettent en évidence deux β -N-acétylglucosaminidases ; l'une localisée dans les glandes salivaires, l'autre diffuse dans tout le corps, et paraît liée à l'hémolymphe. Les pHi sont très différents et fortement basiques (8,5 à 10) pour l'enzyme digestive. Le poids moléculaire de cette dernière peut être estimé à 420 000 daltons.

L'existence de deux β -N-acétylglucosaminidases distinctes dans le corps de la fourmi fait que l'étude de l'enzyme digestive ne peut s'effectuer sur des broyats d'animaux entiers, car l'activité de l'enzyme circulante fausserait les résultats. La dissection des glandes salivaires devient de ce fait indispensable sauf si certaines méthodes de dosage nous permettaient de mesurer l'activité digestive sans interférence avec celle de l'hémolymphe.

4.3.1.3. Caractéristiques de la β -N-acétylglucosaminidase digestive et conditions optimales du dosage.

4.3.1.3.1. Concentration en glandes et durée d'incubation.

La figure 32 retrace l'activité β -N-acétylglucosaminidasique digestive pour trois concentrations en glandes labiales en fonction du temps d'incubation.

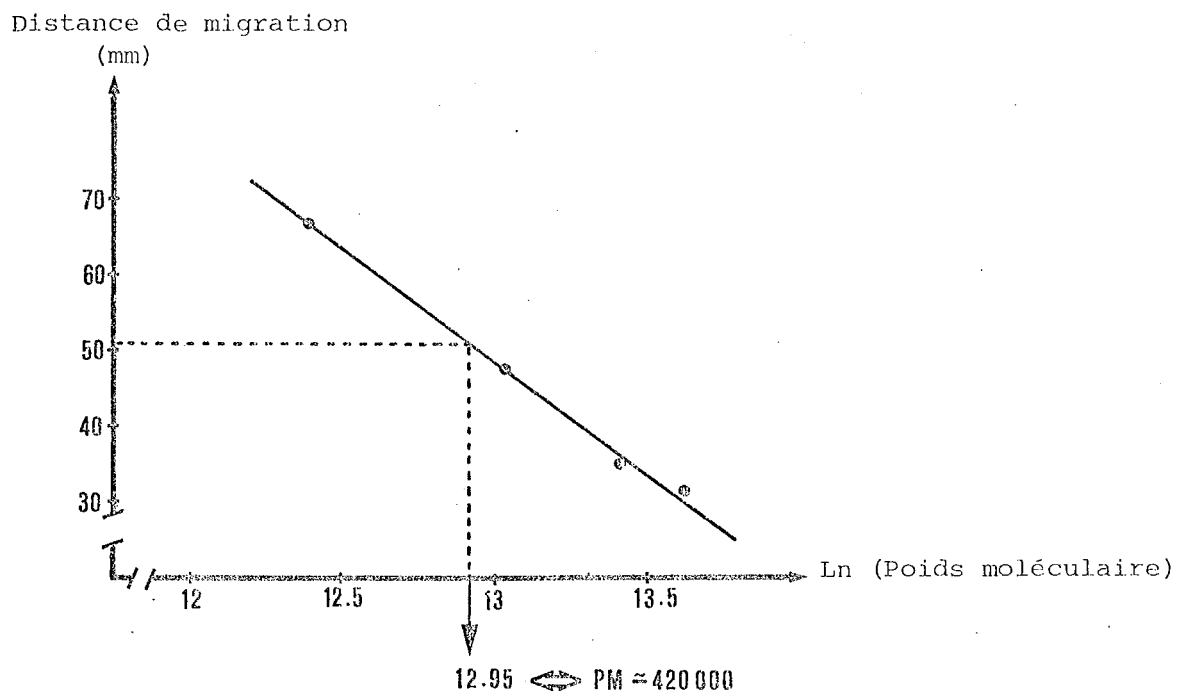


Figure n° 31 : Courbe étalon liant la distance de migration au logarithme du poids moléculaires d'une protéine (gel Pharmacia à gradient de polyacrylamide 2-16%).

Température d'incubation : 37°C

Concentration finale en substrat: 0,7mM

Tampon : acide citrique (0,1M) - phosphate disodique (0,2M) pH = 6,0

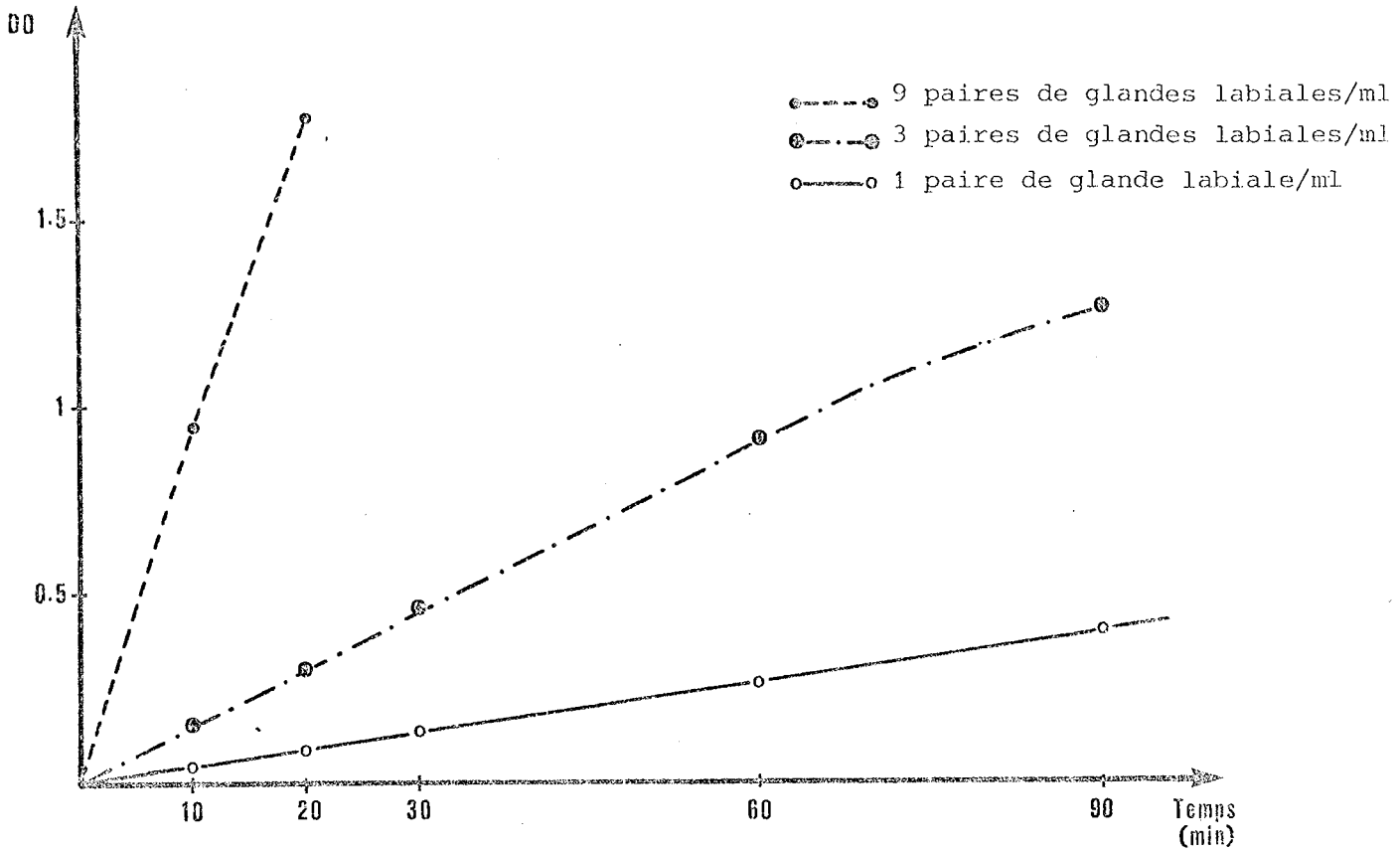


Figure n° 32 : Activité de la β -N-acétylglucosaminidase en fonction du temps d'incubation pour des broyats d'un nombre différent de glandes labiales

Pour 1 paire de glandes broyées dans 5ml d'eau distillée, l'activité enzymatique est rigoureusement proportionnelle à la durée d'incubation pendant 90 minutes, temps d'incubation maximal retenu. Cependant les valeurs de DO pour une telle concentration restent faibles. Un broyat de 3 paires de glandes labiales dans 5ml d'eau distillée assure jusqu'à 60 minutes une proportionnalité entre activité enzymatique et temps d'incubation. Un temps maximal d'incubation de 20 minutes est compatible avec une concentration de 9 paires de glandes dans 5ml d'eau distillée. Des temps supérieurs entraînent une coloration du milieu réactionnel si intense que la mesure de la DO n'est plus réalisable. Ces essais nous amènent à retenir pour la suite la concentration de 1 paire de glandes broyées dans 1ml d'eau distillée pour un temps d'incubation de 15 minutes. Ces conditions garantissent une proportionnalité entre l'activité enzymatique mesurée et le temps d'incubation.

4.3.1.3.2. pH optimum.

Le pH optimum de la β -N-acétylglucosaminidase des glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus* se situe au voisinage de 6,0 (fig. 33). La courbe d'activité enzymatique en fonction du pH est rendue légèrement asymétrique par une inhibition plus forte du côté acide. A pH : 5,0, l'activité n'est plus que de 25%, alors qu'elle se maintient à 75% pour pH : 7,0. Les valeurs de pH pour lesquelles l'activité mesurée représente 50% de l'activité maximale sont 5,3 et 7,3.

Deux tampons différents sont essayés vis-à-vis de la β -N-acétylglucosaminidase :

- tampon n° 1 = acide citrique (0,1M final), phosphate disodique (0,2M final) ;
- tampon n° 2 = citrate disodique (0,1M final).

Pour ces deux tampons le pH optimum ne varie pas (fig. 33). L'activité enzymatique maximale est inférieure avec le tampon n° 2. Cette différence augmente avec le pH ; à pH : 7,0 l'activité mesurée avec le tampon n° 2 représente 70% de celle obtenue avec le tampon n° 1.

Les pH optimum de la β -N-acétylglucosaminidase décrits dans la littérature sont reportés au tableau n° VI. Ils sont toujours inférieurs à 5 chez les Vertébrés et les Invertébrés. La β -N-acétylglucosaminidase des glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus* se distingue de celle des autres insectes par son pH optimum de 6.

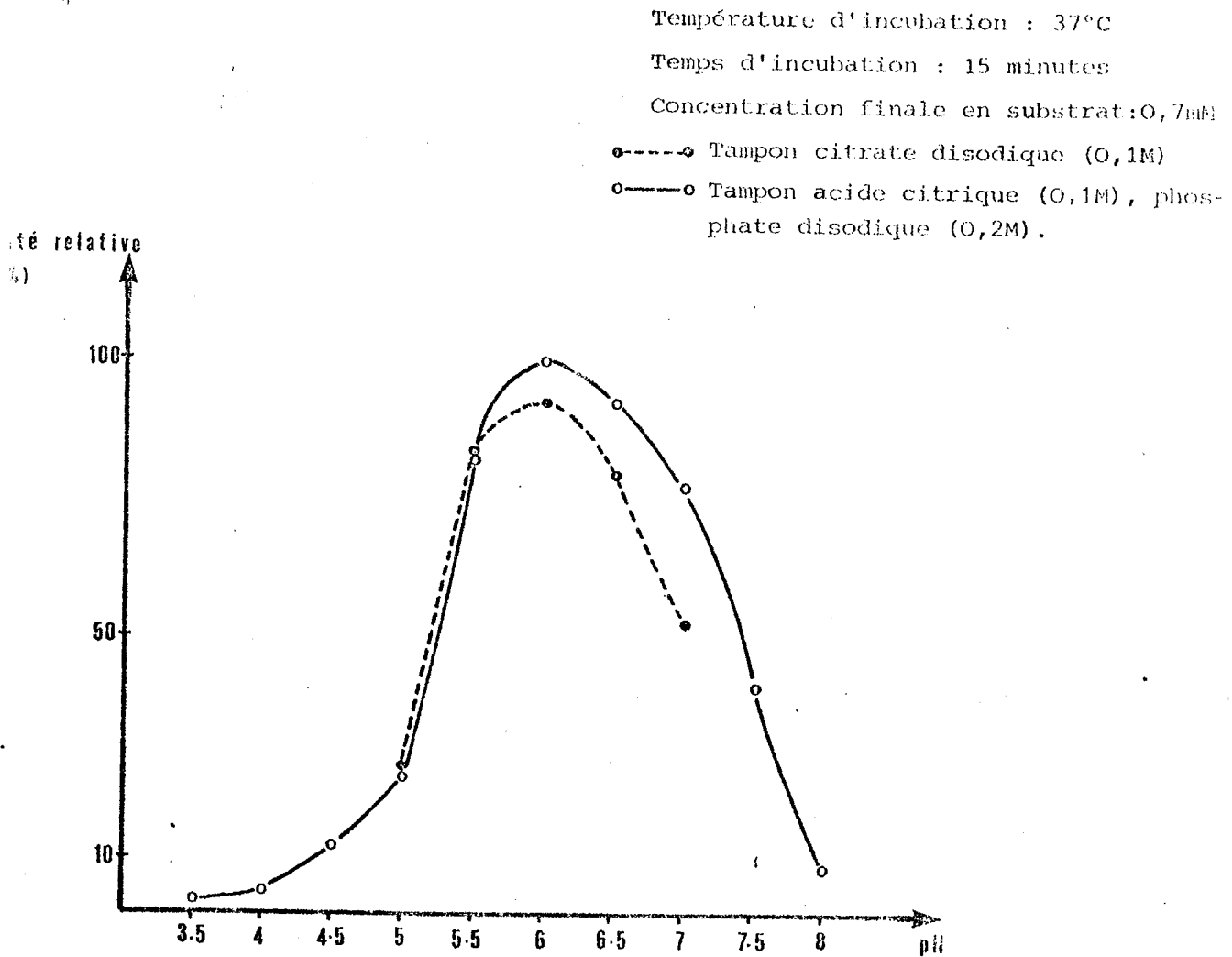


Figure n° 33 : Influence du pH et du tampon sur l'activité de la β -N-acétylglucosaminidase des glandes labiales d'*Aeromyrmex octospinosus*.

SOURCE DE L'ENZYME	pH OPTIMUM	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
Testicule de porc.....	4,2	FINDLAY et LEVY, 1960
Testicule de bélier.....	4,45 à 4,7	WOOLLEN et al, 1961
Foie de rat.....	4,3	PUGH et al, 1957
Tégument de <i>Locusta migratoria</i>	4 à 5	ZIELKOWSKI et SPINDLER, 1978
<i>Periplaneta americana</i>	4,3 à 4,8	POWNING et IRZYKIEWICZ, 1964
<i>Sitophilus oryzae</i>	voisinage de 4,7	WICKER, 1979
Vesse de loup (<i>Lycoperdon perlatum</i>).....	3,7 à 4,8	POWNING et IRZYKIEWICZ, 1964
<i>Aspergillus niger</i>	environ 4	OTAKARA, 1964
<i>Streptomyces griseus</i>	6,3	BERGER et REYNOLDS, 1958
<i>Escherichia coli</i> K12.....	7,7	YEM et WHU, 1976

TABLEAU n VI : Valeurs du pH optimum de différentes β -N-acétylglucosaminidases.

4.3.1.3.3. Influence de la concentration en substrat, Km de l'enzyme.

A titre d'exemple la figure 34 montre l'activité β -N-acétylglucosaminidase des glandes salivaires d'*Acromyrmex octospinosus* en fonction de la concentration en substrat.

Pour une concentration égale à 0,7mM, l'activité enzymatique passe par un maximum. Des concentrations supérieures induisent une inhibition par excès de substrat.

Cette inhibition est décrite au niveau de l'hémolymphe de *Periplaneta americana*, dans des broyats de Vesse de loup (POWNING et IRZYKIEWICZ, 1964) et dans les téguments de *Locusta migratoria* (ZIELKOWSKI et SPINDLER, 1978). Mais ce phénomène ne parait pas général : WICKER (1979) ne constate pas de déviation de la cinétique michaelienne pour la β -N-acétylglucosaminidase dosée sur des broyats d'ovaires ou des broyats totaux de *Sitophilus oryzae*.

La constante de Michaelis (Km) pour la β -N-acétylglucosaminidase digestive d'*Acromyrmex octospinosus* est mesurée à l'aide de la représentation de LINEWEAVER et BURK (1934) : 1/DO en fonction de 1/S (fig. 35). Dans le cas d'inhibition par excès de substrat, cette représentation n'est pas linéaire, et le Km est donné par l'intersection de la droite asymptotique avec l'axe des abscisses. Dans le cas présent cette asymptote peut être confondue avec la droite de régression obtenue pour des concentrations inférieures à 0,2mM.

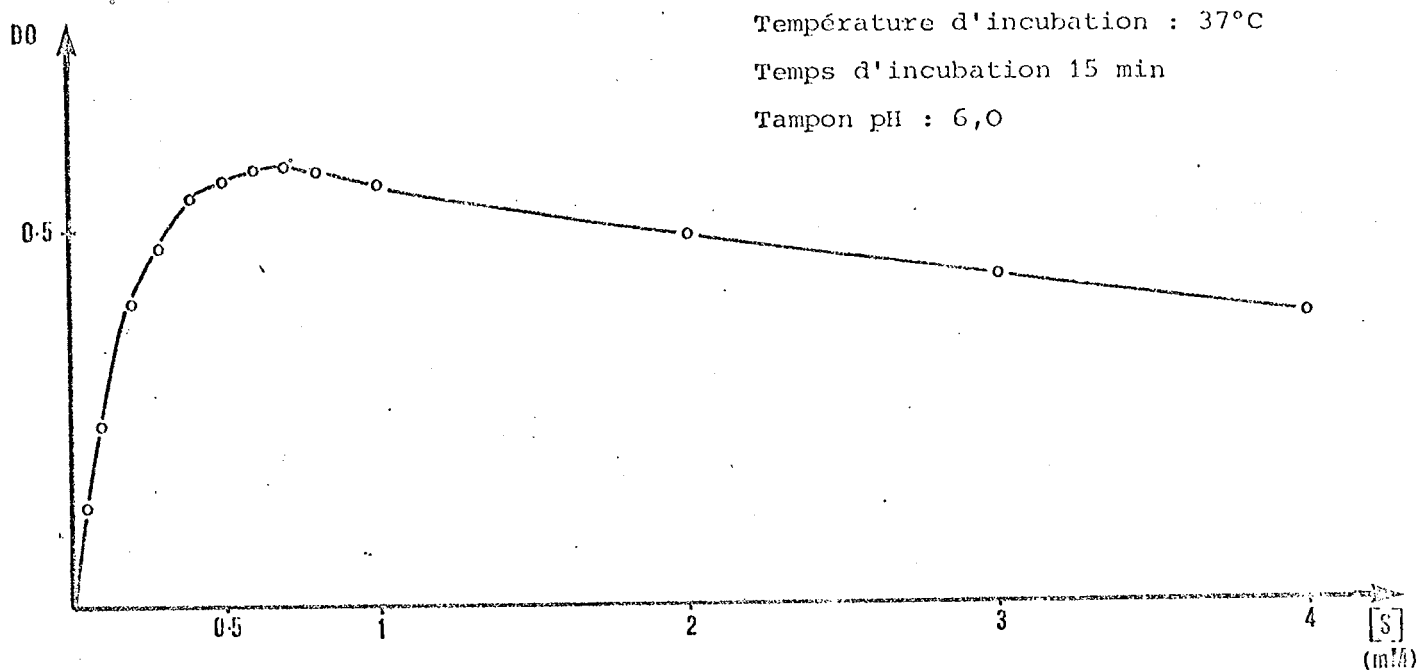


Figure n° 34 : Influence de la concentration en substrat sur l'activité de la β -N-acétylglucosaminidase des glandes labiales.

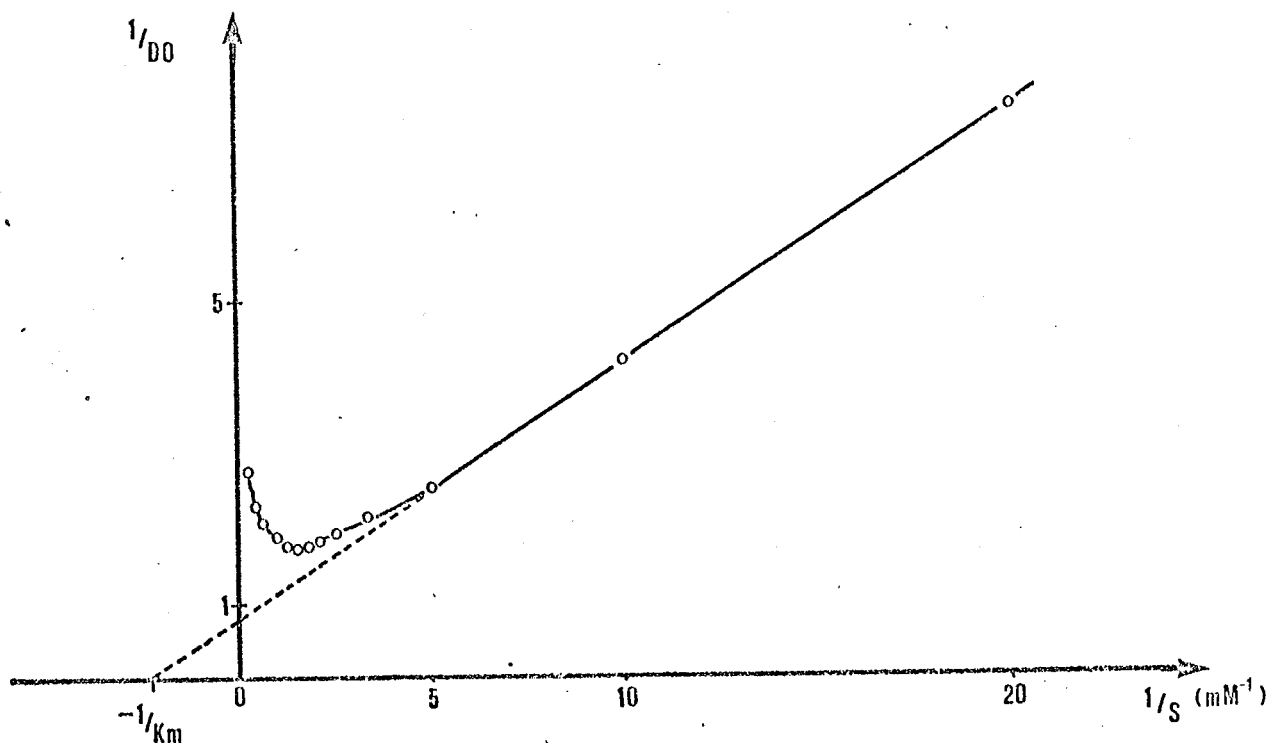


Figure n° 35 : Représentation selon LINEWEAVER et BURK : Inverse de l'activité enzymatique en fonction de l'inverse de la concentration en substrat.

Le Km est mesuré sur 9 broyats différents (3 concentrations de substrat par broyat et 5 mesures par concentration). Le coefficient de corrélation des droites obtenues varie de 0,95 à 0,98. Il résulte une valeur du Km de 0,36mM ± 0,08.

Les valeurs de Km recherchées dans la littérature s'échelonnent de 0,19 à 5mM (tableau n° VII). Celle mesurée pour la β-N-acétylglucosaminidase des glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus* correspond aux valeurs les plus faibles mesurées chez les Insectes. L'affinité de cette enzyme pour son substrat apparait donc importante.

SOURCE DE L'ENZYME	VALEUR DU Km	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
Tégument de <i>Locusta migratoria</i>	5,0 ± 0,5mM	ZIELKOWSKI et SPINDLER (1978)	
<i>Bombyx mori</i>	{ Hémolymphe.....	KIMURA (1977)	
	{ Liquide exuvial...		6,3mM
<i>Sitophilus oryzae</i>	{ Ovaires.....	WICKER (1979)	
	{ Broyats totaux....		compris entre 0,57 et 1,14mM compris entre 0,19 et 0,23mM
<i>Periplaneta americana</i>	{ Estomac,.....	POWNING et IRZYKIEWICZ (1964)	
	{ Hémolymphe.....		0,83mM
	{ Cuticule.....		0,77mM
Testicule de bélier.....	2,94 mM	WOOLLEN et al (1961)	
Testicule de porc.....	3,1mM	FINDLAY et LEVY (1960)	
Foie de rat.....	1,32mM	WALKER et al (1961)	
Vesse de loup : <i>Lycoperdon perlatum</i>	0,28mM	POWNING et IRZYKIEWICZ (1964)	

TABLEAU n° VII : Valeurs du Km de β-N-acétylglucosaminidases de différentes origines.

4.3.1.3.4. Influence de la température.

L'étude de l'influence de la température permet de décrire d'autres caractéristiques de l'enzyme. L'approche a été faite par deux méthodes différentes.

La figure 36 représente l'activité enzymatique mesurée en fonction de la température d'incubation. L'enzyme est stable en-dessous de 55°C. Son activité augmente avec la température. A 60°C la β-N-acétylglucosaminidase est partiellement détruite. Sa dénaturation est pratiquement totale à 70°C.

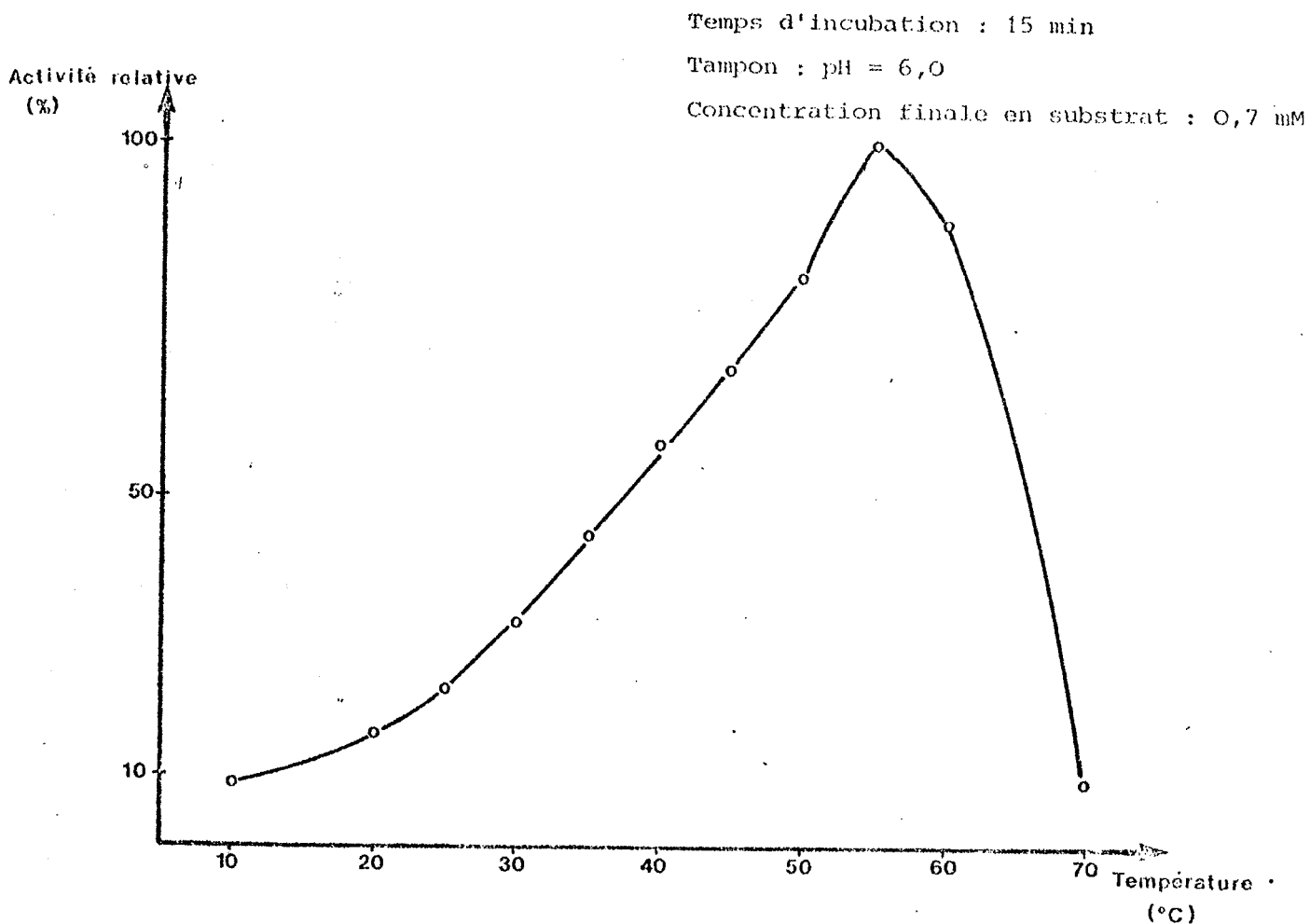


Figure n° 36 : Influence de la température d'incubation sur l'activité de la β -N-acétylglucosaminidase des glandes labiales.

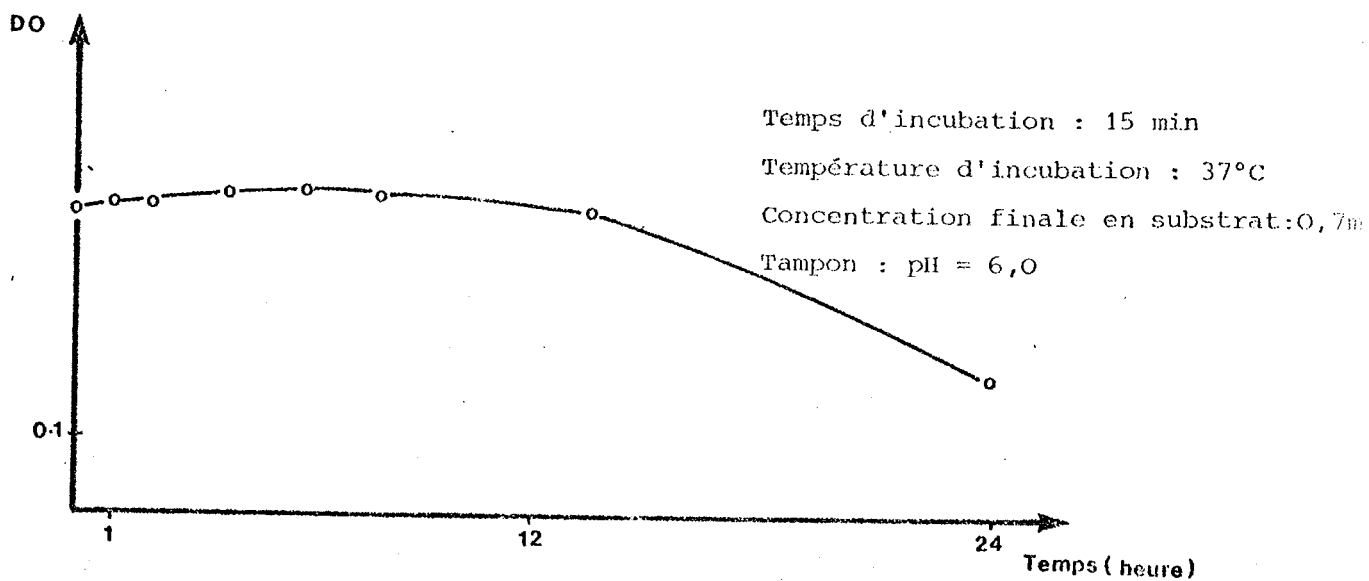


Figure n° 37 : Influence du temps de maintien de l'extrait enzymatique à 45°C sur l'activité de la β -N-acétylglucosaminidase des glandes labiales.

L'influence de la durée d'inactivation par la chaleur (à 45°C) renseigne sur la stabilité thermique de l'enzyme. Son activité n'est pas réduite dans un extrait enzymatique maintenu à 45°C pendant 13 heures (fig. 37). Elle est même légèrement potentialisée dans les premières heures. Après 24 heures de conservation de l'extrait à 45°C, l'activité résultante correspond encore à près de 50% de l'initiale. La courbe révèle une grande stabilité de la β -N-acétylglucosaminidase digestive chez *Acromyrmex octospinosus*.

L'effet de la température sur la β -N-acétylglucosaminidase semble variable suivant sa source. OTAKARA (1964) sur *Aspergillus niger* mentionne des résultats similaires aux nôtres : stabilité de l'enzyme jusqu'à 60°C et dénaturation presque totale à 70°C. La β -N-acétylglucosaminidase du tégument de *Locusta migratoria* est stable jusqu'à 70°C (ZIELKOWSKI et SPINDLER, 1978) ; chauffée 20 minutes à 65°C elle ne possède plus qu'une activité résultante de 25 et 40% respectivement pour l'hémolymphe et la cuticule de *Periplaneta americana* (POWNING et IRZYKIEWICZ, 1964). Chez *Sitophilus oryzae*, la β -N-acétylglucosaminidase apparaît très sensible à la chaleur. Sa température optimale est de 38°C. Maintenu à 45°C, l'extrait ne présente plus que 75% de l'activité initiale après 90 minutes (WICKER, 1979).

4.3.1.3.5. Conclusions.

Les caractéristiques de la β -N-acétylglucosaminidase des glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus* permettent de définir les conditions optimales de dosage :

- concentration en glande : 1 glande broyée dans 1ml d'eau distillée
- temps d'incubation : 15 minutes
- tampon d'incubation : acide citrique (0,1M final), phosphate disodique (0,2M final)
- pH : 6,0
- concentration en substrat : 0,7mM final.

4.3.1.4. Influence du pH et de la température sur la β -N-acétylglucosaminidase de l'hémolymphe.

4.3.1.4.1. Introduction.

L'existence d'une deuxième β -N-acétylglucosaminidase chez ces fourmis, différente de celle des glandes labiales, ne nous permet pas d'étudier l'activité digestive sur des broyats d'animaux entiers. La dissection des glandes est longue et fastidieuse. Elles ont une morphologie arborescente à l'origine de ruptures lors du prélèvement qui, sans gêner l'étude des caractéristiques de l'enzyme, entraînent des sous-estimations quantitatives.

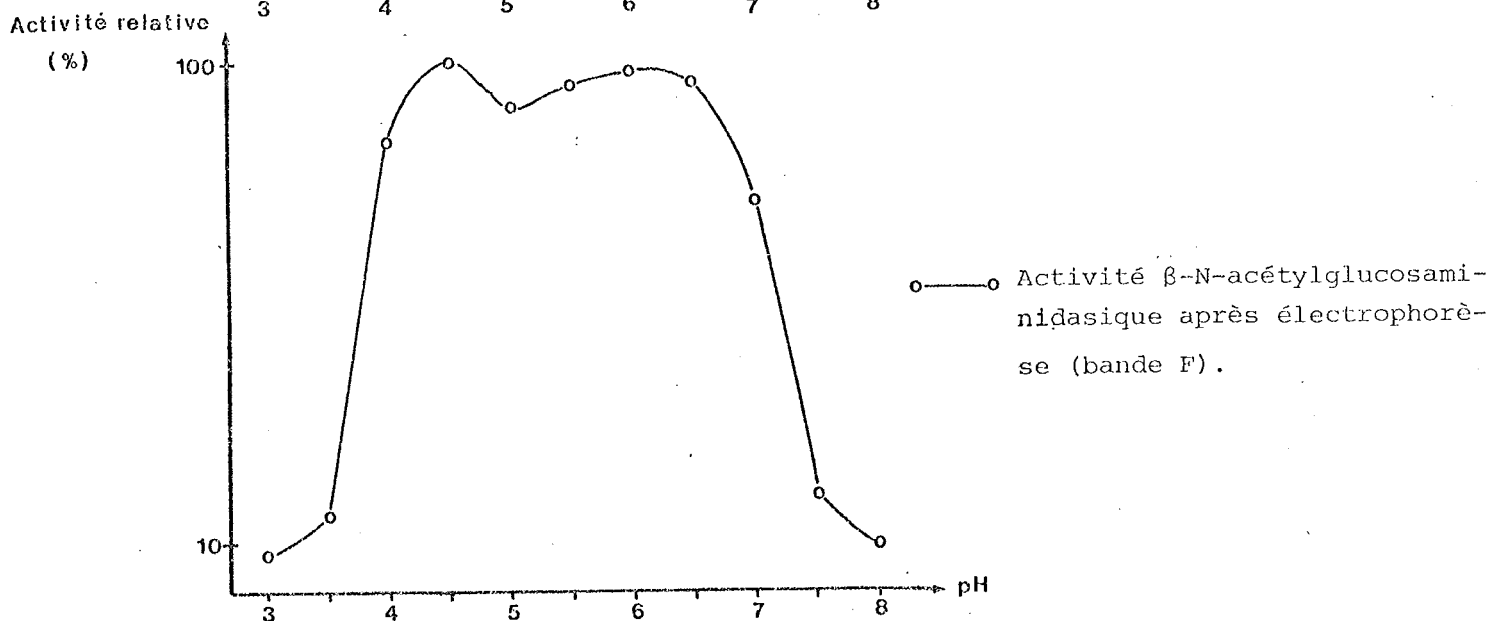
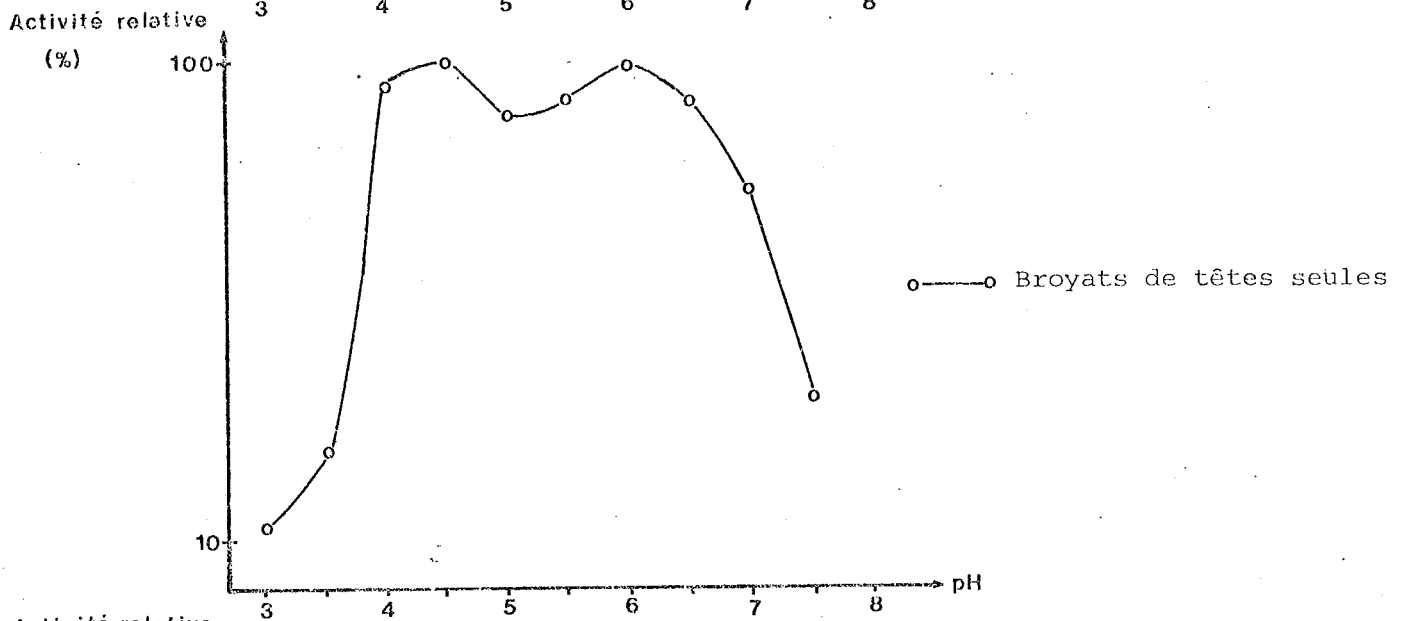
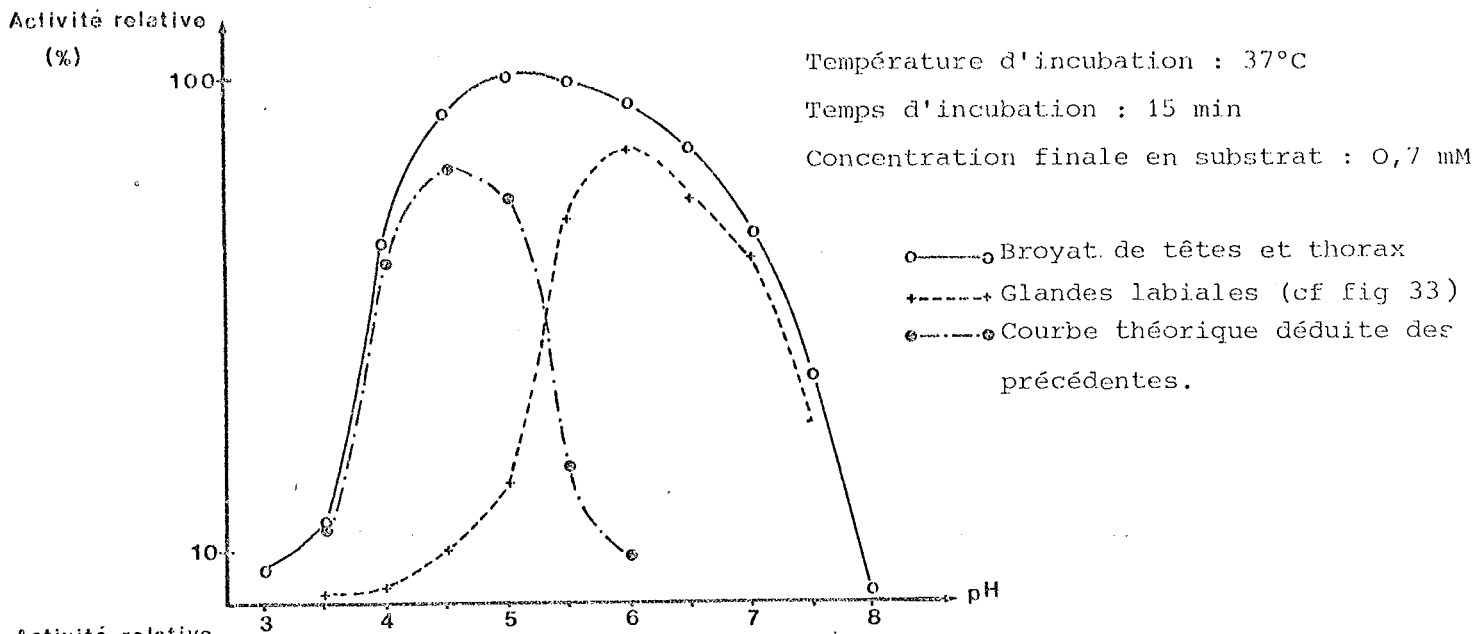


Figure n° 38 : Influence du pH sur l'activité β-N-acétylglucosaminidase chez *Acromyrmex octospinosus*.

En vue de rechercher un dosage sélectif, nous avons analysé quelques caractéristiques de la β -N-acétylglucosaminidase de l'hémolymphe.

Si cette enzyme, comme généralement observé chez les Insectes, a un pH optimum inférieur à 5 et une inhibition quasi totale à pH 6, le dosage effectué à ce pH sur des broyats totaux reflètera essentiellement l'activité de l'enzyme digestive.

Si l'enzyme de l'hémolymphe est particulièrement sensible à la température, il sera possible de la dénaturer par la chaleur dans les broyats totaux et ne doser que l'activité β -N-acétylglucosaminidasique digestive.

4.3.1.4.2. Influence du pH.

L'influence du pH sur l'activité enzymatique d'un broyat de têtes et thorax (qui contient donc les 2 enzymes) est décrite sur la figure 38A. On observe un étalement du maximum d'activité de pH : 4,5 à 6. Comparée à la courbe obtenue pour l'enzyme digestive seule (fig. 33), cette dernière apparaît comme la somme de deux activités : l'une ayant un pH optimal voisin de 4,5, l'autre de 6 (courbes tracées en pointillés sur la figure 38A).

Nous avons recherché ensuite l'effet du pH sur l'enzyme de l'hémolymphe seule. Un broyat de tête a été utilisé à cet effet comme extrait enzymatique. Le résultat (fig. 38B) laisse apparaître deux pics d'activité. L'on peut se demander si les broyats de têtes n'étaient pas pollués par la β -N-acétylglucosaminidase digestive provenant des sécrétions des glandes labiales.

Pour répondre à cette question, l'enzyme de l'hémolymphe a été isolée par électrophorèse (cf. § 4.3.1.2.1.). L'influence du pH sur l'enzyme (fig. 38C) révèle à nouveau deux pics d'activité.

Ces résultats amènent logiquement à conclure que l'activité β -N-acétylglucosaminidasique de l'hémolymphe est la résultante de 2 enzymes aux pH optimum de 4,5 et 6. L'utilisation de broyats d'animaux entiers ne permet donc pas dans ces conditions de ne doser que l'activité digestive à pH : 6,0.

4.3.1.4.3. Influence de la température.

La figure 39 montre l'activité β -N-acétylglucosaminidasique de l'hémolymphe en fonction de la durée du maintien de l'extrait enzymatique à 45°C. Cette courbe présente deux phases :

- la première phase, jusqu'à 60 minutes, correspond à une dénaturation rapide de l'activité enzymatique (65% de l'activité initiale après 1 heure à 45°C).

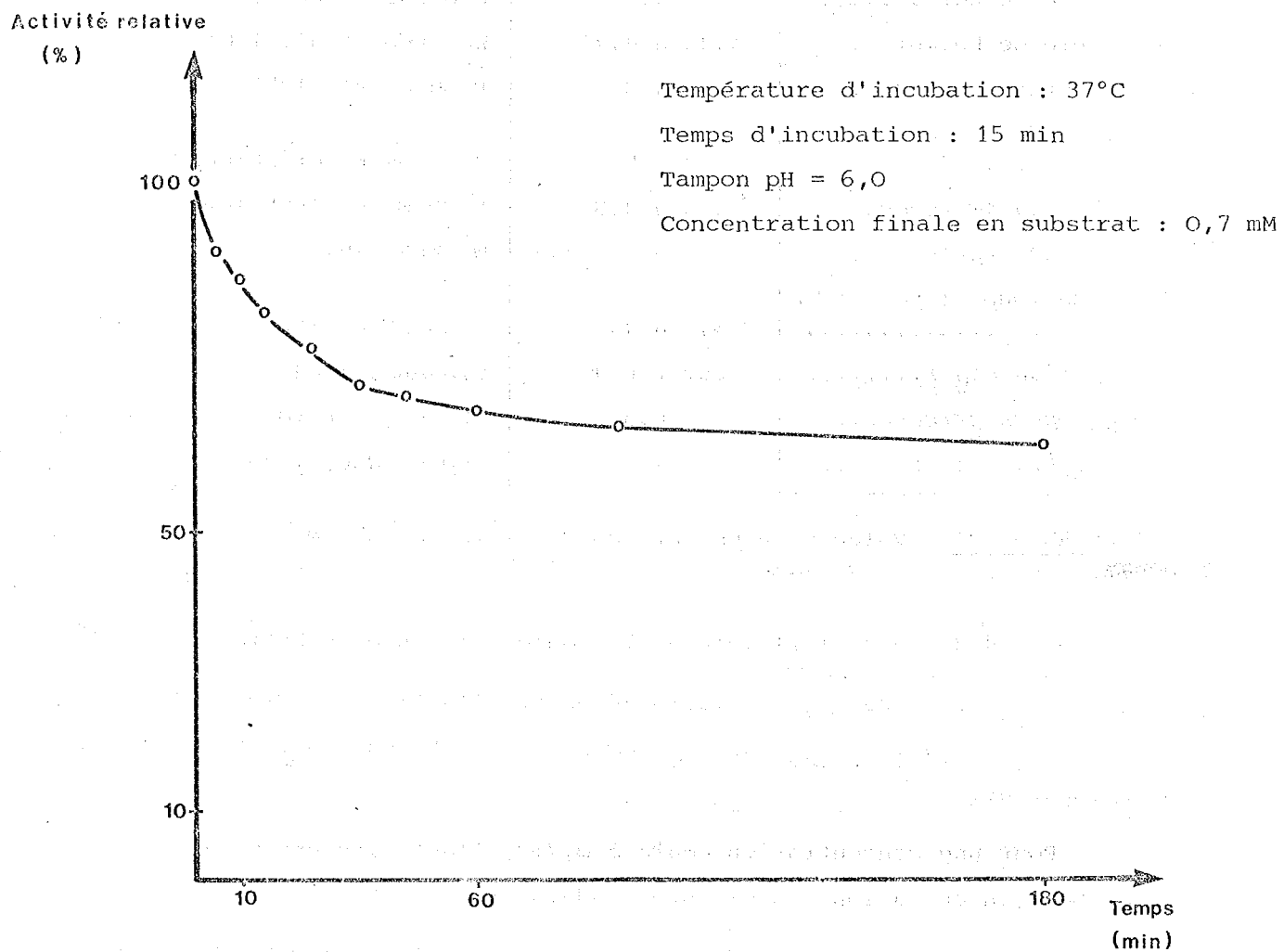


Figure n° 39 : Influence du temps de maintien de l'extrait enzymatique à 45°C sur l'activité β -N-acétylglucosaminidase d'un broyat de têtes.

- la deuxième phase, au-delà de 60 minutes, montre une stabilité de l'activité enzymatique.

Ce type de courbe s'explique par l'existence de 2 enzymes. L'une est dénaturée rapidement alors que l'autre est thermostable. Un phénomène analogue est décrit chez *Sitophilus oryzae* par WICKER (1979).

La stabilité thermique d'une des deux enzymes composant l'activité β -N-acétylglucosaminidase de l'hémolymphe ne permet pas d'utiliser la chaleur pour ne doser que l'enzyme digestive dans des broyats d'animaux entiers.

4.3.1.4.4. Conclusion.

Aucune des deux méthodes simples envisagées pour ne doser que la β -N-acétylglucosaminidase digestive sans interférence avec celle de l'hémolymphe ne peut être retenue et l'extraction des glandes salivaires par dissection s'impose. Celle-ci est menée avec le plus grand soin pour éviter les inconvénients soulignés ci-dessus.

4.3.1.5. Activité de la β -N-acétylglucosaminidase digestive chez *Acromyrmex octospinosus*.

4.3.1.5.1. Comparaison entre les sexués et les ouvrières de différentes tailles.

L'activité de la β -N-acétylglucosaminidase est mesurée sur 8 broyats de 4 paires de glandes labiales pour chacun des groupes suivants : ouvrières minor, ouvrières media, ouvrières major, femelles ailées et mâles ailés. Les résultats sont reportés dans le tableau n° VIII.

L'activité exprimée par individu varie dans un rapport de 1 à 17 et croît avec la taille de la fourmi. Les activités pour les sexués mâles et femelles ne sont pas significativement différentes (seuil 1%). Lorsque les activités enzymatiques sont exprimées par μ g de protéine, les valeurs sont beaucoup moins étendues. Elles restent cependant distinctes entre les trois groupes d'ouvrières et les sexués mâles. Bien que l'activité par individu des femelles ailées soit plus importante que celle des ouvrières, ramenée par μ g de protéine elle ne diffère pas de celle des ouvrières major. L'explication est donnée par la teneur en protéine des glandes labiales (tableau n° VIII) qui, chez les femelles ailées, est très supérieure aux autres groupes. Ce taux protéinique élevé dans les glandes salivaires des femelles ailées ne trouve pas d'explication ici. Il faut peut être le relier à une fonction supplémentaire de cette glande pour les futures reines qui, après essaimage auront à fonder, seules, de nouvelles sociétés.

CASTES ET SOUS CASTES	OUVRIERES			SEXUES	
	MINOR	MEDIA	MAJOR	FEMELLES	MALES
Poids individuel en µg	< 1	~ 4	~ 15	~ 50	~ 35
Teneur en protéine µg/glandes	1,31 ± 0,25 variance : 0,09	3,51 ± 0,80 variance : 0,91	4,62 ± 0,88 variance : 1,10	8,44 ± 1,00 variance : 1,42	5,22 ± 1,36 variance : 2,66
Activité de la β-N-acétylglucosaminidase en nM PNP/min/animal	a 1,01 ± 0,20 variance : 0,06	b 4,11 ± 0,55 variance : 2,38	c 9,16 ± 2,85 variance : 11,62	d 15,53 ± 2,46 variance : 8,67	d 17,11 ± 3,29 variance : 15,46
<p>Comparaison globale par l'analyse de variance à un critère de classification F calculé = 51,2 ddl = 4 et 35 F théorique (1%) = 4,02</p> <p>Comparaison deux à deux : test de NEWMAN et KEULS : plus petite amplitude significative (1%) pour 2 moyennes = 1,70 Les moyennes indicées avec des lettres différentes sont significativement différentes à 1%</p>					
Activité de la β-N-acétylglucosaminidase en nM PNP/min/µg protéine	m 0,79 ± 0,20 variance : 0,06	n 1,21 ± 0,36 variance : 0,19	o 2,00 ± 0,52 variance : 0,38	o 1,86 ± 0,33 variance : 0,15	p 3,88 ± 0,54 variance : 0,42
<p>Comparaison globale par l'analyse de variance à un critère de classification F calculé = 32,4 ddl = 4 et 35 F théorique (1%) = 4,02</p> <p>Comparaison deux à deux : test de NEWMAN et KEULS : plus petite amplitude significative (1%) pour 2 moyennes = 0,30 Les moyennes indicées avec des lettres différentes sont significativement différentes à 1%</p>					

TABLEAU n° VIII : Activité comparée de la β-N-acétylglucosaminidase digestive des ouvrières et sexués d'*Acromyrmex octospinosus*.

Pour les trois groupes d'ouvrières, l'activité de la β -N-acétylglucosaminidase est mesurée individuellement sur 10 fourmis. L'activité enzymatique est alors exprimée par mg de poids frais d'animal (tableau n° IX).

OUVRIERES	MINOR	MEDIA	MAJOR
Poids individuel en mg	de 2 à 4	de 5 à 7	de 10 à 15
Activité de la β -N-acétylglucosaminidase en nM pNP/min/mg d'animal frais	1,68 \pm 0,38 variance : 0,28	1,03 \pm 0,16 variance : 0,05	0,64 \pm 0,28 variance : 0,15
Comparaison globale par l'analyse de variance à un critère de classification : F calculé : 17,2 ddl : 2 et 27 F théorique (1%) : 5,49 Comparaison deux à deux : test de NEWMAN et KEULS : plus petite amplitude significative (1%) pour 2 moyennes : 0,30. Les moyennes sont significativement différentes à 1%.			

TABLEAU n° IX : Activité de la β -N-acétylglucosaminidase digestive exprimée en mg de poids frais d'animal pour 3 groupes d'ouvrières d'*Acromyrmex octospinosus*.

Rapportée à l'unité de poids, l'activité de la β -N-acétylglucosaminidase est supérieure chez les ouvrières minor et inversement proportionnelle à la taille de la fourmi. Entre les trois groupes d'ouvrières expérimentés, les activités enzymatiques sont significativement différentes (1%); l'activité des petites étant près du triple de celle des grandes.

4.3.1.5.2. Influence du jeûne.

Afin de déterminer si la β -N-acétylglucosaminidase des glandes labiales est constitutive ou induite, l'influence du jeûne (2, 5 et 7 jours) sur l'activité de cette enzyme est évaluée sur des ouvrières major.

Les résultats présentés dans le tableau n° X ne révèlent aucune différence significative entre les fourmis en jeûne et celles prélevées dans un nid.

Ouvrières	du nid	Jeûne de 2 jours	Jeûne de 5 jours	Jeûne de 7 jours
Activité de la β -N-acétylglucosaminidase en nM pNP/min/animal	9,16 \pm 2,85 variance : 11,62	12,06 \pm 4,52 variance : 29,2	8,10 \pm 2,91 variance : 12,08	8,44 \pm 1,95 variance : 5,45
Comparaison globale par l'analyse de variance à 1 critère de classification : F calculé : 1,78 ddl : 3 et 28 F théorique (5%) : 2,95 Les 4 moyennes ne sont pas significativement différentes.				

TABLEAU n° X : Influence du jeûne sur l'activité β -N-acétylglucosaminidasique digestive chez *Acromyrmex octospinosus*.

4.3.1.5.3. Conclusion.

L'activité totale de la β -N-acétylglucosaminidase des glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus* est proportionnelle au poids de l'animal. Exprimée par unité de poids d'animal elle est supérieure pour les petites ouvrières et inversement proportionnelle à la taille de l'animal.

Le jeûne n'a pas d'influence sur la synthèse de la β -N-acétylglucosaminidase. Cette enzyme semble être constitutive.

4.3.2. Etude de l'activité chitobiasique.

4.3.2.1. Existence d'une chitobiase dans les glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus*.

La présence d'une activité chitobiasique dans les glandes salivaires est recherchée sur des broyats de 5, 10 et 20 glandes broyées dans 2ml d'eau distillée.

La formation de N-acétylglucosamine est proportionnelle à la concentration en glandes et au temps d'incubation (fig. 40). Pour 5 paires de glandes broyées dans 2ml d'eau distillée, l'activité enzymatique est rigoureusement proportionnelle à la durée d'incubation jusqu'à 60 minutes. Pour un broyat de 10 paires de glandes labiales dans 2ml d'eau distillée, la linéarité de la courbe d'activité enzymatique est respectée jusqu'à 30 min d'incubation.

Dans la suite des travaux une concentration de 5 glandes/ml et une durée d'incubation de 15 minutes seront retenues.

Température d'incubation : 37°C

Tampon : pH = 7,0

Concentration finale en substrat: 0,5 mM

Quantité de N-acétylglucosamine
formée dans le milieu
réactionnel (µg)

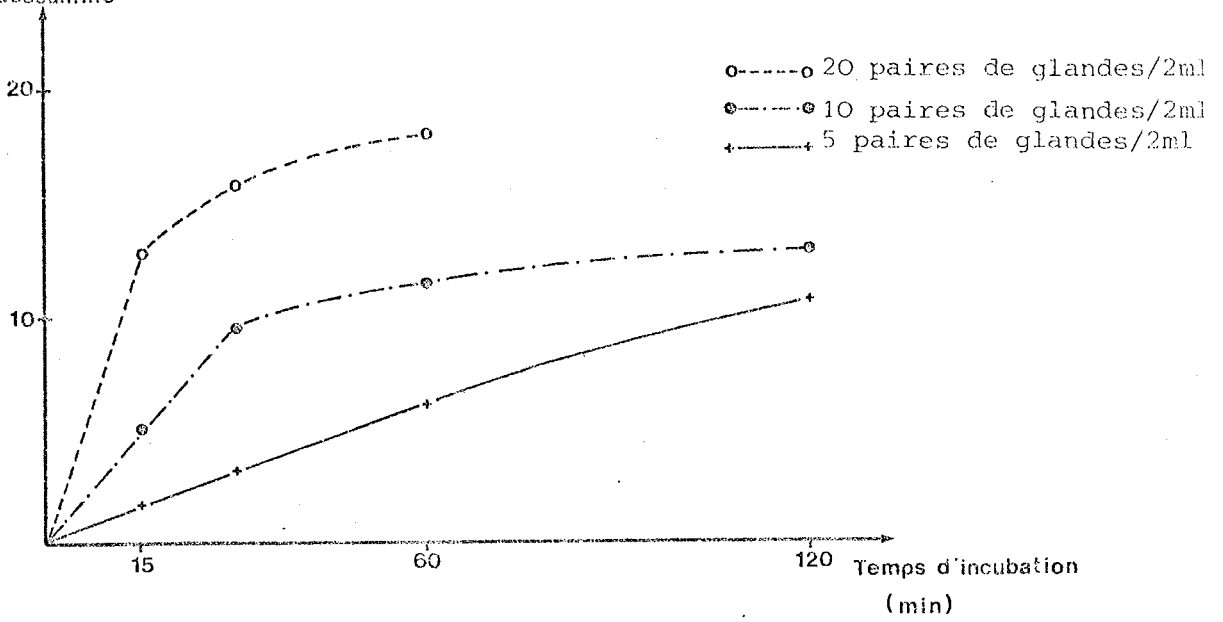


Figure n° 40 : Activité chitobiasique en fonction du temps d'incubation pour des broyats d'un nombre différent de glandes labiales

Activité relative
(%)

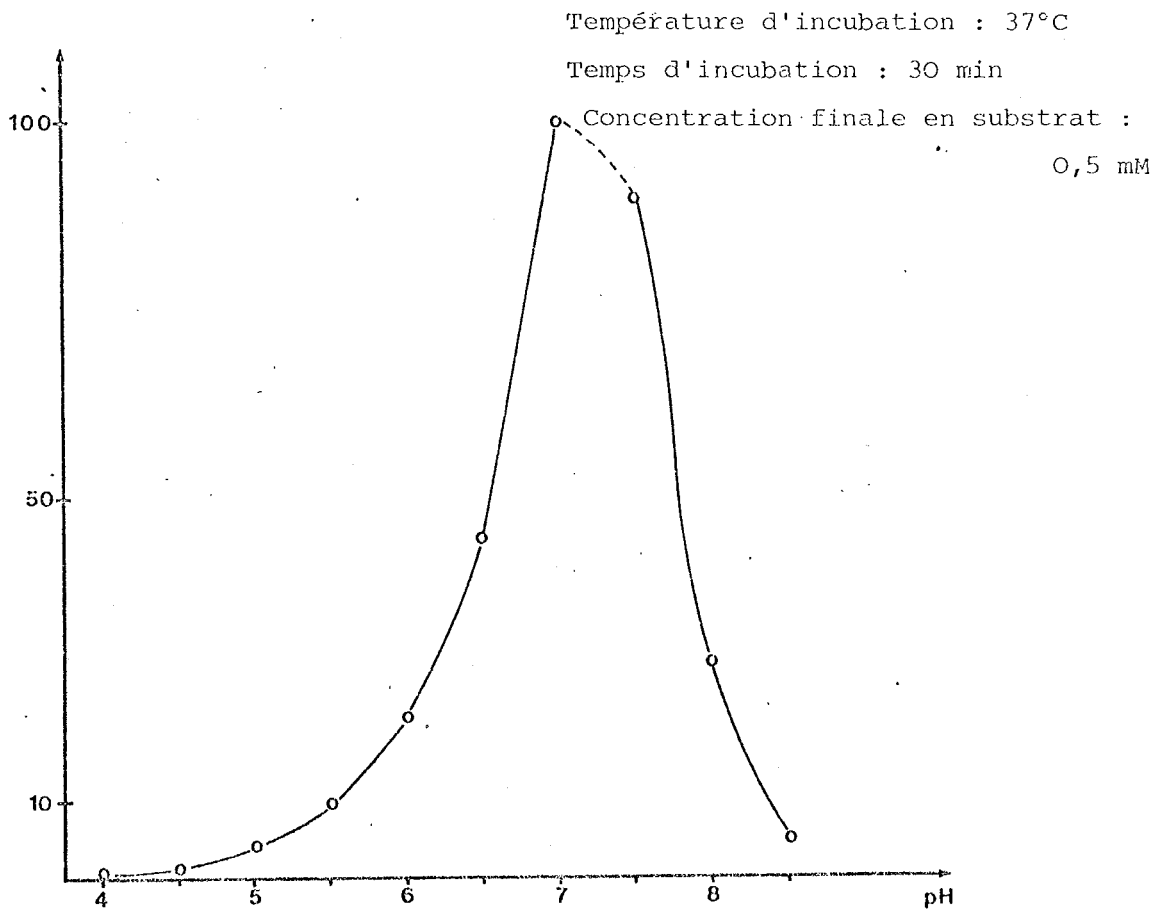


Figure n° 41 : Influence du pH sur l'activité chitobiasique des glandes labiales.

4.3.2.2. pH optimum.

Le pH optimum de la chitobiase des glandes labiales est compris entre pH 7,0 et 7,5 (fig. 41). La courbe d'activité enzymatique en fonction du pH est très pointue : l'activité à pH : 6,5 ne représente que 45% de celle à pH : 7,0 ; à pH : 8,0 ce pourcentage décroît à 28,5%.

4.3.2.3. Effet de la température.

La figure 42 représente l'activité chitobiasique mesurée en fonction de la température d'incubation.

Pour des températures supérieures à 20°C, l'activité enzymatique diminue. Cette décroissance est lente jusqu'à 40°C où l'activité de la chitobiase représente encore 95% de celle à 20°C. La dénaturation thermique apparaît entre 50 et 60°C. Elle est presque totale dès 60°C.

La stabilité de l'enzyme à la chaleur est mesurée par un maintien plus ou moins long de l'extrait à 45°C. L'activité chitobiasique reste inchangée au bout de 24 heures.

4.3.2.4. Migration électrophorétique comparée à celle de la β -N-acétylglucosaminidase.

Le rapport de l'activité chitobiasique sur l'activité β -N-acétylglucosaminidasique mesuré sur des extraits de glandes (cf. Matériel et Méthodes § 4.2.3.5.) varie de 0,46 à 0,57. Ce même rapport est mesuré après électrophorèse sur les bandes de gel contenant l'activité β -N-acétylglucosaminidasique. Il est compris entre 0,52 et 0,57 et ne diffère pas du précédent. Dans ces conditions électrophorétiques, les deux activités enzymatiques se retrouvent dans la même bande de migration.

4.3.2.5. Conclusion.

Les glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus* présentent une activité chitobiasique dont les caractéristiques sont différentes de celles de la β -N-acétylglucosaminidase décrite précédemment. En effet, si le rapport de l'activité chitobiasique sur l'activité β -N-acétylglucosaminidasique reste inchangé dans le système électrophorétique utilisé, le pH optimum et l'influence du pH sur ces deux activités sont très différents. De plus, l'activité de la β -N-acétylglucosaminidase croît avec la température jusqu'à 55°C alors que celle de la chitobiase est maximale dès 20°C. La chitobiase

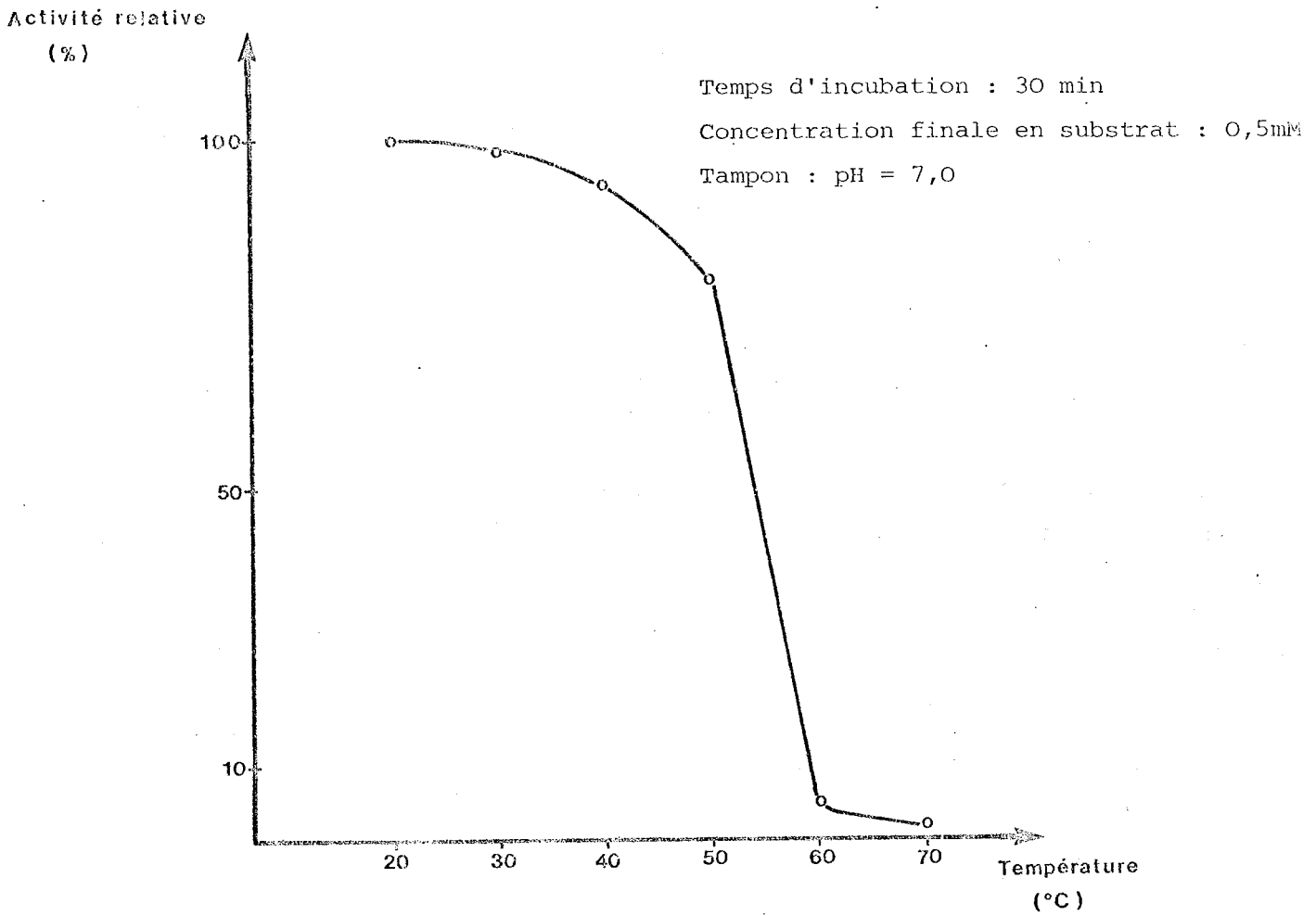


Figure n° 42 : Influence de la température d'incubation sur l'activité chitobiasique des glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus*.

apparaît plus stable à 45°C que la β -N-acétylglucosaminidase : après 24 heures à cette température toute l'activité est retrouvée pour la première mais est réduite de 55% pour la seconde.

4.3.3. Etude de l'activité chitinasique.

4.3.3.1. Digestion de la chitine par les extraits de glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus*.

La capacité des extraits à glandes labiales de digérer la chitine est évaluée sur des broyats de 15 et 25 glandes par ml. d'eau distillée. La quantité de N-acétylglucosamine formée par ml en fonction du temps d'incubation est reportée sur la figure 43.

Pour les deux extraits la vitesse de digestion reste constante pendant les 12 premières heures d'incubation. Elle diminue ensuite mais un temps d'incubation de 24 heures sera retenu car la quantité plus importante de N-acétylglucosamine permet un meilleur dosage.

4.3.3.2. pH optimum et influence du tampon.

Le pH optimum de la chitinase des glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus* se situe à pH 7,0 (fig. 44). Comme pour la chitobiase, la courbe d'activité enzymatique en fonction du pH est très pointue. A 0,5 unité de pH de part et d'autre de l'optimum, l'activité est de 60%. A pH 6,4 et 7,6, l'activité mesurée représente 50% de l'activité maximale.

Deux tampons différents sont essayés :

- tampon n° 1 : acide citrique (0,1M), phosphate disodique (0,2M)
- tampon n° 2 : tampon phosphate (KH_2PO_4 : 0,1M - Na_2HPO_4 : 0,1M)

Pour ces deux tampons le pH optimum ne varie pas (fig. 44). L'activité enzymatique maximale est très inférieure pour le tampon n° 2. Elle ne représente que 30% de celle mesurée avec le tampon n° 1.

JEUNIAUX (1966) rapporte que presque toutes les chitinases étudiées ont un pH optimum de 5. L'activité est rapidement inhibée pour des pH inférieurs à 4,5, sauf pour la chitinase gastrique des Vertébrés, qui reste active à pH : 3,0. Les résultats relevés dans la littérature (tableau n° XI) le confirment. Seule deux espèces bactériennes ont une chitinase avec un pH optimum supérieur à 6. Il apparaît que la chitinase des glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus* possède un pH optimum exceptionnel de 7,0.

Température d'incubation : 37°C

Tampon : pH = 7,0

4mg de chitine par tube

●---● 25 paires de glandes/ml

○—○ 15 paires de glandes/ml

Quantité de N-acétylglucosamine
formée dans le
milieu réactionnel
(µg)

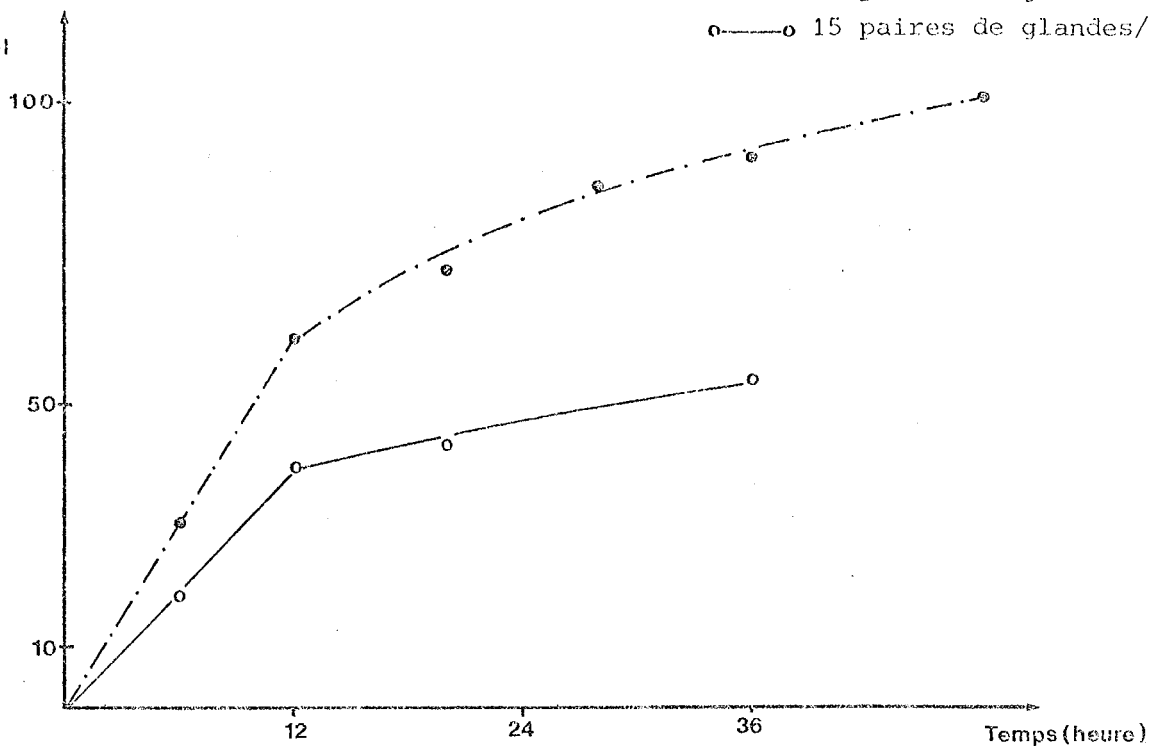


Figure n° 43 : Activité chitinasique en fonction du temps d'incubation pour des broyats d'un nombre différent de glandes labiales

Temps d'incubation : 24 heures

○—○ Acide citrique (0,1M) - phosphate
disodique (0,2M)

●---● Tampon phosphate (0,1M)

Activité relative
(%)

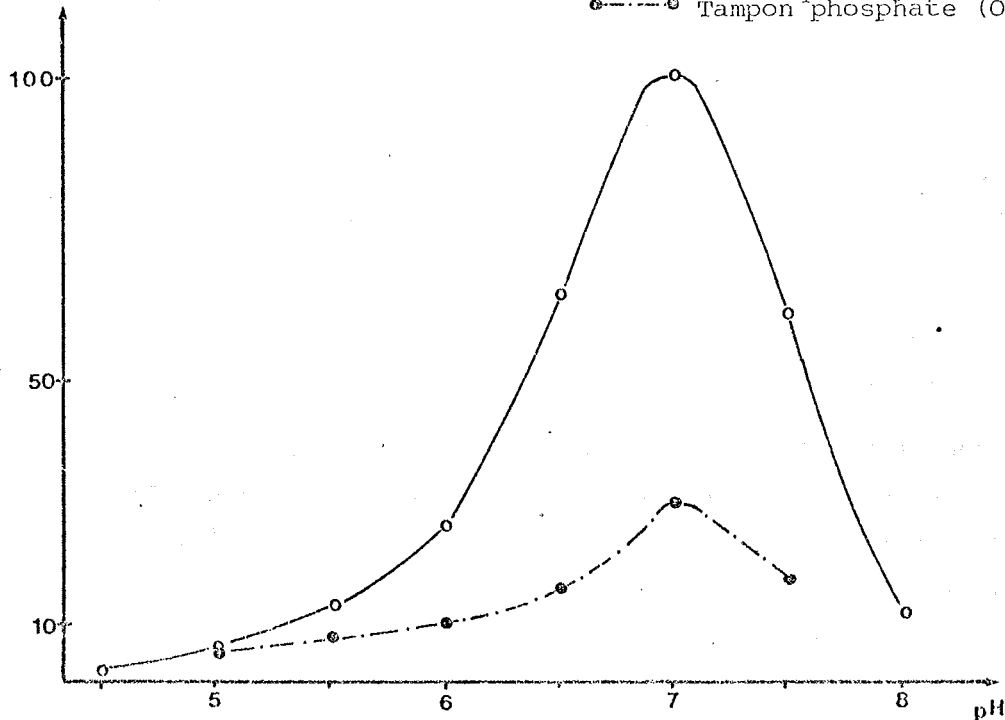


Figure n° 44 : Influence du pH et du tampon sur l'activité chitinasique des glandes labiales.

SOURCES DE LA CHITINASE	pH OPTIMUM	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
Extrait de termites : <i>Nasutitermes exitiosus</i> <i>Coptotermes lacteus</i>	~ 5,5	TRACEY et YOUATT (1958)
Extrait digestif de <i>Periplaneta americana</i>	entre 5,6 et 6	WATERHOUSE et al (1961a)
Tégument de larves de <i>Locusta migratoria</i>	5	ZIELKOWSKI et SPINDLER (1978)
<i>Arthrobacter sp.</i>	5	MORRISSEY et al (1976)
<i>Serratia marcescens</i>	6,4	MONREAL et REESE (1969)
<i>Streptomyces griseus</i>	6,3	BERGER et REYNOLDS (1958)
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	~ 5,0	TRACEY (1955)

TABLEAU n° X : pH optimum de chitinases de différentes origines.

4.3.3.3. Digestion prolongée de la chitine.

La figure 45 montre les résultats de digestion de la chitine par un extrait de glandes labiales de fourmis, sur une période de 45 jours à 37°C.

La stabilité de la chitinase des glandes salivaires est démontrée dans ces conditions. La vitesse de l'activité enzymatique diminue d'une manière régulière durant cette période. WATERHOUSE et al (1961a) démontrent de même la stabilité en présence de substrat sur de longue période des chitinases de *Periplaneta americana* et *Coptotermes lacteus*.

4.3.3.4. Effet de la concentration en chitine.

Il est clair (fig. 46) que pour une concentration en chitinase correspondant à 5 paires de glandes labiales/ml, le substrat est limitant jusqu'à une concentration de 40 mg/ml. L'activité enzymatique mesurée est directement proportionnelle à la quantité de substrat pour des concentrations inférieures à 10 mg/ml.

Q^{té} de N.acétylglucosamine
formée (µg)

Température d'incubation : 37°C
Tampon : pH = 7,0
4mg de chitine par tube

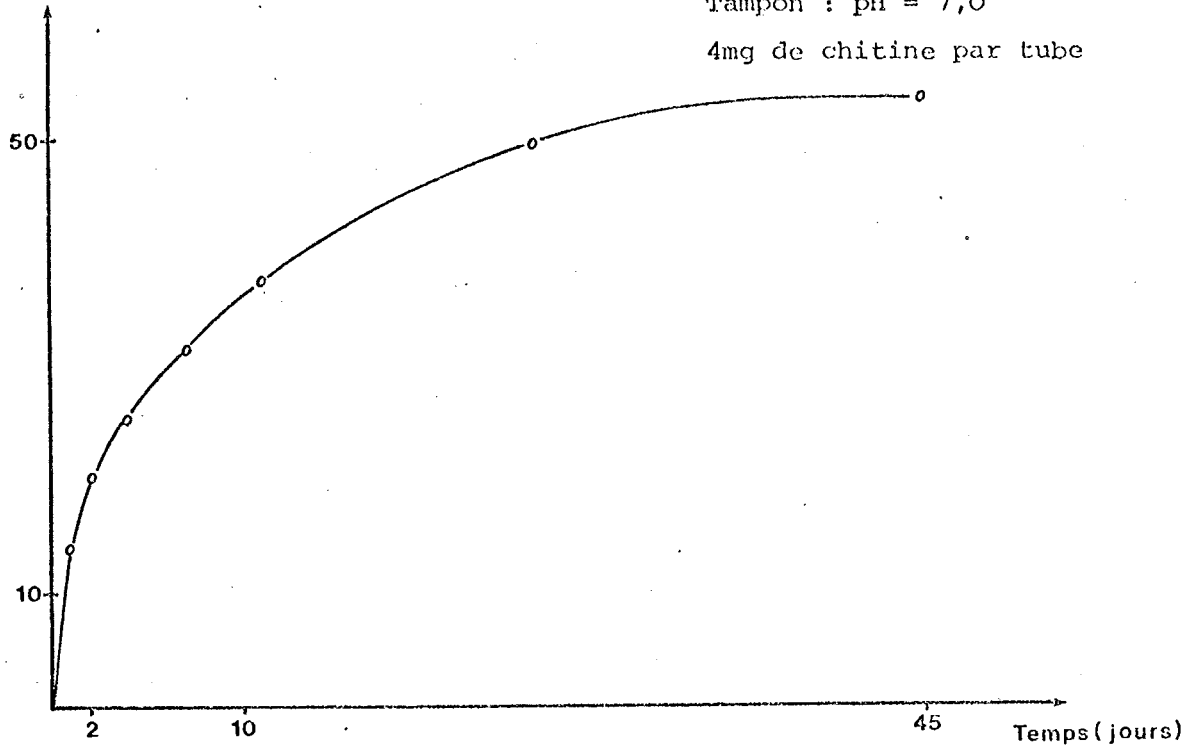


Figure n° 45 : Digestion prolongée de la chitine par un extrait de 5 glandes labiales par ml d'eau distillée.

Q^{té} de N.acétylglucosamine
formée(µg)

Temps d'incubation : 24 heures

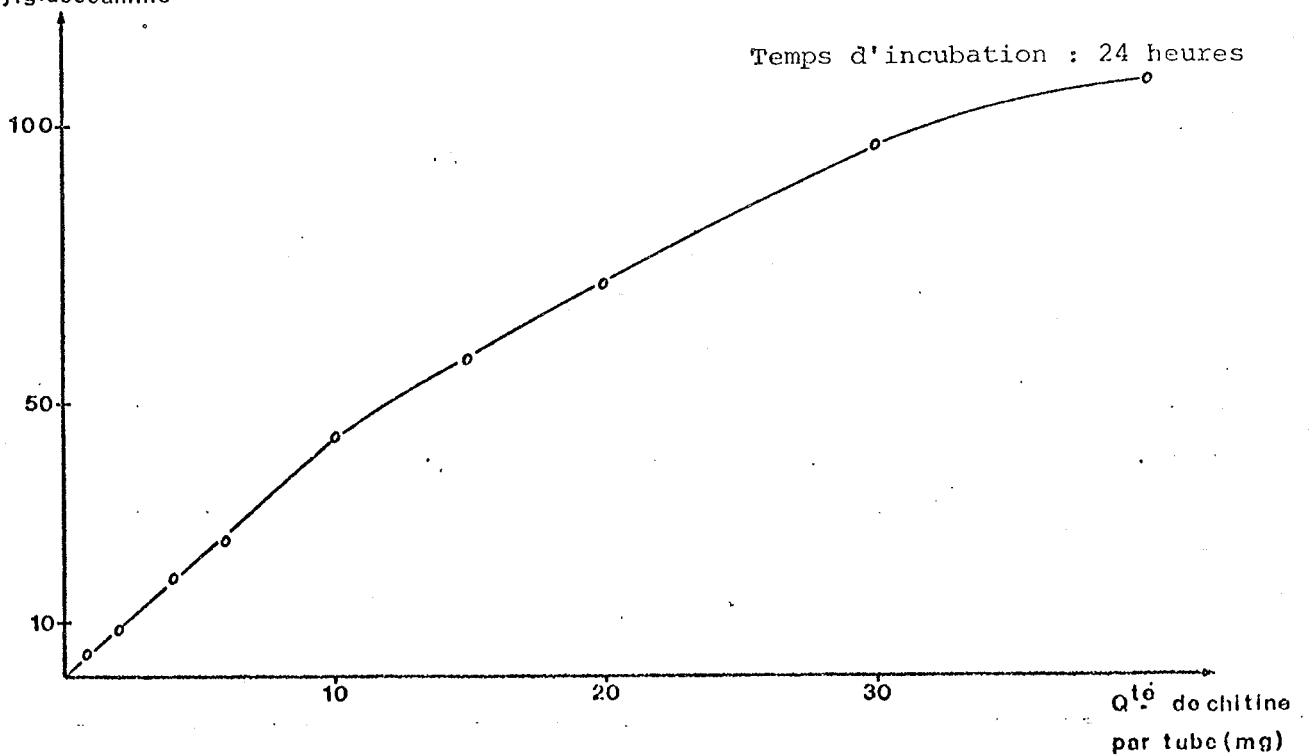


Figure n° 46 : Influence de la concentration en chitine sur l'activité chitinasique des glandes labiales.

Des concentrations en chitine de 40 mg et plus par ml seraient souhaitables pour les essais de chitinase des extraits de glandes. De telles concentrations entraînent cependant l'utilisation de quantité de chitine pure trop importante.

4.3.3.5. Effet de la chaleur.

L'activité de la chitinase, mesurée en fonction du temps de maintien de l'extrait enzymatique à 45°C (fig. 47), décroît rapidement. Après une heure à 45°C, l'activité résultante ne représente plus que 23% de l'activité initiale. Contrairement à la β -N-acétylglucosaminidase et à la chitobiase qui se sont révélées très stables à 45°C, la chitinase est rapidement dénaturée à cette température (tableau XII).

Temps à 45°C \ Activités enzymatiques salivaires	β -N-acétylglucosaminidase	Chitobiase	Chitinase
1 heure	100%	100%	23%
24 heures	45%	100%	-

TABLEAU n° XII : Comparaison des activités enzymatiques résultantes après maintien de l'extrait de glandes labiales à 45°C (en pourcentage de l'activité initiale).

4.3.3.6. Digestion de la partie insoluble dans l'eau du symbiote d'*Acromyrmex octospinosus*.

Des essais de digestion sont effectués sur la partie insoluble dans l'eau du champignon symbiotique de la fourmi. La concentration en mycète utilisée correspond à 259,5 mg de poids frais/ml soit 48,0 mg secs/ml. Après lavage à l'eau distillée et rejet des éléments solubles, nous obtenons une concentration en éléments insolubles de 35,5 mg secs/ml. Les essais portent sur 800 μ l de cette suspension soit 28,4mg d'insoluble. La digestion d'un extrait de 15 glandes/ml est mesurée sur ce substrat et simultanément sur la chitine en concentration variant de 1 à 10 mg/ml.

L'hydrolyse enzymatique des hyphes du symbiote par un extrait de glandes salivaires se révèle positive et libère en 24 heures 77,4 \pm 9,6 μ g de N-acétylglucosamine.

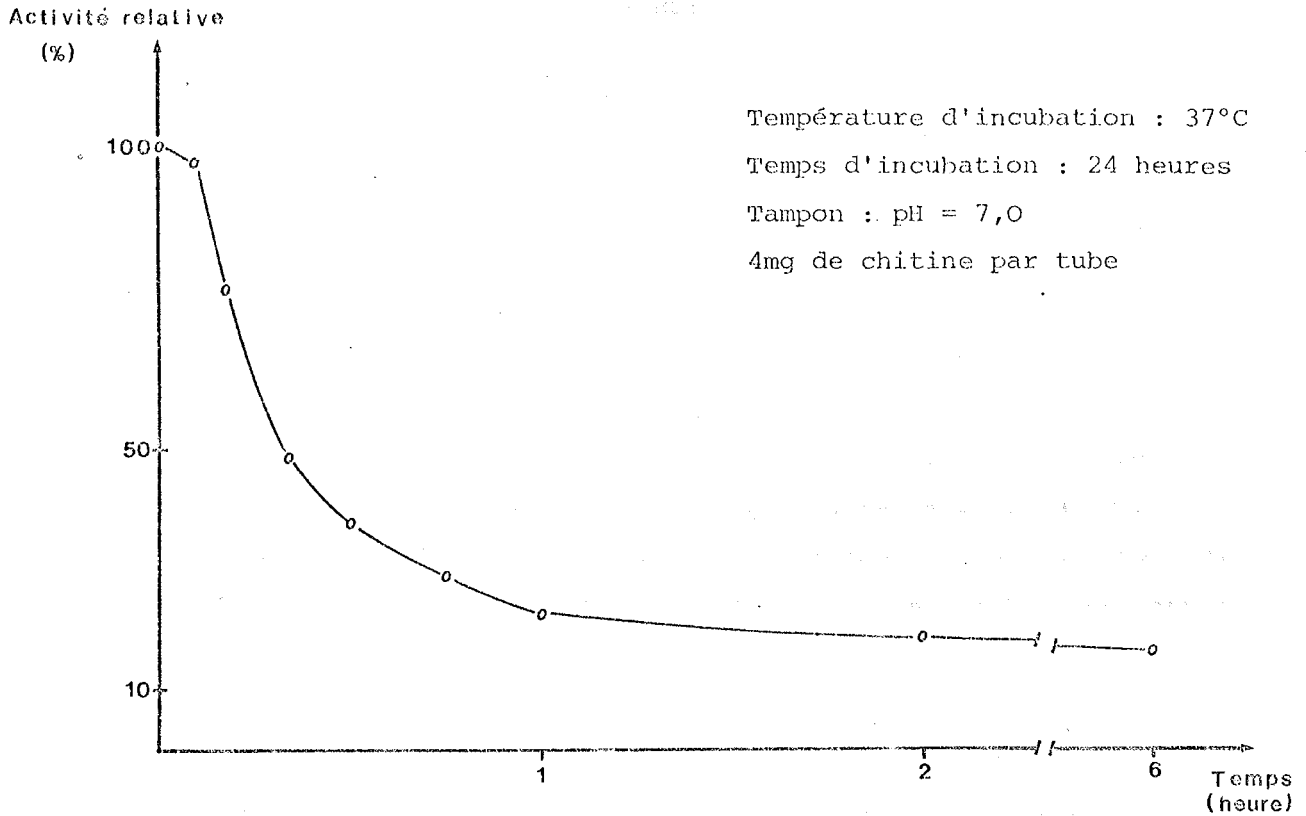


Figure n° 47 : Influence du temps de maintien de l'extrait enzymatique à 45°C sur l'activité chitinasique des glandes labiales.

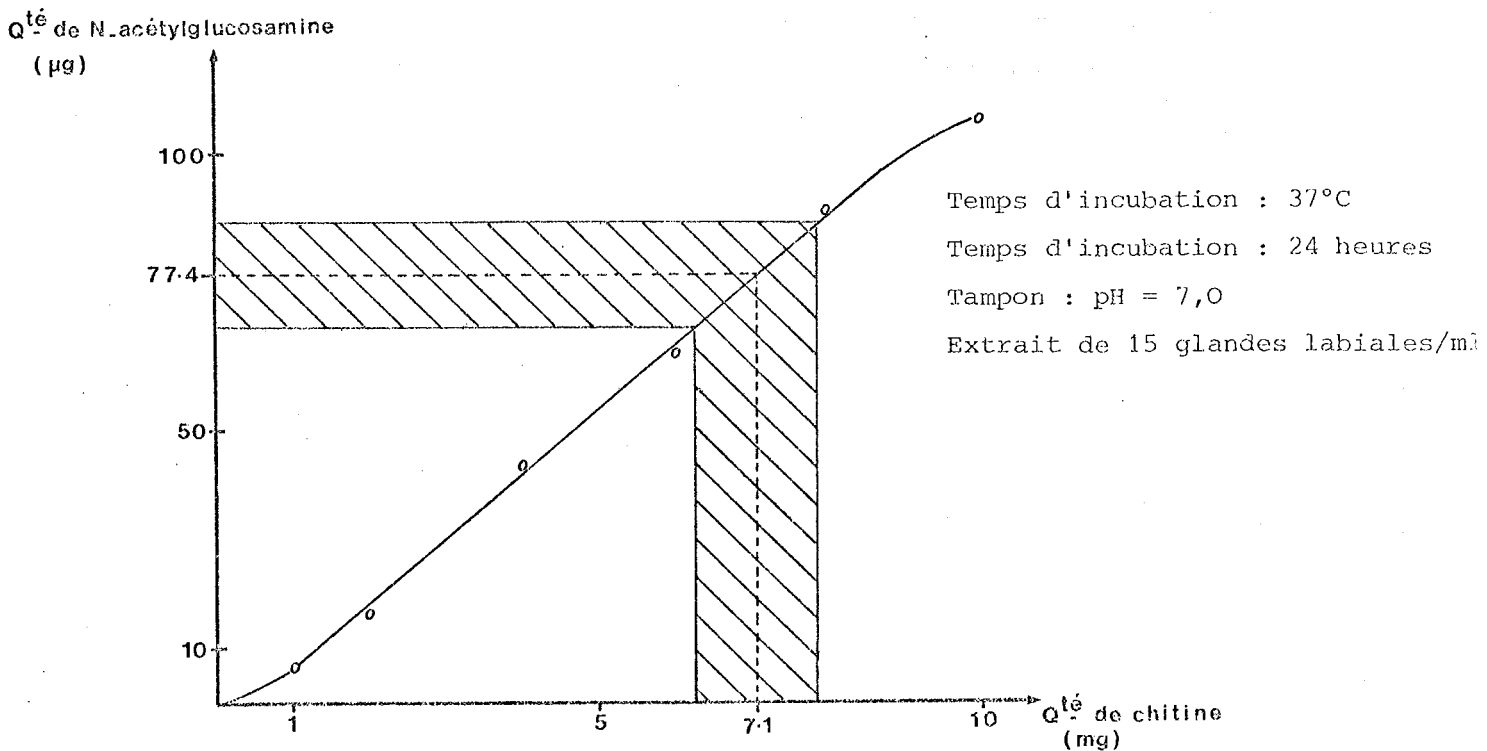


Figure n° 48 : Quantité de N-acétylglucosamine formée en fonction de la quantité de chitine dans le milieu réactionnel. La partie hachurée correspond à la quantité libérée par l'incubation avec 28,4mg d'insoluble du champignon symbiotique.

La quantité théorique de chitine présente dans la suspension de champignon peut être calculée d'après la courbe, établie parallèlement (fig. 48) : activité de la chitinase en fonction de la concentration en chitine. Elle est de $7,1 \pm 0,8$ mg de chitine pour 28,4mg de matériel insoluble.

4.3.3.7. Conclusions.

La présence d'une chitinase est démontrée dans les glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus*. Cette enzyme, avec un pH optimum de 7,0, présente des aspects singuliers par rapport aux chitinases décrites jusqu'alors dans la littérature. Stable pendant une longue durée à 37°C en présence de son substrat, la chitinase est rapidement dénaturée à 45°C.

L'action de cette activité chitinolytique sur 28,4 mg de matériel insoluble du champignon symbiotique produit une quantité de N-acétylglucosamine analogue à l'incubation en présence de 7,1 mg de chitine purifiée ; ce résultat indique un pourcentage de chitine égal à 18,5 par rapport au poids sec de champignon. Cette estimation est cependant loin de refléter la réalité. La chitine de la fraction insoluble du champignon se présente sous une forme complexe, souvent entourée et protégée par des molécules de glucanes (BARTNICKI-GARCIA, 1968). L'action de la chitinase glandulaire sur un tel substrat ne peut être identique à celle sur de la chitine purifiée, d'autant plus que l'enzyme s'adsorbe sur les grains insolubles de chitine pour l'hydrolyser. Si ces derniers sont masqués, l'attaque ne peut être que freinée.

4.3.4. Conclusion.

A la suite de ces travaux, nous pouvons conclure que la fourmi attine *Acromyrmex octospinosus* est adaptée à une nourriture fongique. Elle possède dans ses glandes labiales les indispensables enzymes chitinolytiques.

La chitinase a un pH optimum de 7,0 et paraît se singulariser de celles décrites jusqu'alors dans le monde vivant. Cette particularité est peut être liée à sa fonction spécifiquement digestive chez l'insecte.

L'activité chitobiasique est aussi présente dans les glandes labiales. L'hydrolyse de la chitine est totale et aboutit au monomère N-acétylglucosamine. La chitobiasique a également un pH optimum de 7,0, supérieur à ceux décrits couramment dans la littérature.

A cette activité chitinolytique est associée une β -N-acétylglucosaminidase spécifique des glandes labiales. Elle se distingue très nettement d'une autre présente dans tout le corps de l'animal. L'activité chitobiasique est le résultat d'une enzyme distincte de la β -N-acétylglucosaminidase des glandes salivaires. Le rôle de cette dernière dans un système chitinolytique reste obscur.

Les enzymes chitinolytiques sont capables d'hydrolyser la chitine des parois du champignon symbiotique. *In vivo*, cette digestion ne peut s'effectuer qu'au niveau de la poche infrabuccale où sont stockées les parois des hyphes consommés. La preuve directe n'est pas apportée dans ce travail. L'observation au microscope électronique des parois des hyphes contenues dans les boulettes rejetées ainsi que la comparaison du taux de chitine du mycélium prélevé sur un nid ou régurgité par les fourmis devraient nous permettre de vérifier l'attaque enzymatique dans cette poche. Ces recherches en cours nous permettront de conclure rapidement sur ce point.

La capacité pour *Acromyrmex octospinosus* de dégrader la chitine est importante au plan nutritif. Outre le gain d'énergie, elle leur permet de récupérer un intéressant supplément d'azote pour des adultes qui ne possèdent pas d'endopeptidases. La digestion *in vitro* d'environ 200mg (PF) de champignon symbiotique par l'extrait enzymatique de 3 glandes labiales libère en 24 heures 4,9 μ g d'azote par la N-acétylglucosamine.

La capacité de certains animaux à se nourrir de cellulose, kératine, chitine, peut être le résultat d'une modification métabolique au niveau des glandes exocrines avec l'acquisition de la faculté de sécréter les enzymes spécifiques (YONGE, 1935 cité par JEUNIAUX, 1954). Cependant, beaucoup de ces animaux hébergent dans leur

tube digestif ou dans des diverticules spécialisés, une microflore capable de produire les enzymes nécessaires à cette digestion. C'est le cas par exemple des termites inférieurs qui hydrolysent la cellulose grâce aux Protozoaires flagellés de leur tube digestif (CLEVELAND, 1925). La digestion de la chitine par les Mollusques gastéropodes est réalisée par une flore bactérienne intestinale (JEUNIAUX, 1954).

Il est indispensable de vérifier si l'activité des glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus* est due à une endosymbiose. Les moyens utilisés jusqu'alors (microscopie optique) ne nous ont pas permis d'observer une telle microflore. La conclusion ne pourra être apportée définitivement que par des analyses en microscopie électronique.

5- ETUDE DE L'ACTIVITE α -GLUCOSIDASIQUE DES GLANDES LABIALES ET DE L'ESTOMAC
D'*ACROMYRMEX OCTOSPINOSUS* (REICH).

5.1. INTRODUCTION.

L'amidon, polysaccharide de réserve de nombreuses plantes, contient deux polysides distincts : l'amylose et l'amylopectine, le premier formant 20 à 30% du total (PREVOT, 1970).

- L'amylose est un polyglucose dans lequel les unités glucose sont unies par une liaison α -1-4 pour former des chaînes de plusieurs centaines d'unités, peu ou pas ramifiées.

- L'amylopectine, au contraire, est une molécule hautement ramifiée composée de plusieurs centaines d'unités. Chacune d'elle porte de 20 à 25 liaisons glucoses en α -1-4. Les chaînes sont unies par des liaisons α -1-6 glucosidiques.

Le glycogène est l'hydrocarbure de réserve rencontré dans le monde animal (Vertébrés, Invertébrés) et chez quelques bactéries et levures (HORTON et WOLFROM, 1963). Il est abondant chez les champignons où il remplace l'amidon des végétaux supérieurs (BARTNICKI-GARCIA, 1968). Il est aussi présent dans le cytoplasme de celui cultivé par *Acromyrmex octospinosus* (DECHARME, 1980). Le glycogène, par sa structure chimique, ressemble étroitement à l'amylopectine. Il est cependant beaucoup plus ramifié et comporte 12 à 18 résidus de glucose par sous-unité.

L'hydrolyse de l'amidon et du glycogène est réalisée par différentes enzymes (LEE et WHELAN, 1971) :

* Hydrolyse des liaisons α -1-4 seulement : - α amylase (α , 1-4 glucan 4-glucanohydrolase, EC. 3.2.1.1.), classée comme endoenzyme car elle coupe les liaisons internes des chaînes linéaires.

- β amylase (β , 1-4 glucan maltohydrolase, EC. 3.2.1.2.), présente uniquement dans le monde végétal. C'est une exoenzyme qui hydrolyse les liaisons terminales du substrat par l'extrémité non réductrice.

* Hydrolyse des liaisons α -1-6 : différentes enzymes ("debranching enzymes") EC. 3.2.1.9. - EC. 3.2.1.10 - EC. 3.2.1.33.

* Hydrolyse des liaisons α -1-6 et α -1-4 : glucoamylase (α , 1-4 glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3.).

L'action de ces enzymes sur l'amidon ou le glycogène libère du maltose et un peu de glucose. Sa dépolymérisation passe par les maltodextrines, les maltohexaoses et les maltotrioses.

Chaîne linéaire de l'amidon ou du glycogène

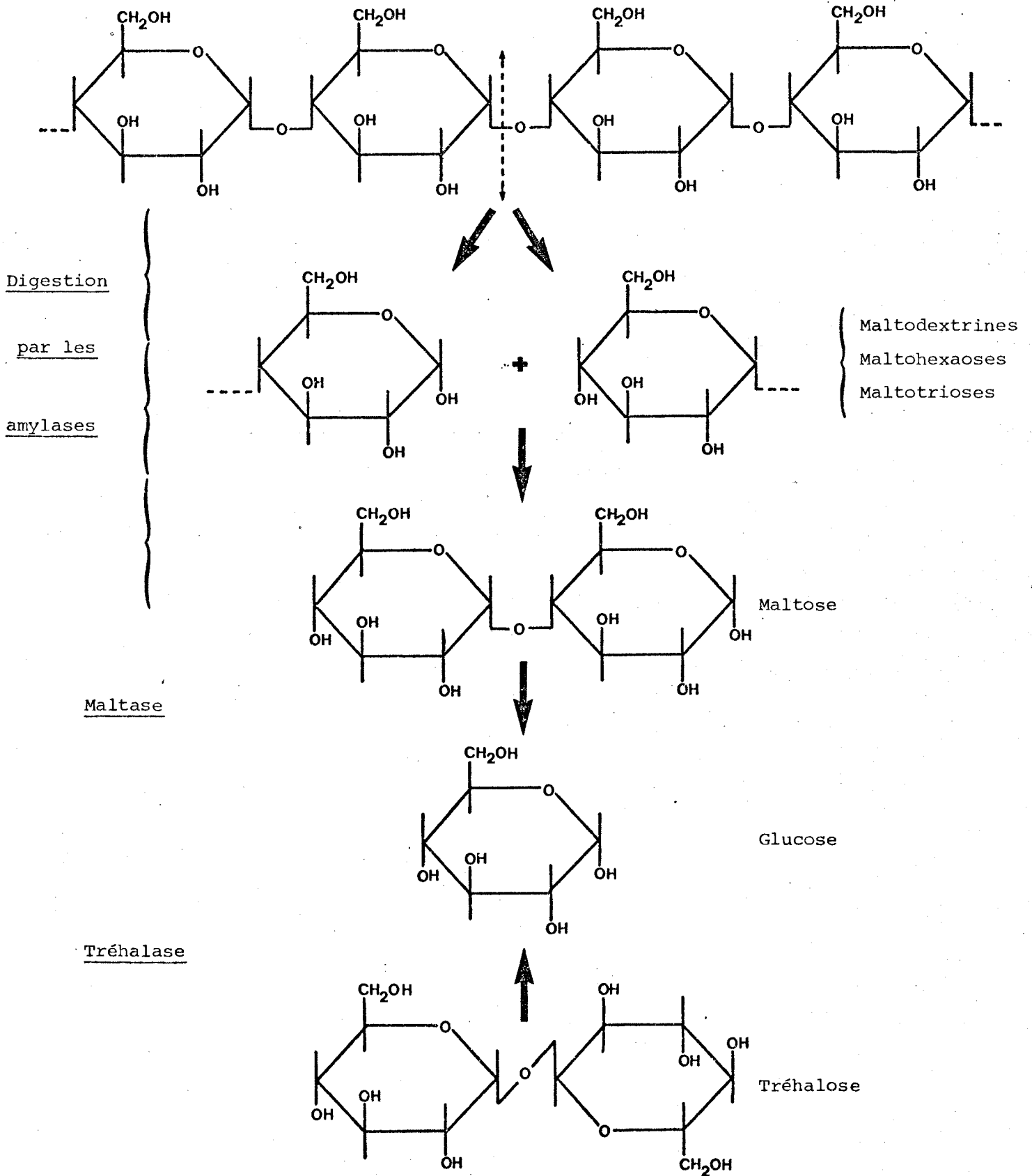


Figure n° 49 : Digestion enzymatique de l'amidon ou du glycogène, du maltose et du tréhalose.

Le maltose est un diholoside réducteur formé de deux molécules de glucose liées en α -1-4. Son hydrolyse est réalisée par une enzyme spécifique : la maltase (α D glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.20).

Le tréhalose est un autre diholoside composé de 2 glucoses. Il n'est pas réducteur, les deux molécules étant unies en α -1-1. Son hydrolyse est réalisée par une α glucosidase très spécifique : la tréhalase (α , α -tréhalose glucohydrolase E.C. 3.2.1.28). Ce sucre est généralement présent en grande quantité dans l'hémolymphe de la plupart des Insectes (CHEFURKA, 1965; WYATT, 1967). On le rencontre aussi dans divers champignons. Le tréhalose est abondant dans le symbiote de *Atta colombica tonsipes* (MARTIN et al, 1969).

Les structures de ces différents polyosides et leur dégradation enzymatique sont rappelées sur la figure 49.

Nous avons montré (Chapitre 3) que les glandes labiales et l'estomac de *Acromyrmex octospinosus* sécrètent une forte activité α glucosidasique. Le substrat artificiel utilisé dans cette méthode ne nous permet pas de conclure sur la spécificité de cette activité. La fourmi consomme, par l'intermédiaire de son champignon, du glycogène et du tréhalose, et ingère de l'amidon lors de la découpe du substrat végétal. Nous avons entrepris l'étude des capacités d'hydrolyse des amylases, maltase et tréhalase chez *Acromyrmex octospinosus*.

5.2. MATERIEL ET METHODES.

5.2.1. Matériel biologique

Les animaux proviennent de nids du laboratoire. Certains ont été isolés pendant quelques jours de leur source de nourriture comme décrit au paragraphe 4.2.1.

La dissection des glandes labiales et des estomacs s'effectue dans une solution de chlorure de sodium (13,2 g/l = 450m Osmoles). Leur broyage dans l'eau distillée est réalisé au moyen d'un potter de verre. Après centrifugation de 10 minutes à 10000g les surnageants sont utilisés pour les dosages enzymatiques.

5.2.2. Etude de l'activité amylasique

5.2.2.1. Principe du dosage.

Les amylases sont étudiées par l'hydrolyse du glycogène (Sigma G 8751). Les groupements hémiacétals réducteurs ainsi libérés sont déterminés avec l'acide 3-5 dinitrosalicylique. La concentration en acide nitroaminosalicylique formé est mesurée par colorimétrie. Elle correspond à la concentration en groupes terminaux et se trouve directement reliée à l'activité enzymatique (NOELTING et BERNFELD, 1948).

5.2.2.2. Réaction enzymatique.

Le milieu réactionnel comprend :

- 100µl d'extrait enzymatique
- 500µl de glycogène (0,5%)
- 400µl de tampon pH = 5,5 : Acide citrique (0,05M), phosphate disodique (0,1M) et NaCl (10mM).

L'incubation est menée pendant 2 heures à 37°C. Les témoins sont réalisés de la même manière, après dénaturation des enzymes (5 min à 100°C).

Dans certains cas, les conditions expérimentales sont différentes et précisées en temps opportun.

5.2.2.3. Dosage des groupements réducteurs.

Le réactif est préparé comme suit :

- 10g d'acide 3-5-dinitrosalicylique
- 300g de tartrate de potassium et sodium
- 400ml de soude 1N
- complété à 1 litre avec de l'eau distillée.

Dès la fin de l'incubation enzymatique, on ajoute 1 ml de ce réactif au mélange réactionnel. Les tubes sont portés à 100°C pendant 5 minutes. Après refroidissement, la lecture de la densité optique à 546nm est réalisée au spectrophotomètre (PERKIN-ELMER 551).

5.2.2.4. Droite étalon.

L'activité des amylases est exprimée par la quantité de groupements réducteurs libérés par unité de temps. Le maltose est utilisé comme standard. Les courbes étalons (correspondance entre densité optique et concentration en maltose) sont établies de la même façon que le dosage enzymatique soit :

- quantité connue de maltose dans 100µl d'eau distillée
- 500µl de glycogène (0,5%)
- 400µl de tampon pH 5,5
- réaction avec 1 ml de réactif à l'acide 3-5 dinitrosalicylique
- lecture de la DO à 546nm.

Six mesures de 16 concentrations en maltose (50 à 1250µg/ml) sont effectuées. La linéarité des courbes est vérifiée pour des quantités de maltose inférieures à 800µg pour 1 ml (Annexe n° 4).

La droite de régression calculée a pour équations :

$$DO (546nm) = 2,150 x - 0,107$$

$$\text{ou } DO (546nm) = 0,735 x' - 0,107$$

x = concentration en maltose en mg/ml

x' = concentration en maltose en µmole/ml.

5.2.3. Etude de la tréhalase

5.2.3.1. Principe du dosage.

La tréhalase hydrolyse spécifiquement le tréhalose et libère 2 molécules de glucose. Celui-ci est dosé par une méthode enzymatique à la glucose oxydase et peroxydase (Gluci Biotrol^(R)). Le principe de ce dosage spécifique est schématisé sur la figure 50.

5.2.3.2. Réaction enzymatique.

Le milieu réactionnel comprend :

- 250µl d'extrait enzymatique
- 250µl de tréhalose (0,8M) (SIGMA T 5251)
- 500µl de tampon pH = 5,5 : Acide citrique (0,2M), phosphate disodique (0,4M).

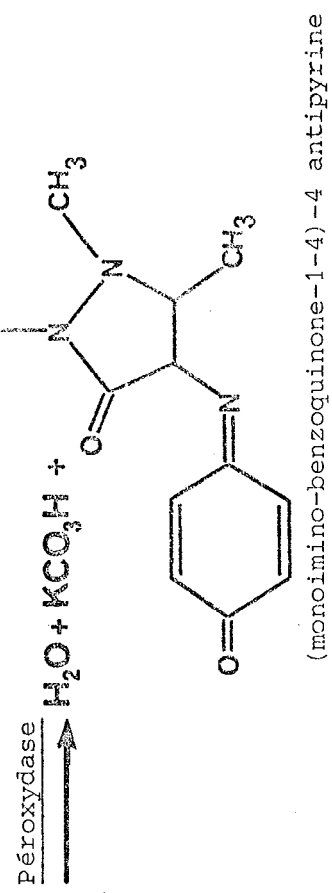
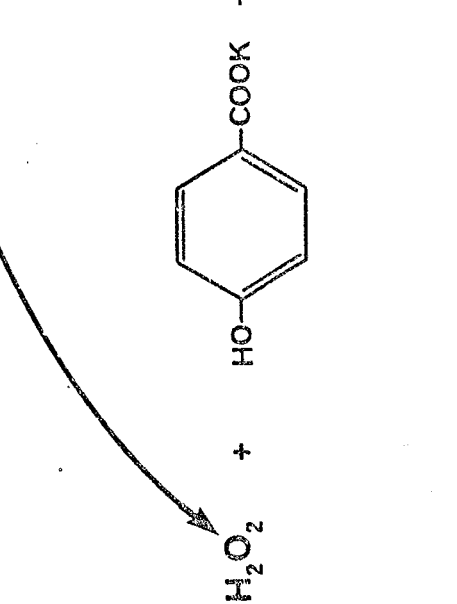
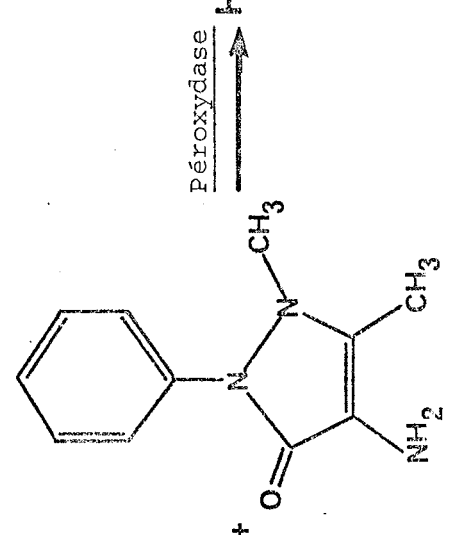
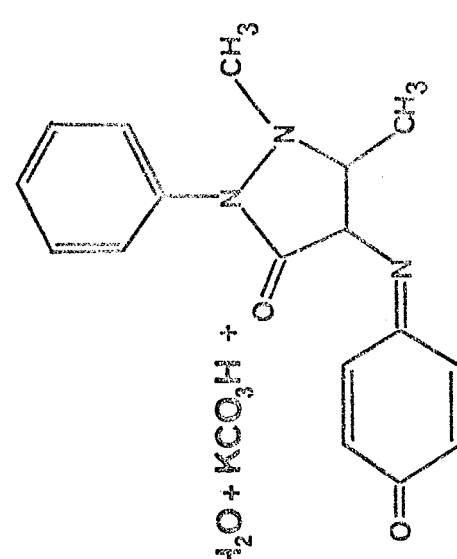
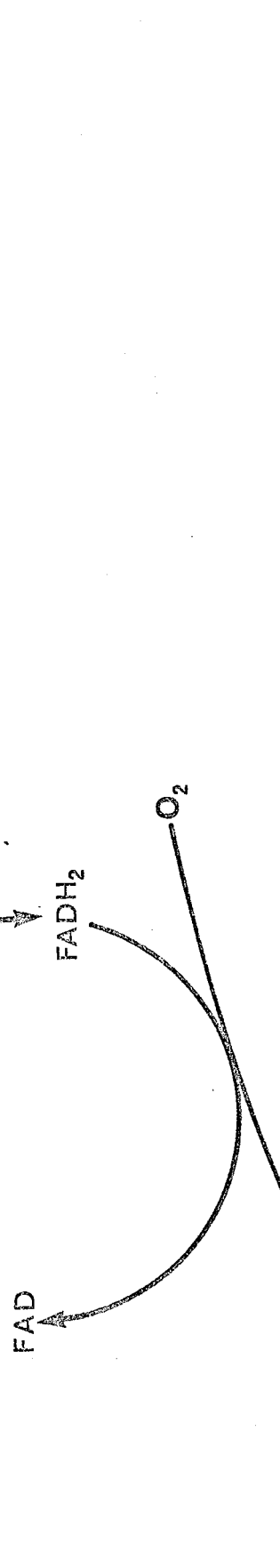
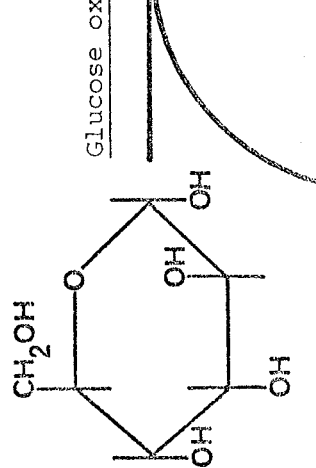
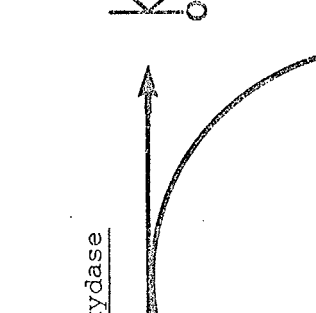
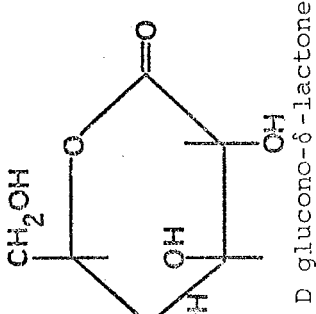
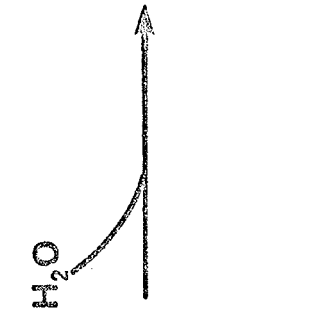
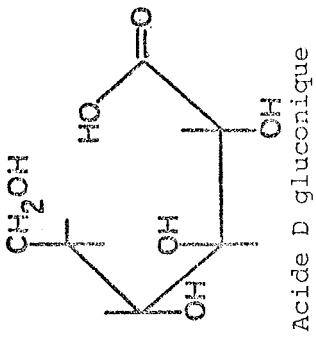


Figure n° 50 : Dosage du glucose par la méthode enzymatique utilisant la glucose-oxydase et la peroxydase (Gluci-Biotrol^R).

Après une incubation de 15 minutes à 37°C, l'hydrolyse enzymatique est arrêtée par un séjour (5 min) des tubes à 100°C.

Les témoins sont réalisés par dénaturation des enzymes de l'extrait (5 min à 100°C).

5.2.3.3. Dosage du glucose.

Le réactif (Gluci - Biotrol^R) a la composition suivante :

- tampon phosphate - 0,15M - pH = 7,5
- glucose oxydase - 18000 U.I/l
- peroxydase - 1000 U.I/l
- amino-4-antipyrine - 400µM
- hydroxy-4-benzoate - 10nM

A 1 ml du mélange réactionnel, on ajoute 1 ml de réactif Biotrol. Après 1 heure d'incubation à la température ambiante, la densité optique à 505 nm est mesurée au spectrophotomètre (PERKIN-ELMER 551).

5.2.3.4. Droite étalon.

L'activité de la tréhalase est exprimée par la quantité de glucose formé par unité de temps. Les courbes étalons qui établissent la correspondance entre la DO mesurée à 505 nm et la concentration en glucose sont effectuées comme pour le dosage enzymatique :

- 250µl de tréhalose (0,8M)
- quantité connue de glucose dans 250µl d'eau distillée
- 500µl de tampon pH = 5,5

Neuf mesures pour 10 concentrations de glucose (de 0 à 100µg/ml) sont réalisées. La linéarité de la courbe étalon est vérifiée pour cette gamme de concentration (Annexe n° 5).

La droite de régression calculée a pour équations :

$$DO (505nm) = 0,0162 x - 0,003$$

$$\text{ou } DO (505nm) = 2,9108 x' - 0,003$$

x = concentration en glucose en µg/ml

x' = concentration en glucose en µmole/ml.

5.2.4. Etude de la maltase

La maltase hydrolyse le maltose pour former deux molécules de glucose. Comme précédemment, celui-ci est dosé par la méthode enzymatique Gluci-Biotrol^R.

Le dosage de la maltase suit le même protocole opératoire que pour la tréhalase. Seul le tréhalose est remplacé par une solution de maltose (1% dans de l'eau distillée).

5.3. RESULTATS ET DISCUSSION.

5.3.1. Etude de l'activité amylasique

5.3.1.1. Réalité d'une activité amylasique dans les glandes labiales.

L'expérimentation illustrée par la figure 51, révèle une activité amylasique dans les glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus*. Les essais sont menés avec 3 concentrations en glandes et une incubation prolongée jusqu'à 4 heures. L'activité enzymatique est proportionnelle au temps d'incubation pour 10 glandes broyées dans 1 ml d'eau distillée. Pour des concentrations supérieures (20 et 30 glandes/ml) la linéarité de la relation entre activité enzymatique et temps d'incubation n'est plus respectée au-delà de 2 heures.

Nous retiendrons des extraits enzymatiques de 20 glandes labiales/ml et un temps d'incubation de 2 heures.

5.3.1.2. pH optimum.

L'influence du pH sur l'activité amylasique est reportée sur la figure 52. Pour les deux tampons utilisés (acide citrique 0,05M - phosphate disodique 0,1M ou tampon phosphate 40mM) les pH optimum sont de 5,5. La courbe a un maximum très aplati : entre pH = 5,0 et 6,0, l'activité enzymatique reste pratiquement constante.

THOMA et al (1971) dressent une rapide revue de l'effet de la concentration en ions hydrogène sur les amylases. Les α -amylases des plantes supérieures et des animaux sont généralement stables de pH = 5,5 à 8,0. Celles des céréales montrent une activité optimale entre pH 5 et 6, alors que chez les animaux, le maximum d'activité est obtenu au voisinage de la neutralité. Le pH optimum des glucoamylases animales est compris entre 4,8 et 5,0.

La forme aplatie du maximum de la courbe obtenue ici pourrait s'expliquer par la participation de plusieurs enzymes à l'activité amylasique : une glucoamylase et une α -amylase aux pH optimum légèrement décalés.

5.3.1.3. Effet de la concentration en ions chlore.

L'addition d'ions Cl^- à une concentration finale de 10mM est généralement proposée pour activer les amylases (RICK et STEGBAUER, 1974). L'influence de ces ions est décrite sur la figure 53. L'activité est légèrement augmentée (10%) pour une concentration finale en Cl^- de 4mM. Elle reste ensuite constante pour des concentrations supérieures.

Groupements réducteurs libérés

(μ mole de maltose)

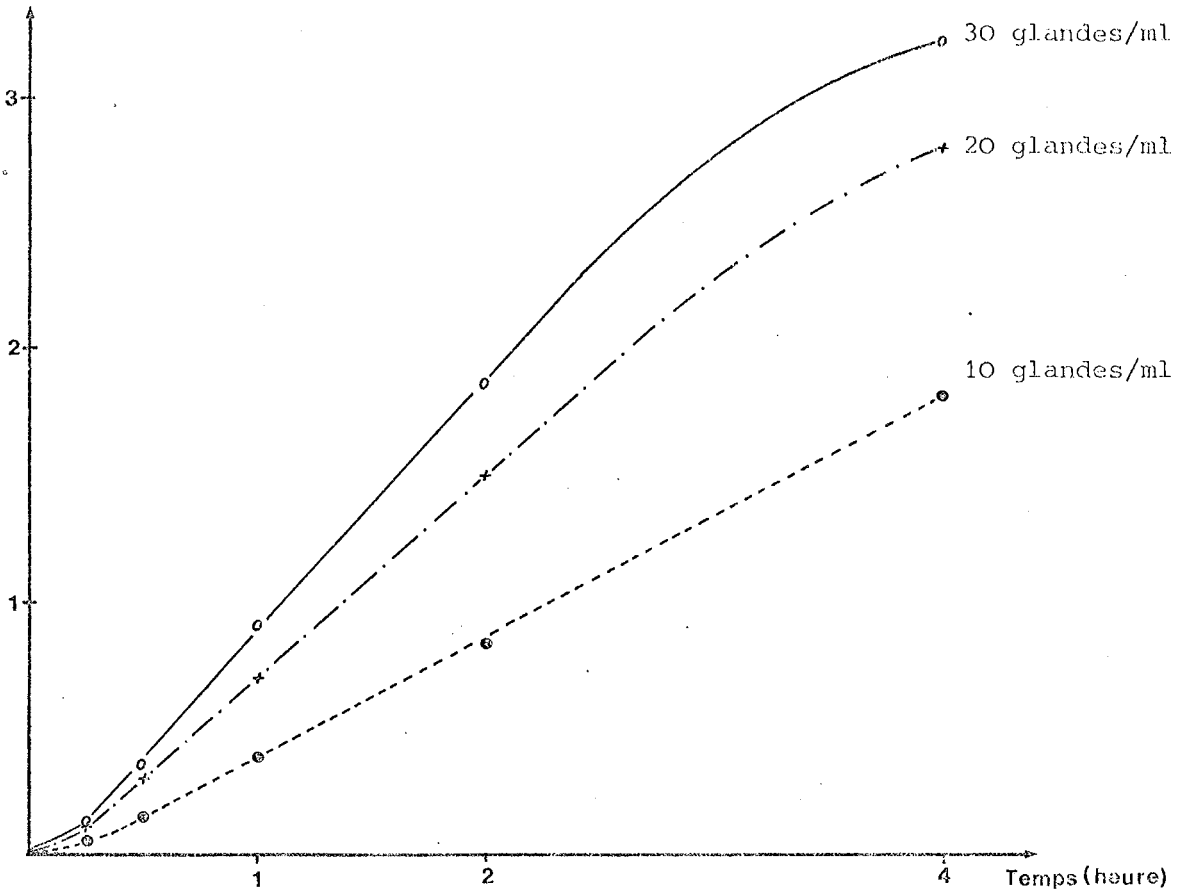
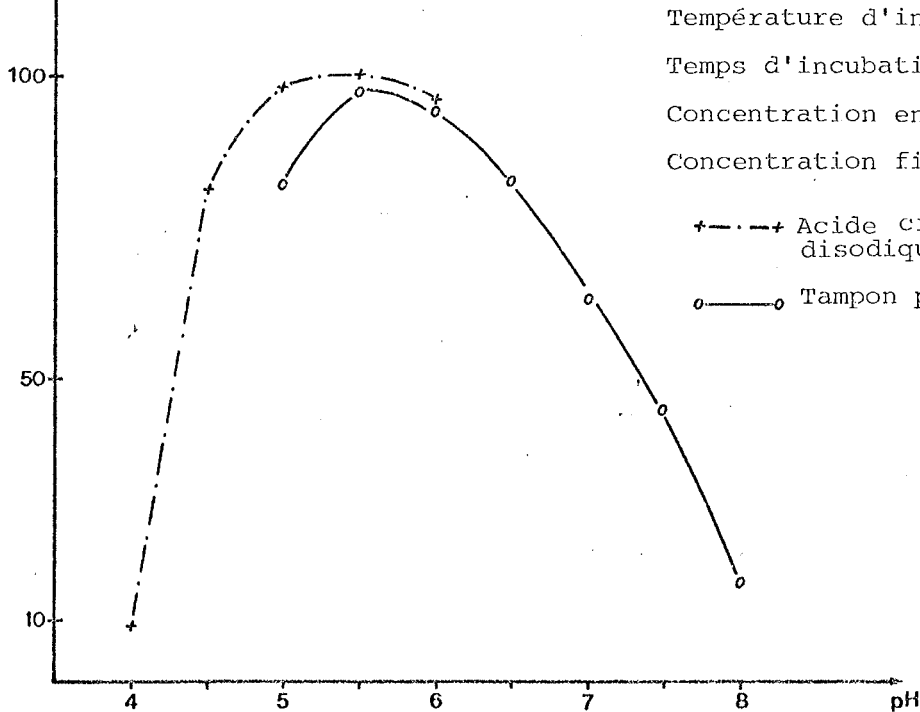


Figure n° 51 : Activité amylasique en fonction du temps d'incubation pour des broyats d'un nombre différent de glandes labiales

Activité relative (%)



Température d'incubation : 37°C

Temps d'incubation : 2 heures

Concentration en NaCl : 4 mM

Concentration finale en glycogène 2,5g/l

+ - - - + Acide citrique (0,05M), phosphate disodique (0,1M)

o ——— o Tampon phosphate (40 mM)

Figure n° 52 : Influence du pH et du tampon sur l'activité amylasique des glandes labiales.

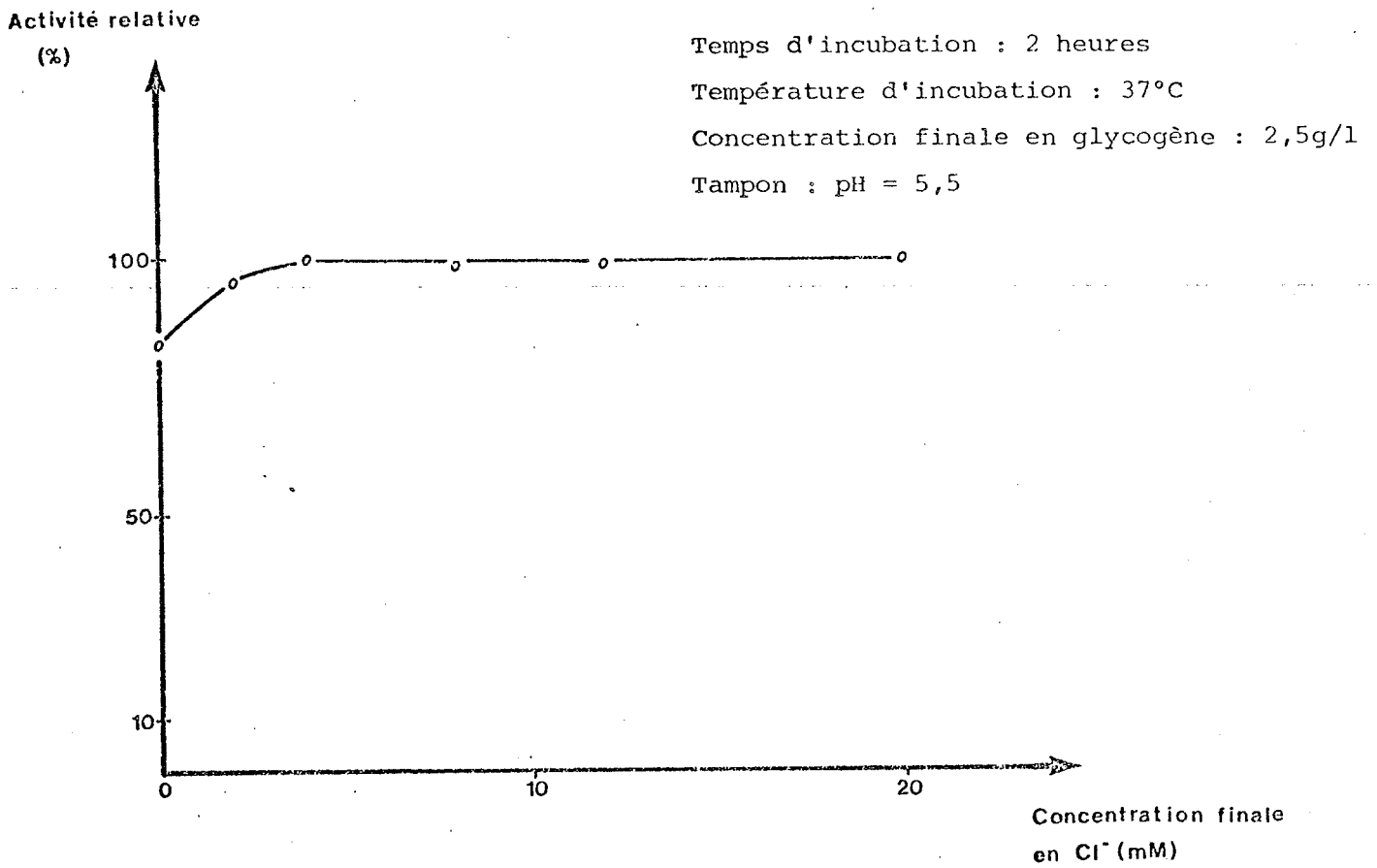


Figure n° 53 : Influence de la concentration en ions chlore sur l'activité amylasique des glandes labiales.

5.3.1.4. Influence de la concentration en substrat, Km de l'enzyme.

A titre d'exemple la figure 54 montre l'activité amylasique des glandes salivaires en fonction de la concentration en glycogène.

La courbe obtenue révèle une cinétique enzymatique classique de type michaelien. L'activité enzymatique ne présente pas d'inhibition par excès de substrat.

Le Km est déterminé avec 6 broyats différents et 8 concentrations en substrat. Il est calculé par la représentation linéaire $\frac{s}{v}$ en fonction de s (HANES, 1932) qui donne le résultat le plus précis (fig. 55).

Il en résulte un Km de $0,71 \pm 0,28$ g/l.

5.3.1.5. Distribution de l'activité amylasique entre glandes salivaires et estomac.

L'activité amylasique est quantifiée sur des broyats de glandes salivaires, d'estomacs pleins et d'estomacs vidés de leur contenu. Les dosages sont effectués sur des ouvrières major (poids individuel compris entre 10 et 15mg).

Les extraits de glandes labiales libèrent en 2 heures un nombre de groupements réducteurs correspondant à $0,8 - 1,0$ μ mole de maltose par individu. Parallèlement l'activité mesurée sur les estomacs pleins représente 20% de celle des glandes salivaires, alors que les estomacs vidés de leur contenu n'ont aucune activité amylasique.

La fonction de digestion des polymères α -1-4 de glucose est donc le seul fait des glandes labiales. L'estomac ne sécrète pas d'activité amylasique. Une partie de celle des glandes transite avec l'ingesta dans l'estomac.

5.3.1.6. Influence du jeûne sur l'activité amylasique des glandes labiales.

L'influence du jeûne est recherchée sur des ouvrières major qui ont uniquement accès à une source de glucose (2%). 3, 6 et 9 jours de jeûne sont expérimentés. Après 6 jours de jeûne sur glucose, un lot d'ouvrières est alimenté pendant 3 jours avec une solution de glycogène à 0,5%. Les témoins sont des ouvrières prélevées sur nid.

Au cours du jeûne l'activité amylasique des glandes labiales diminue régulièrement (fig. 56). Elle est pratiquement nulle après 9 jours. Lorsque les fourmis disposent à nouveau de glycogène pendant 3 jours, après un jeûne de 6 jours, l'activité enzymatique augmente, sans toutefois atteindre le niveau initial des témoins.

Temps d'incubation : 2 heures
Température d'incubation : 37°C
Concentration en NaCl 4 mM
Tampon : pH = 5,5

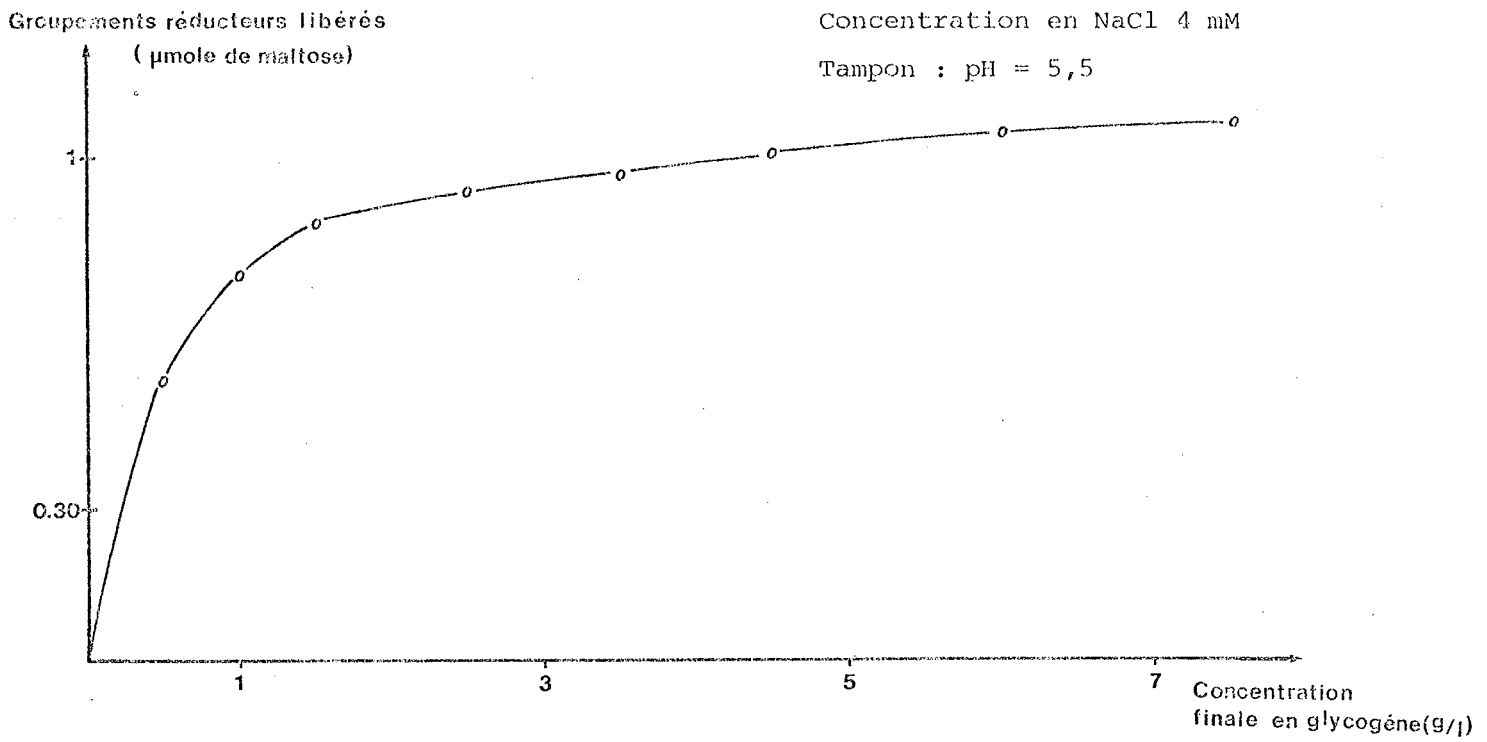


Figure n° 54 : Influence de la concentration en substrat sur l'activité amylasique des glandes labiales.

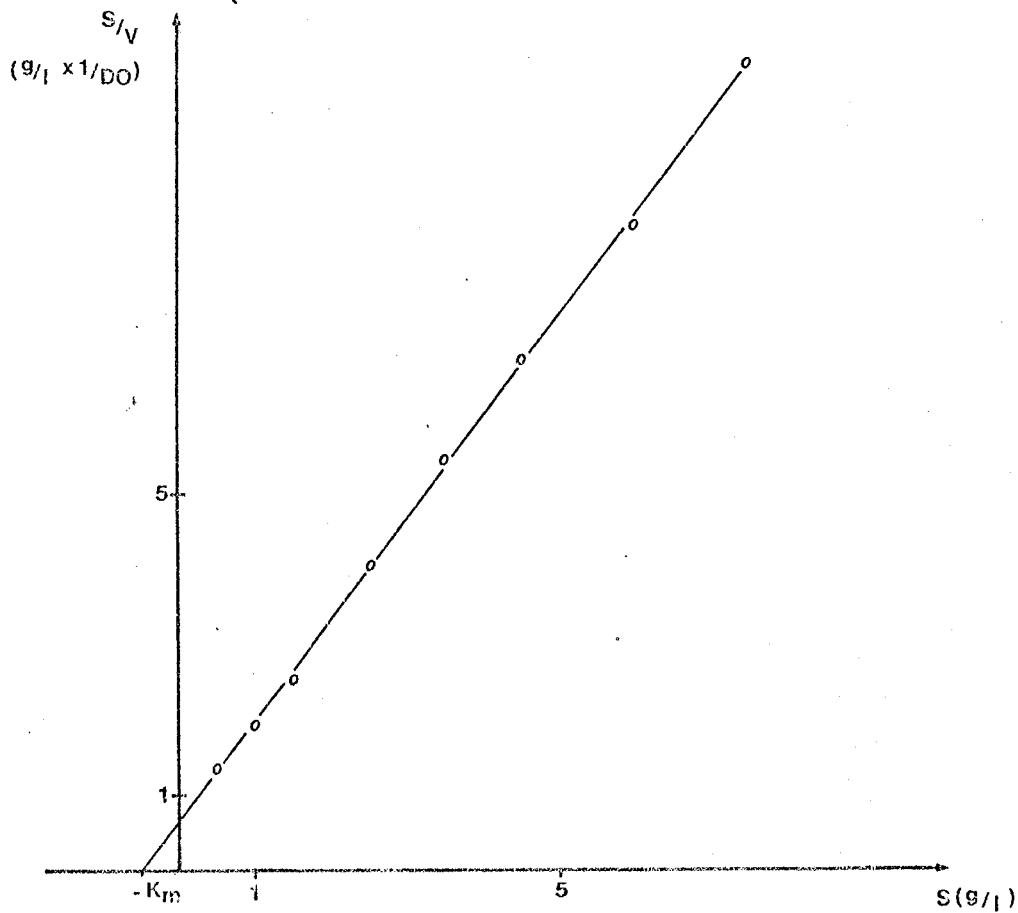


Figure n° 55 : Représentation de HANES.

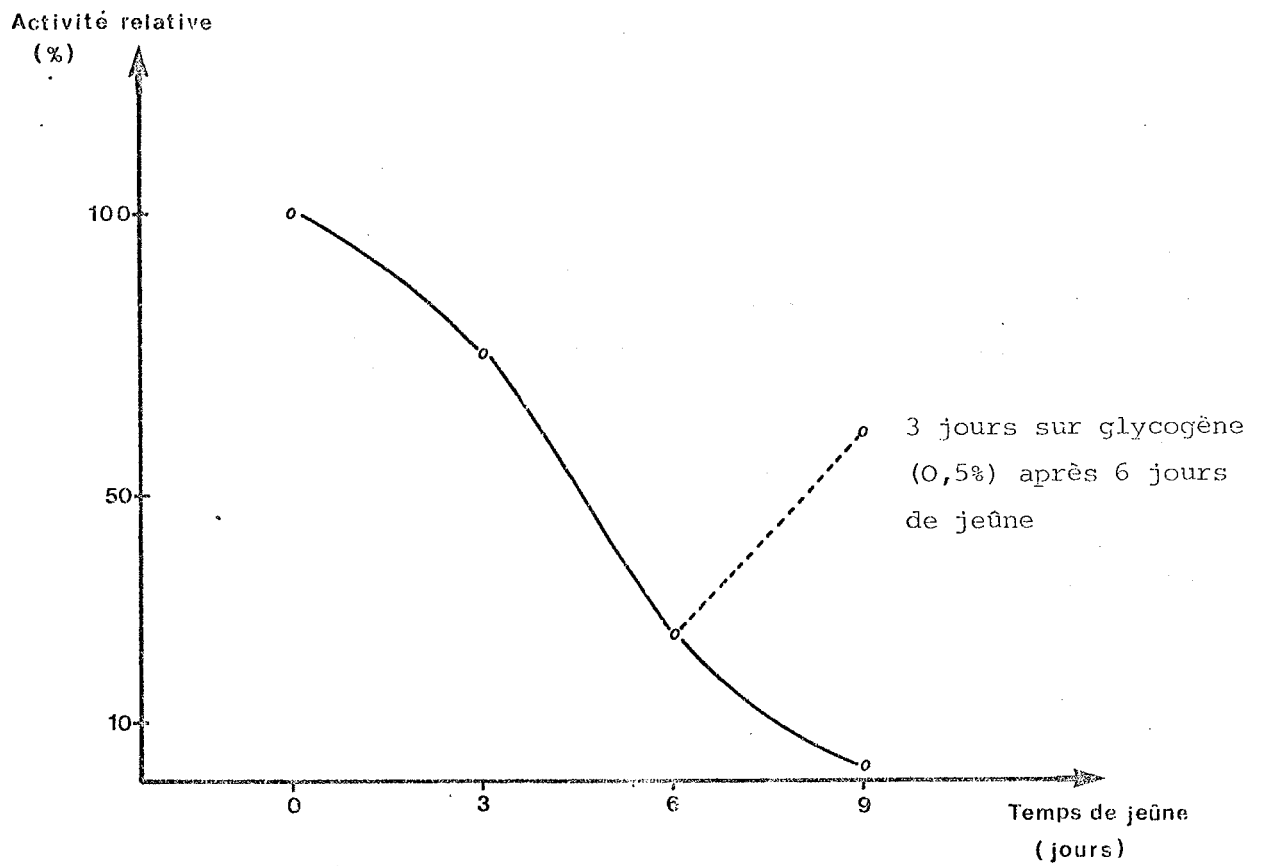


Figure n° 56 : Influence du jeûne sur l'activité amylasique des glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus*.

5.3.1.7. Conclusion.

L'amylase est largement étudiée dans le monde animal Vertébré et Invertébré. Son activité est également recherchée pour de nombreuses espèces de fourmis. Sa présence n'est pas systématique et paraît étroitement liée à la nourriture habituellement consommée par les différentes espèces. RIKS et VINSON (1972) décrivent une forte activité amylasique chez *Solenopsis richteri* qui consomme parfois des graines et d'autres parties végétales (amidon) mais se nourrit principalement d'insectes connus pour contenir du glycogène. Cette activité est révélée seulement dans les glandes salivaires ; l'estomac ne la sécrète pas. Une analyse de l'amylase est réalisée par AYRE (1967) chez 5 espèces de fourmis aux habitudes alimentaires différentes. Seules les glandes salivaires de deux espèces (*Camponotus pennsylvanicus* et *C. herculeanus*) présentent une très forte activité amylasique. AYRE l'explique par la consommation pour ces 2 espèces de mycélium de champignons poussant sur du bois pourri. Les autres espèces étudiées (*Formica fusca*, *F. integra* et *Acanthomyops claviger*) ne sécrètent aucune amylase. La fourmi granivore *Messor capitatus*, dont l'amidon est la base de l'alimentation, possède une très forte activité amylasique (DELAGE, 1968). Cette dernière est présente principalement dans les glandes labiales, mais l'estomac sécrète aussi cette activité chez ces fourmis. MARTIN et al. (1973) montrent chez 6 espèces d'Attines la présence d'une activité amylasique dans le liquide rectal. Après la remise en question de la sécrétion des protéases chez *Atta texana* (BOYD et MARTIN, 1975b), ces auteurs émettent l'hypothèse d'une absence d'enzyme digestive propre à la fourmi. Les activités décelées dans le liquide rectal seraient d'origine fongique. Nous démontrons ici que l'activité amylasique chez *Acromyrmex octospinosus* est propre aux glandes labiales. Cette fourmi a la possibilité de dégrader les polymères α -1-4 de glucose de deux origines : l'amidon des plantes ingéré lors de la préparation du matériel végétal et le glycogène contenu dans le champignon symbiote. Les enzymes correspondantes sont sécrétées par les glandes labiales, et la digestion de ces polymères débute dès leur passage dans la cavité préorale.

5.3.2. Etude de l'activité tréhalasique

5.3.2.1. Digestion du tréhalose dans l'estomac

L'incubation d'extraits d'estomacs lavés, en présence de tréhalose, produit du glucose. La sécrétion d'une tréhalase par l'estomac est ainsi vérifiée.

L'activité enzymatique est proportionnelle au temps d'incubation pour l'extrait d'un estomac dans 1 ml d'eau distillée et ce jusqu'à 30 minutes (fig. 57). Cette linéarité n'est plus respectée pour des temps d'incubation supérieurs. Avec un broyat de 3 estomacs/ml, la proportionnalité activité enzymatique-temps d'incubation est effective pour des durées inférieures à 10 min.

Température d'incubation : 37°C

Concentration finale en tréhalose : 0,2M

Tampon : pH = 5,5

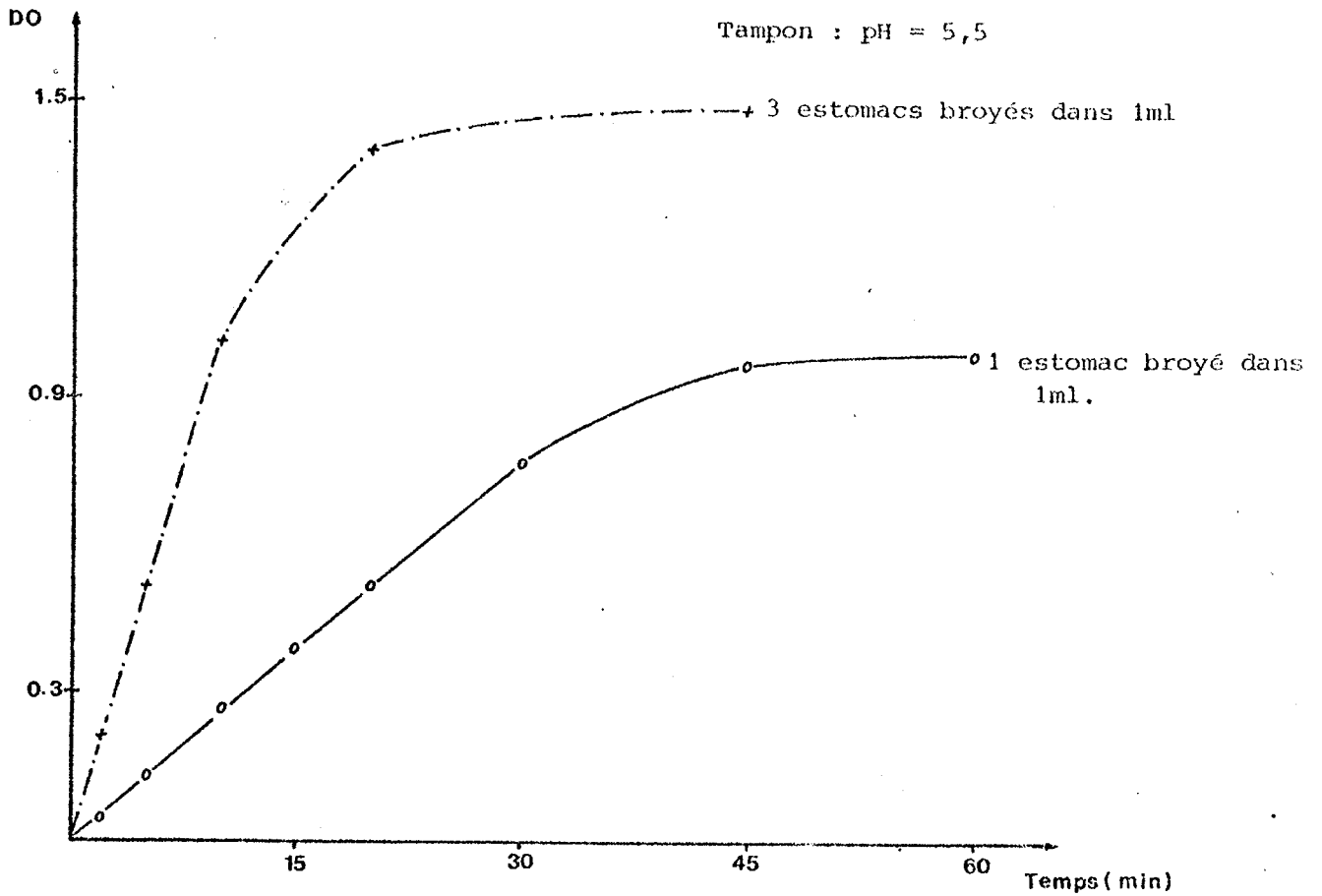


Figure n° 57 : Activité tréhalasique des estomacs en fonction du temps d'incubation.

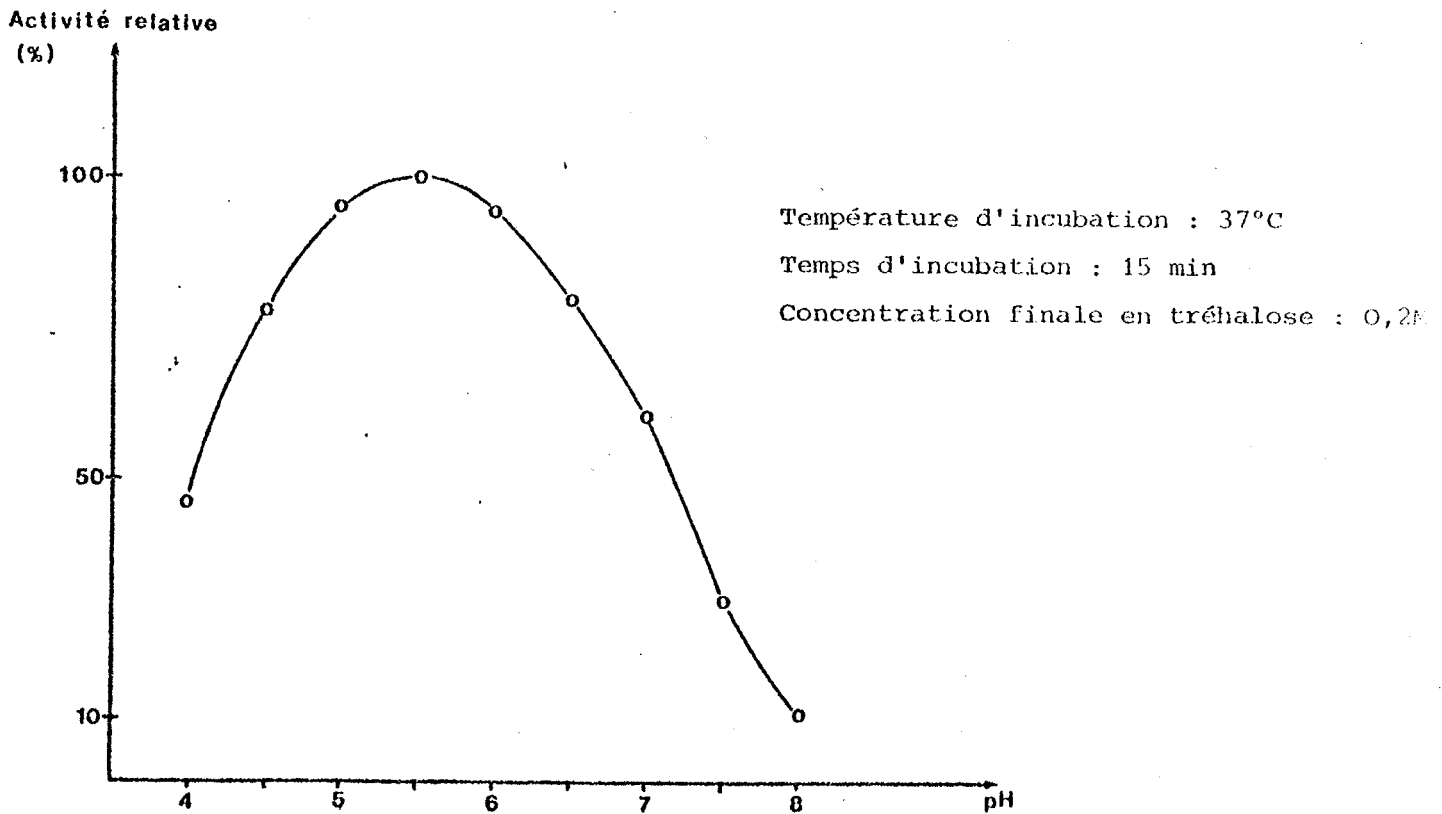


Figure n° 58 : Influence du pH sur l'activité tréhalasique des estomacs.

Des extraits d'un estomac/ml et un temps d'incubation de 15 min seront retenus pour la suite de l'étude.

5.3.2.2. pH optimum.

L'influence de la concentration en ions hydrogène sur l'activité de la tréhalase est décrite sur la figure 58. L'activité enzymatique présente un optimum à pH : 5,5. La courbe obtenue est symétrique et a un maximum aplati : entre pH 5 et 6, l'activité reste supérieure à 95% du maximum.

La tréhalase de certains Insectes a un pH optimum acide (3,5). Les oeufs de *Spodoptera littoralis* (ISHAAYA et YABLONSKI, 1978) et l'hémolymphe de *Periplaneta americana* (MATTHEWS et al, 1976) sont dans ce cas. Toutefois, le pH optimum de la tréhalase de l'estomac d'*Acromyrmex octospinosus* est semblable à ceux généralement décrits chez d'autres Insectes = *Drosophila melanogaster* et *D. simulans* (entre 5,5 et 6) (BARGIELLO et GROSSFIELD, 1979), *Bombyx mori* (5,5) (SHIMADA et al, 1980), *Calliphora erythrocephala* (entre 5,5 et 6) (HANSEN BAY, 1978), *Locusta migratoria* (5,6) (DROSTE et ZEBE, 1974), *Manduca sexta* (6,0) (DAHLMAN, 1971), et *Formica polyctena* (6,1) (PAULSEN, 1971).

5.3.2.3. Influence de la concentration en tréhalose, Km de l'enzyme.

L'activité de la tréhalase en fonction de la concentration en substrat décrit une courbe classique de cinétique enzymatique de type michaelien (fig. 59). On ne constate pas d'inhibition par excès de substrat. Le début du plateau de l'activité enzymatique est obtenu pour une concentration finale en tréhalose de 0,2M. Celle-ci sera retenue pour les dosages de la tréhalase.

Le Km de l'enzyme est déterminé avec 5 broyats différents et 7 concentrations en substrat. Il est calculé par la représentation de HANES ($\frac{S}{V}$ en fonction de s, fig. 60). Il en résulte un Km de $14,0 \pm 1,4$ mM.

Différentes valeurs du Km de la tréhalase chez les insectes sont portées au tableau n° XIII. La constante de Michaelis obtenue dans cette étude est plus élevée que celle généralement décrite.

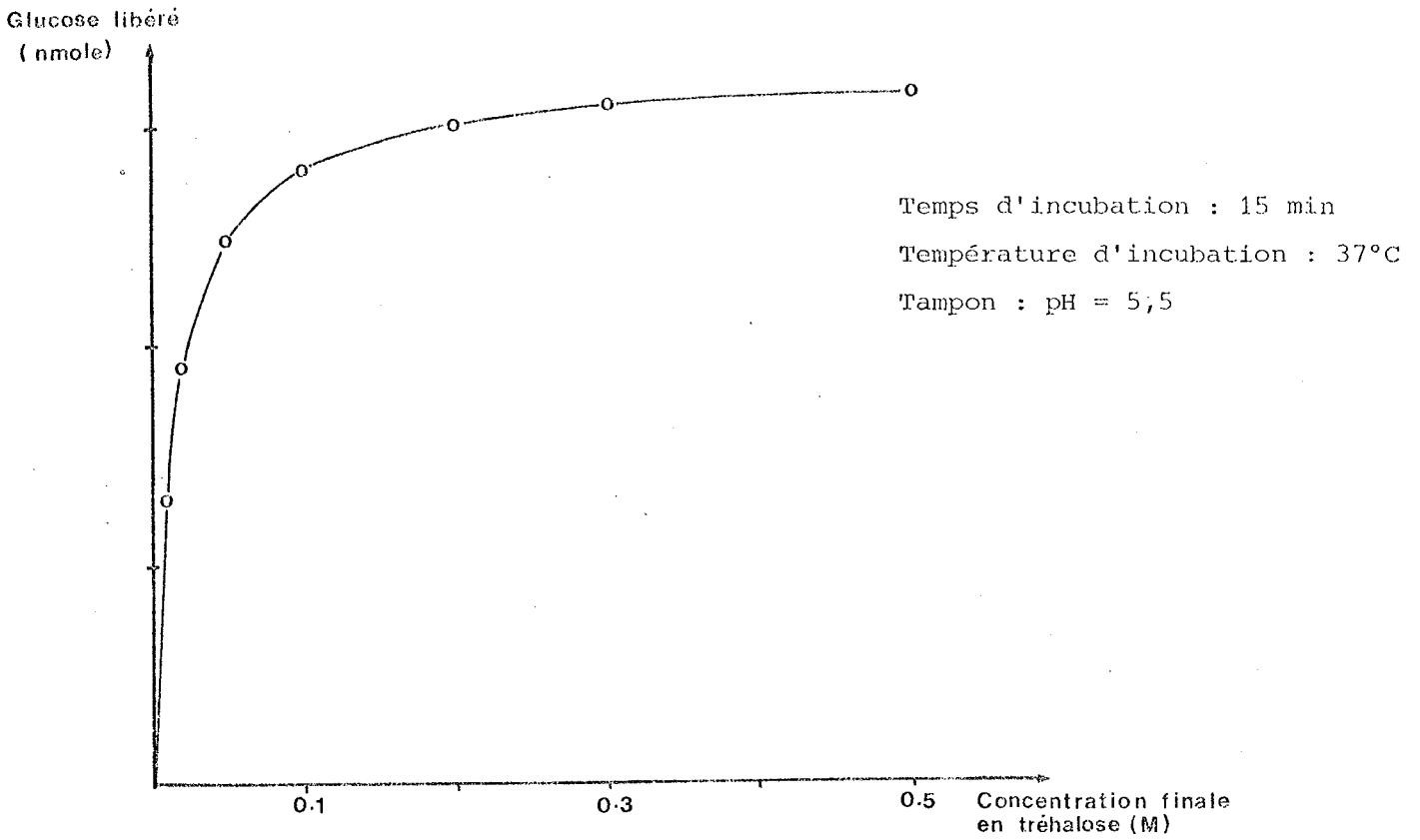


Figure n° 59 : Influence de la concentration en substrat sur l'activité tréhalasique des estomacs.

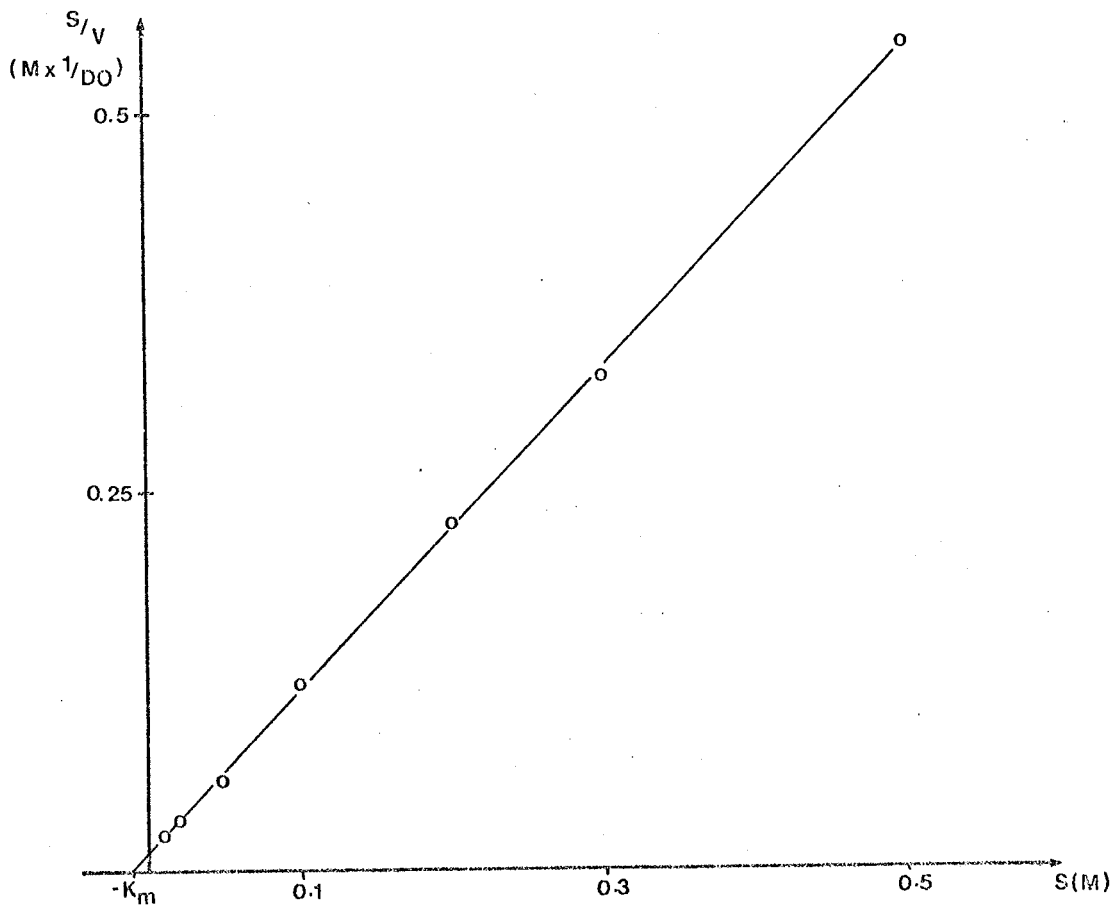


Figure n° 60 : Représentation de HANES.

SOURCE DE L'ENZYME	Km	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
Larves de <i>Manduca sexta</i>	0,645 mM	DAHLMAN (1971)
Estomac de <i>Locusta migratoria</i>	1,8 mM et 3,4 mM	DROSTE et ZEBE (1974)
Larves de <i>Bombyx mori</i>	1,41 mM	SHIMADA et al (1980)
<i>Drosophila melanogaster</i>	0,75 mM	BARGIELO et
<i>Drosophila simulans</i>	0,70 mM	GROSSFIELD (1979)
Oeufs de <i>Spodoptera littoralis</i>	30 mM	ISHAAYA et YABLONSKI (1978)

TABLEAU n° XIII : Valeur du Km de la tréhalase de différents insectes.

5.3.2.4. Effet de la température.

L'activité enzymatique augmente avec la température d'incubation (fig. 61). Elle atteint un maximum à 60°C. La tréhalase est ensuite partiellement inactivée. A 70°C son activité est diminuée d'environ 60%.

La courbe de température de cette enzyme ressemble à celles trouvées pour d'autres tréhalases chez divers Insectes (HUBER et LEFEBVRE, 1971 ; DUVE, 1972 ; TALBOT et HUBER, 1975 ; ISHAAYA et YABLONSKI, 1978).

5.3.2.5. Activité de la tréhalase stomacale des ouvrières d'*Acromyrmex octospinosus*.

L'activité de la tréhalase est mesurée sur 8 broyats d'estomacs vidés pour chaque groupe d'ouvrières major, media et minor. Les résultats exprimés par individu et par mg de poids frais sont reportés au tableau XIV.

OUVRIERES	MINOR	MEDIA	MAJOR
Poids individuel (mg)	1 à 2	4 à 5	≈ 10
Activité de la tréhalase en nmoles de glucose/min/individu	12,8 ± 4,2 variance = 25,4	35,4 ± 8,6 variance = 104,8	55,3 ± 7,3 variance = 76,9
Activité de la tréhalase en nmoles de glucose/min/g PF d'animal	6,8 ± 1,1 variance = 1,86	6,6 ± 1,6 variance = 3,83	5,8 ± 0,8 variance = 0,93

TABLEAU n° XIV : Activité de la tréhalase stomacale des ouvrières d'*Acromyrmex octospinosus*.

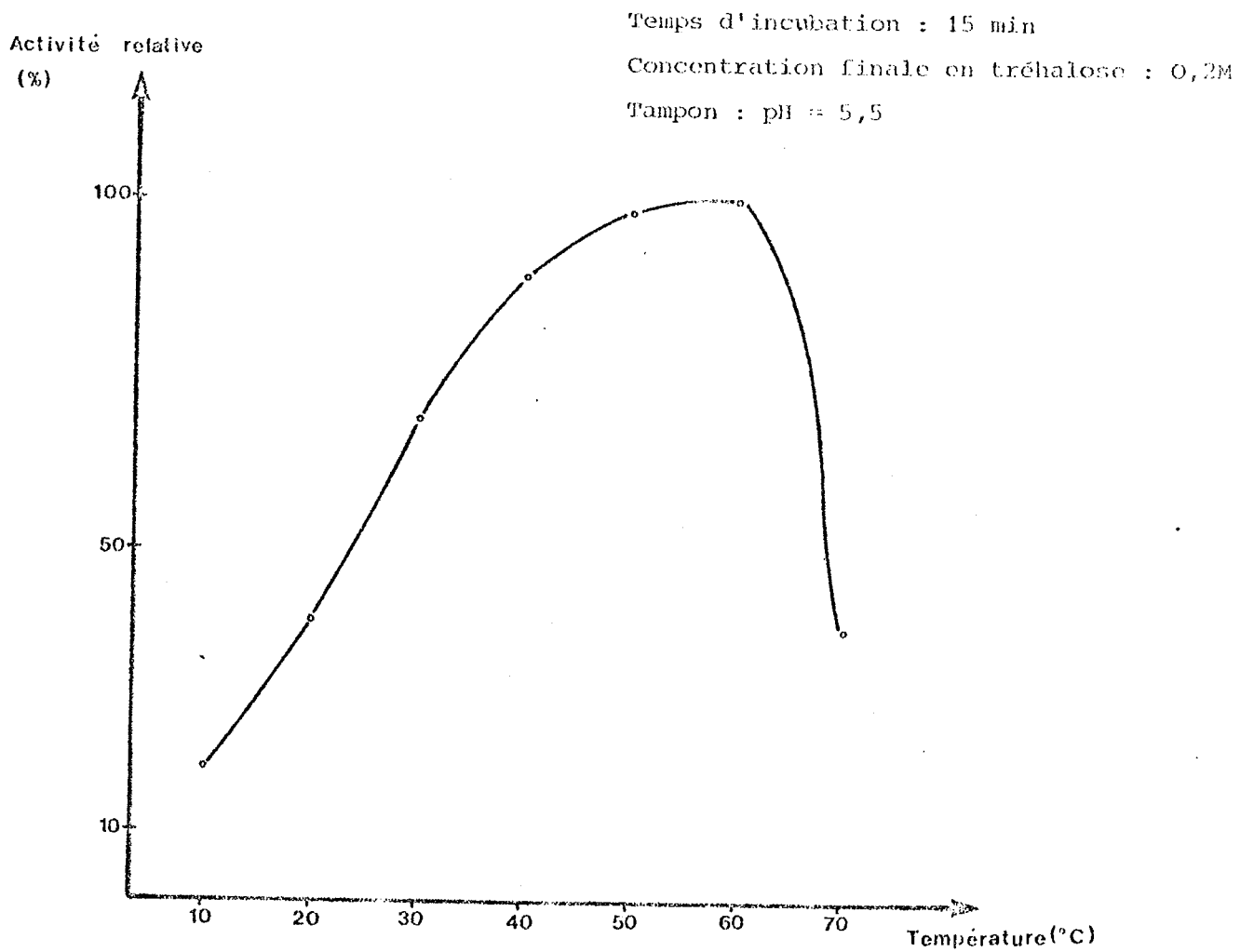


Figure n° 61 : Influence de la température d'incubation sur l'activité tréhalasique des estomacs.

L'activité de la tréhalase est proportionnelle à la taille de l'individu. Exprimée par mg de poids frais d'animal, elle n'est pas significativement différente pour les trois groupes d'ouvrières. Il en résulte une activité de $6,4 \pm 0,6$ nmoles de glucose libéré par minute et par mg de poids frais chez les ouvrières d'*Acromyrmex octospinosus*.

5.3.2.6. Rapport d'activités de la tréhalase entre les glandes labiales et l'estomac.

L'activité tréhalasique est recherchée sur un broyat de 10 paires de glandes labiales. Parallèlement elle est mesurée sur les 10 estomacs des mêmes individus.

Il existe une très faible activité tréhalasique dans les glandes salivaires. Ne représentant que 0,33% de l'activité stomacale, elle est négligeable.

5.3.2.7. Influence du jeûne.

Comme pour l'étude des amylases, l'influence du jeûne est recherchée sur des lots de fourmis isolées de leur nid pendant 3, 6 et 9 jours, et alimentées avec une solution de glucose à 2%. Après un jeûne de 6 jours, un lot de fourmis dispose d'une solution de tréhalose à 2% pendant 3 jours.

L'activité de la tréhalase, mesurée sur 8 broyats différents pour chaque lot, est représentée au tableau n° XV. Elle décroît régulièrement avec le temps de jeûne et ne représente plus que 14% de l'activité des témoins après 9 jours. On n'obtient pas d'augmentation de l'activité enzymatique pour le lot d'ouvrières recevant du tréhalose après 6 jours de jeûne. Elle est cependant maintenue à son niveau d'activité.

Ouvrières	Témoin nids	Jeûne sur glucose de 3 jours	Jeûne sur glucose de 6 jours	Jeûne sur glucose de 9 jours	Jeûne sur glucose de 6 jours suivi de 3 jours sur tréhalose
Activité de la tréhalase en nm glucose/min/mg PF d'animal	$5,8 \pm 0,81$ variance = 0,93	$4,3 \pm 0,95$ var. = 1,28	$2,3 \pm 0,66$ var. = 0,62	$0,82 \pm 0,18$ var. = 0,04	$2,1 \pm 0,39$ var. = 0,22

TABLEAU n° XV : Influence du jeûne sur l'activité de la tréhalase stomacale des ouvrières d'*Acromyrmex octospinosus*.

Analyse globale de la variance à 1 critère de classification : F calculé = 50,7 ; ddl = 4 et 35 ; F théorique (5%) = 2,69.

Comparaison deux à deux : test de NEWMAN et KEULS : plus petite amplitude significative (5%) pour 2 moyennes : 0,36. Les moyennes indicées avec des lettres différentes sont significativement différentes.

5.3.2.8. Conclusion.

La tréhalase a un rôle important dans le métabolisme des sucres chez les Insectes. En dégradant le tréhalose, sucre majoritaire dans l'hémolymphe, elle produit du glucose, source d'énergie. Cette enzyme est donc distribuée dans divers tissus des Insectes, tels l'hémolymphe et les muscles. Des activités particulièrement importantes de la tréhalase sont aussi mises en évidence dans le système digestif et l'épithélium intestinal (GILBY et al, 1967 ; PANT et MORRIS, 1974 ; YAMASHITA et al, 1974 ; TALBOT et HUBER, 1975).

Chez les fourmis cette enzyme est peu recherchée dans le système digestif. L'absence de tréhalose dans la nourriture consommée par ces insectes n'a peut être pas motivé ces études. Elle est décrite dans l'estomac et l'intestin de *Myrmica rubra* (ABBOTT, 1978) ainsi que dans les glandes labiales et l'estomac de *Formica polyctena* (GRAF, 1964 ; PAULSEN, 1969). Le tréhalose est un dissaccharide qui ne peut passer au travers des membranes épithéliales. Les fourmis champignonnistes qui ingèrent le tréhalose de leur symbiote, doivent le dégrader pour l'absorber et l'utiliser au niveau des tissus consommateurs d'énergie. Cette étude montre que chez *Acromyrmex octospinosus* cette digestion est possible grâce à la sécrétion d'une tréhalase par l'estomac.

5.3.3. Etude de l'activité maltasique

5.3.3.1. Digestion du maltose dans l'estomac.

Les résultats de la figure 62 révèlent une activité maltasique dans les estomacs vidés et lavés d'*Acromyrmex octospinosus*. L'activité enzymatique est proportionnelle au temps d'incubation pour l'extrait d'un estomac par ml d'eau distillée et ce jusqu'à 30 minutes (temps maximum essayé). Avec un broyat de deux estomacs/ml, la proportionnalité activité enzymatique-temps d'incubation est assurée pour des durées inférieures à 15 min.

Des extraits d'un estomac/ml et un temps d'incubation de 15 minutes seront retenus pour la suite de l'étude.

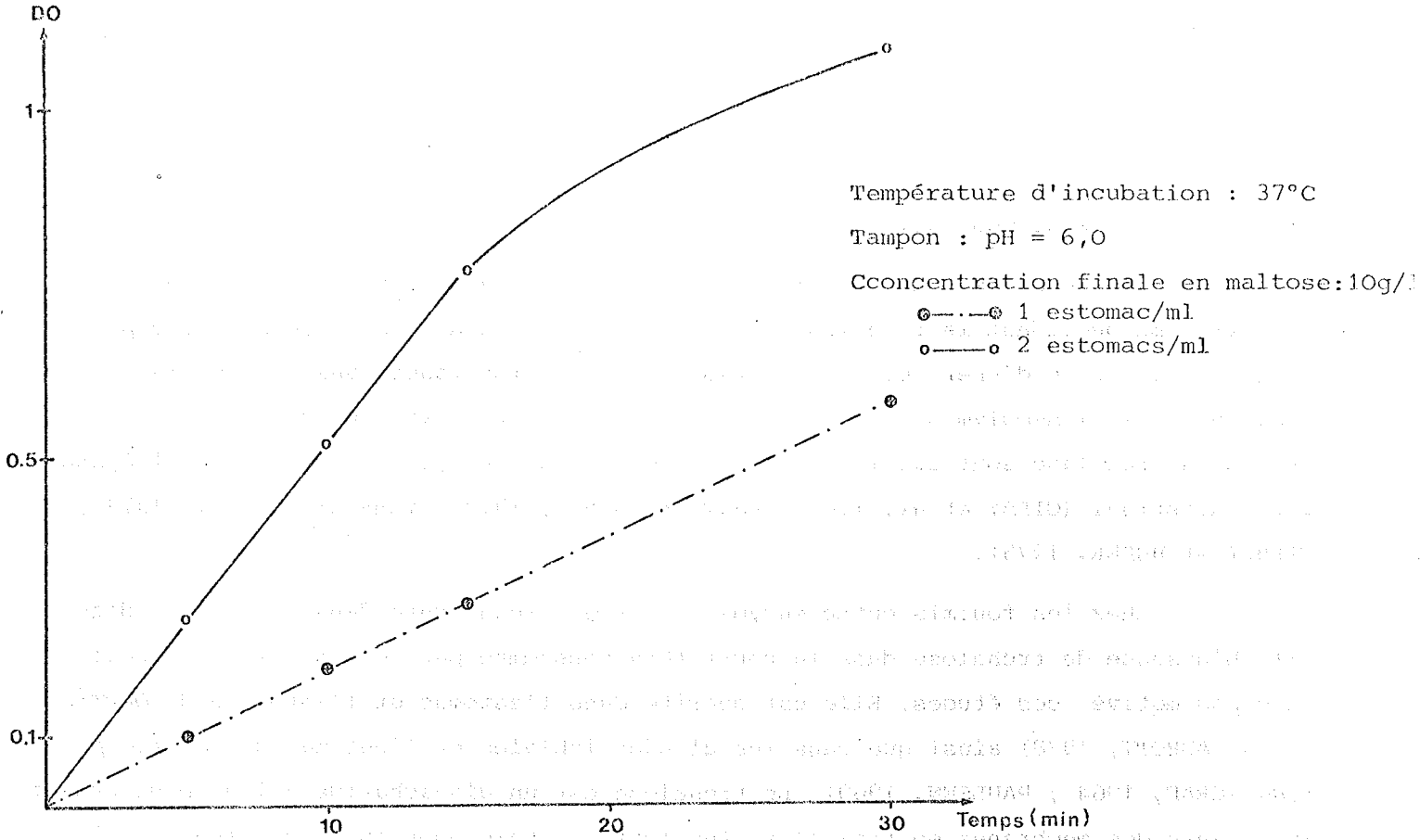


Figure n° 62 : Activité maltasique en fonction du temps d'incubation pour des broyats d'un nombre différent d'estomacs

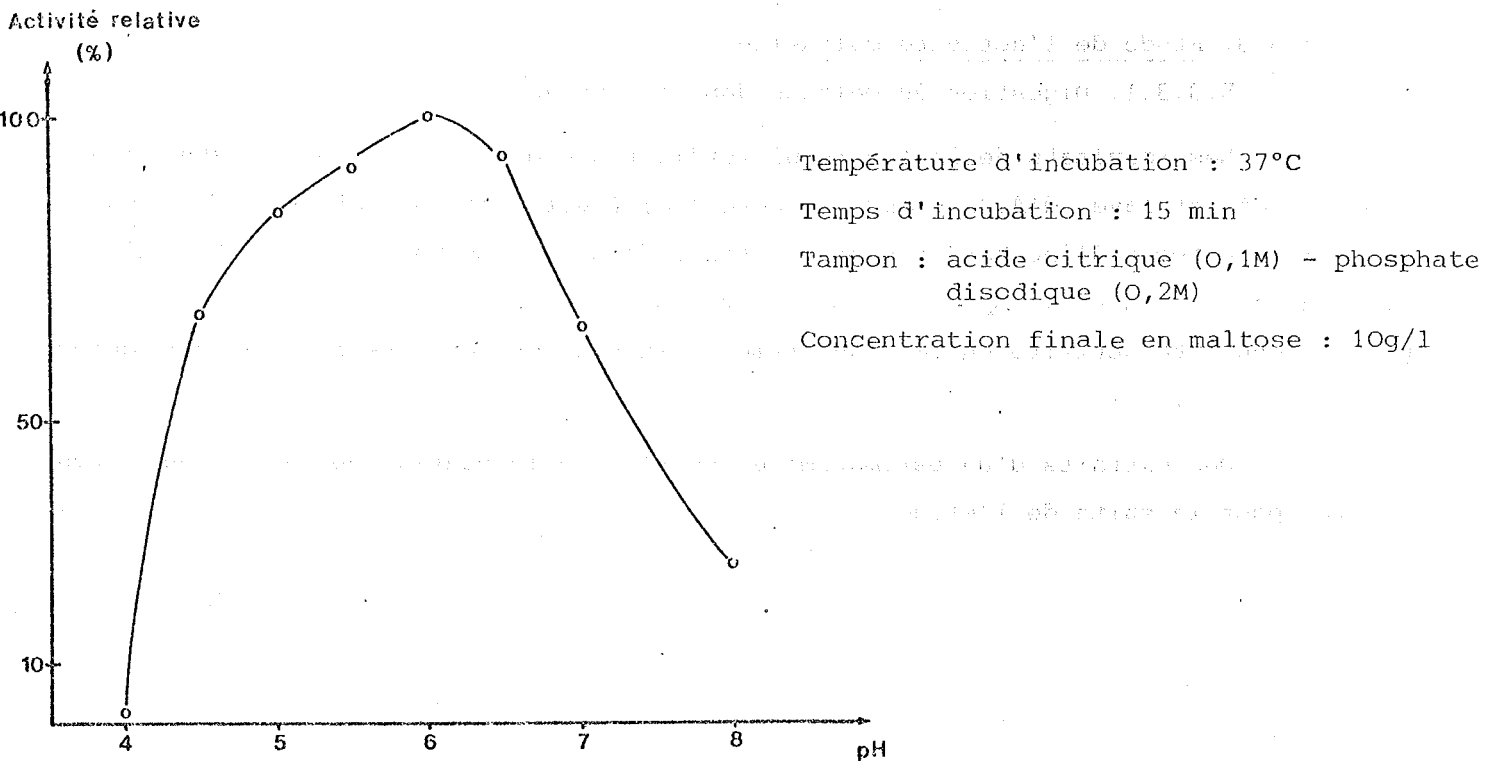


Figure n° 63 : Influence du pH sur l'activité maltasique des estomacs.

5.3.3.2. pH optimum.

L'influence du pH sur l'activité de la maltase est décrite sur la figure 63. L'activité enzymatique présente un optimum à $\text{pH} = 6,0$. Pour un pH inférieur à 4,5, l'activité est totalement inhibée. Elle est voisine du quart de l'optimum à $\text{pH} = 8,0$.

5.3.3.3. Influence de la concentration en maltose, K_m de l'enzyme.

La figure 64 décrit l'activité de la maltase des estomacs d'*Acromyrmex octospinosus* en fonction de la concentration en maltose.

La courbe obtenue révèle une légère inhibition par excès de substrat pour des concentrations en maltose supérieures à 30 g/l.

La constante de Michaelis (K_m) de la maltase est mesurée à l'aide de la représentation de LINEWEAVER et BURK : $1/DO$ en fonction de $1/S$ (fig. 65). Dans le cas d'inhibition par excès de substrat, cette représentation n'est pas linéaire, et le K_m est donné par l'intersection de la droite asymptotique avec l'axe des abscisses. Cette asymptote sera confondue ici avec la droite de régression obtenue pour des concentrations inférieures à 5 g/l. Le K_m mesuré sur trois broyats et quatre concentrations en maltose est égal à $12,7 \pm 3,5$ g/l.

5.3.3.4. Influence de la température.

La figure 66 montre l'activité de la maltase en fonction de la température d'incubation. L'activité enzymatique croît jusqu'à 40°C. Pour des températures supérieures l'enzyme paraît rapidement dénaturée. La maltase semble plus sensible à la chaleur que les enzymes précédemment étudiées. Cette instabilité thermique est vérifiée par l'influence du temps de maintien de l'extrait enzymatique à 45°C sur l'activité maltasique (fig. 67). Moins de 50% de l'activité initiale reste mesurable au bout d'une heure. Après quatre heures à 45°C l'activité enzymatique résiduelle est pratiquement nulle.

5.3.3.5. Activité de la maltase stomacale des ouvrières d'*Acromyrmex octospinosus*.

L'activité de la maltase est mesurée sur huit broyats d'estomacs vidés pour chaque groupe d'ouvrières major, media et minor. Les résultats exprimés par individu et par mg de poids frais sont reportés au tableau n° XVI.

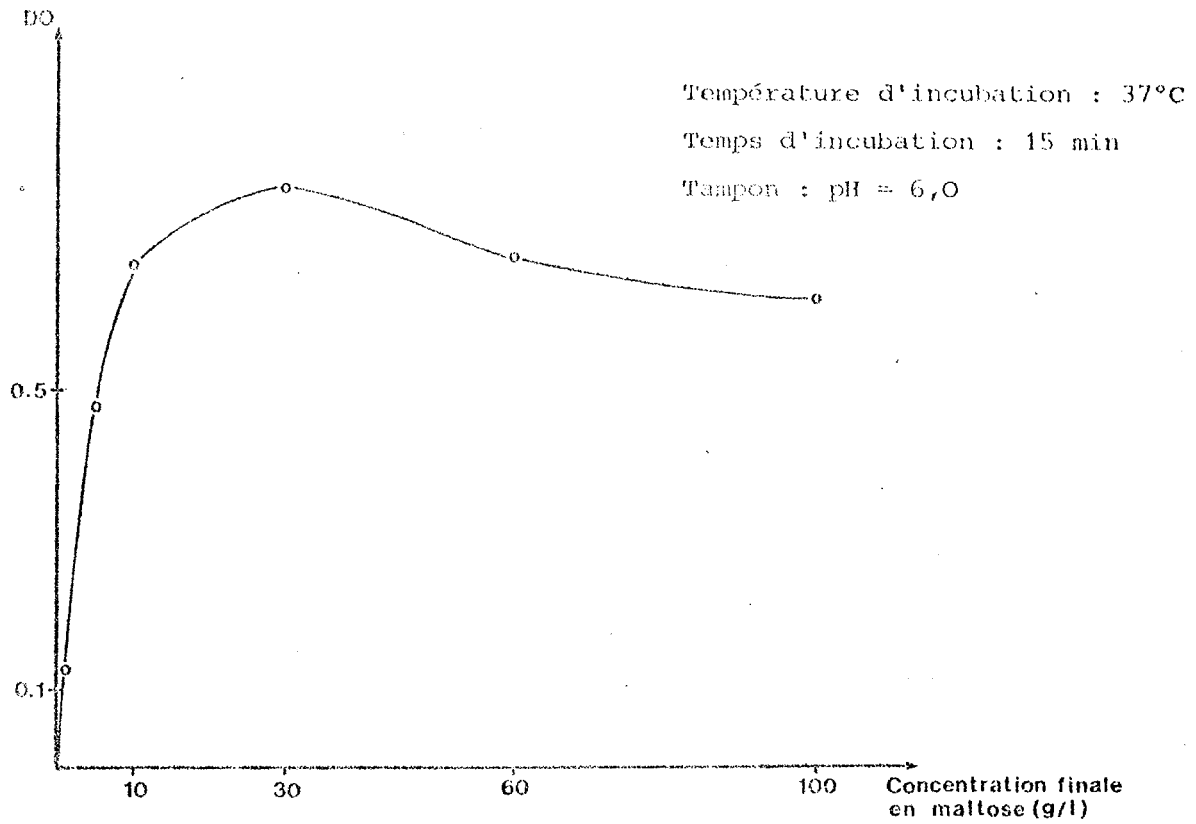


Figure n° 64 : Influence de la concentration en substrat sur l'activité maltasique des estomacs.

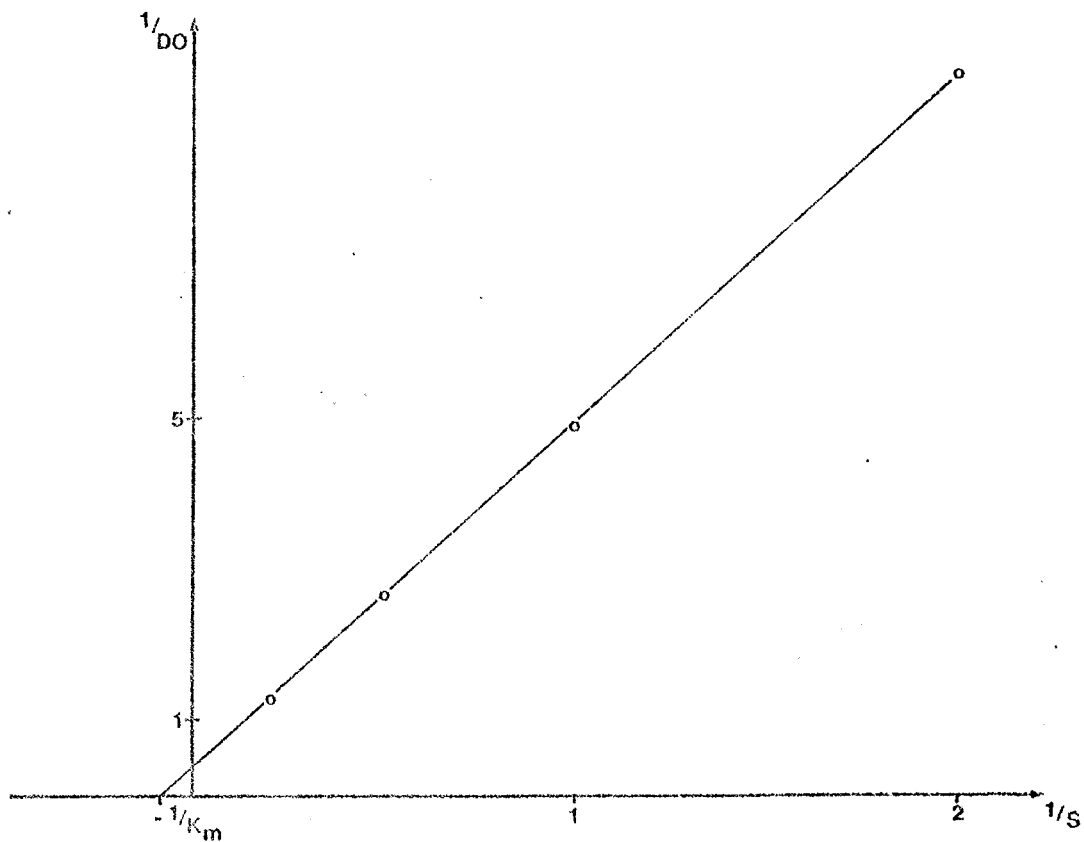


Figure n° 65 : Représentation selon LINEWEAVER et BURK.

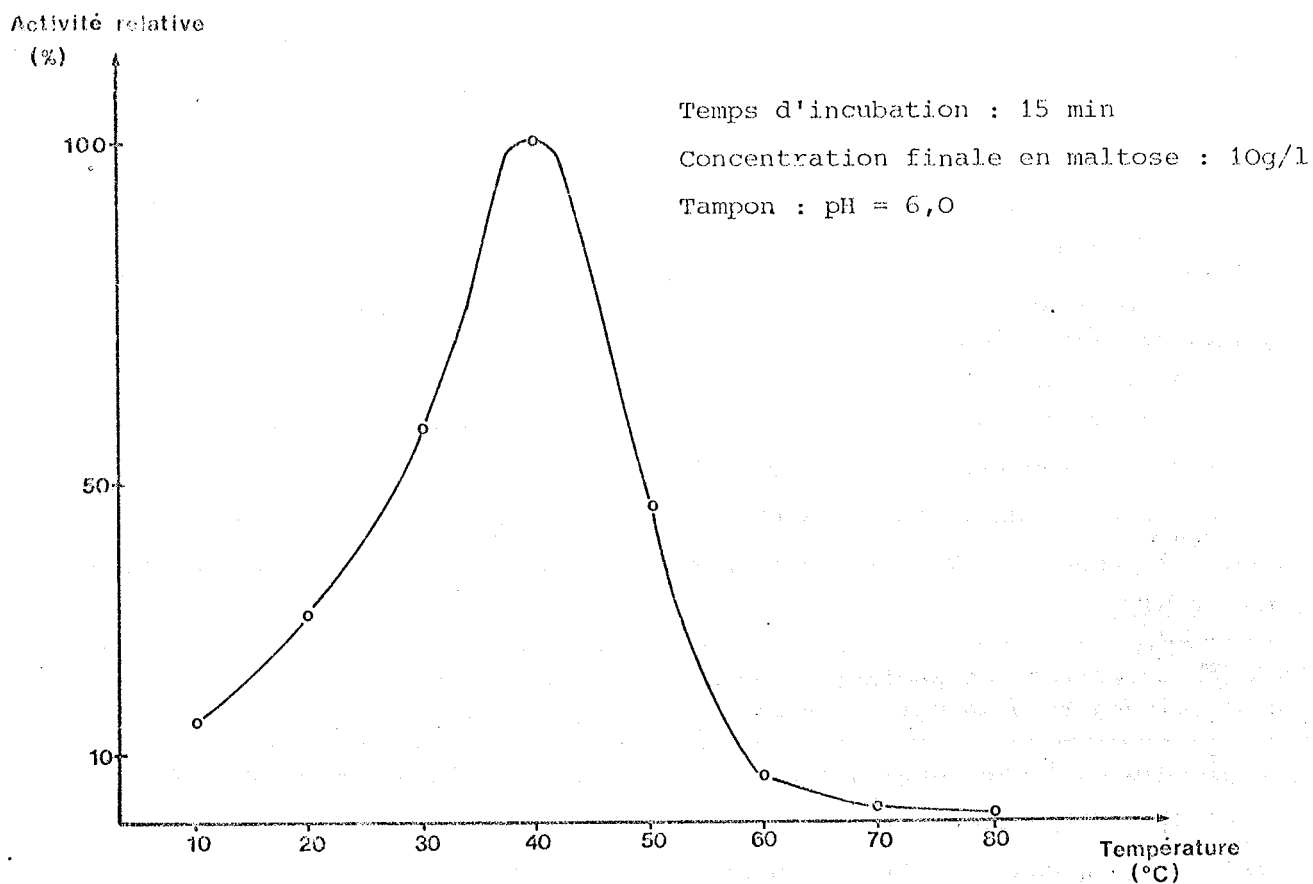


Figure n° 66 : Influence de la température d'incubation sur l'activité maltasique des estomacs.

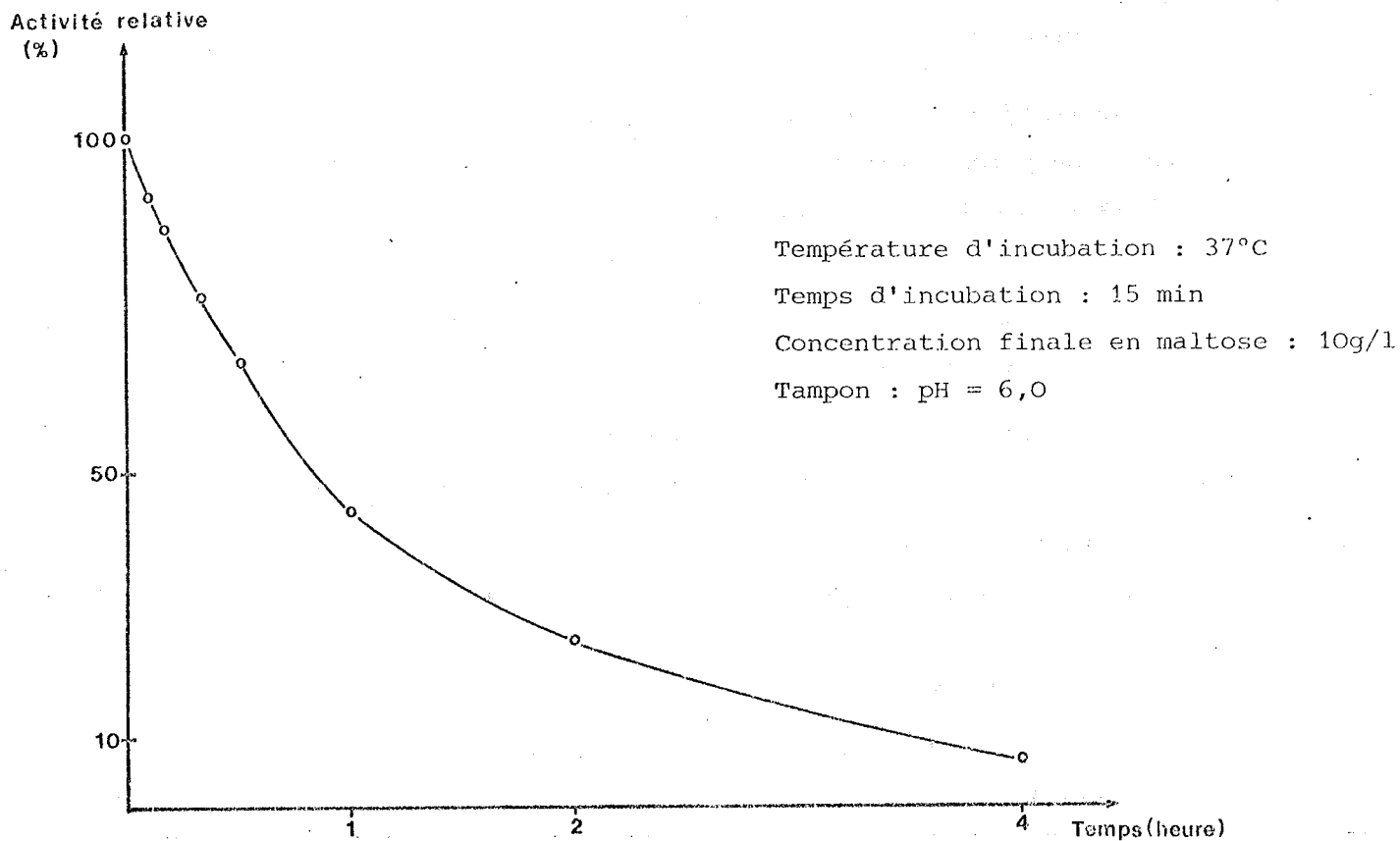


Figure n° 67 : Influence du temps de maintien de l'extrait enzymatique à 45°C sur l'activité maltasique des estomacs.

OUVRIERES	MINOR	MEDIA	MAJOR
Poids individuel (mg)	1 à 2	4 à 6	12 à 15
Activité de la maltase en nmoles de glucose/min/individu	7,4 ± 1,2 variance = 2,1	22,1 ± 3,0 variance = 13,2	32,3 ± 7,7 variance = 84,6
Analyse globale de la variance à 1 critère de classification : F calculé = 37,6 ; ddl = 2 et 21 ; F théorique (1%) = 5,78. Comparaison deux à deux : test de NEWMAN et KEULS, plus petite amplitude significative (1%) pour 2 moyennes = 4,7. L'activité par individu des 3 groupes est significativement différente.			
Activités de la maltase en nmoles de glucose/min/mg PF d'animal	5,84 ± 1,13 variance = 1,82	4,08 ± 0,59 variance = 0,50	2,32 ± 0,56 variance = 0,44
Analyse globale de la variance à 1 critère de classification : F calculé = 26,9 ; ddl = 2 et 21 ; F théorique (1%) = 5,78. Comparaison deux à deux : test de NEWMAN et KEULS, plus petite amplitude significative (1%) pour 2 moyennes = 0,79. L'activité par mg PF des 3 groupes est significativement différente.			

TABLEAU n° XVI : Activité de la maltase stomacale des ouvrières d'*Acromyrmex octospinosus*.

L'activité de la maltase est proportionnelle à la taille des individus. Exprimée par rapport au poids frais elle reste significativement différente entre les 3 groupes d'ouvrières mais est supérieure pour les petits individus.

5.3.3.6. Rapport d'activités de la maltase entre les glandes labiales et l'estomac.

L'activité maltasique est recherchée sur un broyat de dix paires de glandes labiales. Parallèlement elle est mesurée sur les dix estomacs des mêmes individus.

Il n'existe qu'une très faible activité maltasique dans les glandes salivaires qui ne représente que 2,5% de l'activité stomacale.

5.3.3.7. Conclusion.

Chez *Acromyrmex octospinosus*, la maltase est présente principalement au niveau de l'estomac. Le maltose, issu de la digestion de l'amidon et du glycogène par les amylases des glandes labiales, sera donc hydrolysé à ce niveau.

6- CONCLUSION GENERALE.

<< Les Sociétés de Fourmis sont rendues puissantes par le nombre des individus qui les composent, par la tenacité, le courage et les instincts compliqués, par les organes très perfectionnés, les moyens d'attaque et de défense que possèdent ces individus, par le milieu favorable et la protection que leur fournissent leurs retraites bien abritées ; par une division du travail qui peut être poussée très loin >>.

JANET, 1897

Rapports des Animaux Myrmécophiles
avec les fourmis

Ce travail, à la fois descriptif et expérimental, nous permet à présent de tenter une synthèse des processus digestifs chez *Acromyrmex octospinosus*. Un certain nombre de questions sont restées sans réponse et les connaissances complémentaires à apporter seront soulignées. Des perspectives d'application peuvent être également dégagées pour la définition de nouvelles stratégies de contrôle intégré.

6.1. CONNAISSANCES ACQUISES PAR CE TRAVAIL.

6.1.1. Anatomie

En premier lieu des précisions sont apportées sur l'anatomie du tube digestif de l'adulte et de la larve.

Adultes : L'anatomie de la cavité préorale où a lieu la filtration a été décrite par l'examen au microscope électronique à balayage des différentes pièces buccales. La poche infrabuccale, creusée dans le domaine hypopharyngien, reçoit tous les aliments ingérés. La bouche fonctionnelle, à l'entrée du prépharynx (formé par la soudure de l'hypopharynx et de l'épipharynx), joue le rôle d'un filtre. Celui-ci est formé par un tapis de soies : simples et allongées ($\approx 20\mu\text{m}$) sur l'épipharynx et de nombreuses rangées de digitations épicuticulaires qui se terminent par des séries d'une dizaine de soies courtes (5 à $10\mu\text{m}$) sur l'hypopharynx. Cette morphologie et l'observation de la prise de nourriture chez *Acromyrmex octospinosus* montrent que les éléments solides de l'ingesta sont efficacement arrêtés. L'obstruction du prépharynx est évitée grâce à une morphologie particulière des lacinia. L'arrière présente en effet une série de denticules, véritable brosse qui nettoie le filtre infrabuccal lors des mouvements de va-et-vient de la maxille. Dans les conditions normales d'alimentation, les éléments solides sont rejetés au bout de 24 heures environ, sous la forme d'une boulette de régurgitation. Ce temps de stockage relativement court ne permet pas, semble-t-il, à la microflore de cette poche de jouer un rôle efficace de dégradation des éléments organiques.

La séquence classique : oesophage, jabot, estomac, intestin et ampoule rectale se retrouve chez *Acromyrmex octospinosus*. Les glandes salivaires reliées directement au tractus digestif sont au nombre de 3 paires :

- Les glandes post-pharyngiennes formées de 6 ou 7 tubules courts situés au-dessus des lobes antennaires du cerveau. Chaque groupe aboutit par un conduit latéral à l'arrière du pharynx.

- Les glandes maxillaires : les glandes, situées de part et d'autre de la poche infrabuccale, sont formées par un groupe d'environ quarante grandes cellules sécrétrices. Les conduits débouchent immédiatement à l'avant du pharynx.

- Les glandes labiales : situées au niveau des pro- et mésothorax, elles sont constituées d'une partie distale et proximale. Les deux conduits se rejoignent en un canal commun qui débouche au niveau du labium.

Larves : Les stades larvaires sont décrits par ailleurs (TORREGROSSA et al, 1981). L'anatomie est étudiée par dissection et sur des coupes transversales colorées au trichrome de MASSON GOLDNER. Le tractus des larves est très simplifié, il ne comporte aucun filtre buccal et tous les aliments sont ingérés. Dans sa partie postérieure, l'oesophage s'ouvre par une valvule cardiaque dans l'estomac. Ce dernier, allongé et clos, occupe la plus grande partie du corps de l'animal. L'ingesta est retenu dans une série de membranes péritrophiques. Elles seront rejetées avec les résidus non digérés au moment de la mue nymphale (méconium).

Il n'existe chez les larves qu'une seule paire de glandes exocrines, les glandes salivaires, formées de 2 tubules allongés ventralement dans la cavité générale. Ils se réunissent en un canal commun qui débouche au niveau du premier somite thoracique.

6.1.2. Aspects enzymologiques du tractus digestif.

6.1.2.1. Activités enzymatiques des glandes salivaires et de l'intestin moyen des adultes et des larves.

L'identification d'une gamme d'enzymes digestives présentes chez *Acromyrmex octospinosus* est faite à l'aide d'une microméthode semi-quantitative.

Adultes : Les études réalisées sur les ouvrières et les sexués (mâles ou femelles) donnent des résultats similaires. Les glandes post-pharyngiennes et maxillaires ne présentent aucune sécrétion d'enzyme digestive. Les glandes labiales possèdent au contraire deux activités importantes : α glucosidasique et β -N-acétylglucosaminidasique. Une faible activité exopeptidasique est aussi décelée. De toutes les osidases testées, l'estomac ne sécrète qu'une activité α glucosidasique. Aucune endopeptidase n'est mise en évidence, mais 3 exopeptidasases sont présentes dans l'estomac.

Larves : Les glandes salivaires présentent la β -N-acétylglucosaminidase comme dans les glandes labiales de l'adulte. L'estomac larvaire possède une grande variété d'enzymes. Certaines paraissent avoir une origine alimentaire. D'autres interviennent

vraisemblablement dans le fonctionnement du tube digestif. Comme chez l'adulte on observe pour le métabolisme des polysides une importante activité α -D-glucosidasique. En ce qui concerne les protéinases, outre une très forte activité exopeptidasique, l'estomac possède une activité endopeptidasique (type chymotrypsine).

6.1.2.2. Système chitinolytique des glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus*.

β -N-acétylglucosaminidase (β -NAGase) : Une technique histoenzymologique nous a permis de vérifier que seules les glandes labiales sécrètent cette enzyme. Par électrophorèse, nous avons mis en évidence deux β -NAGases d'origines différentes. La première provient des glandes digestives et la seconde se trouve dans tout le corps, probablement au niveau de l'hémolymphe. Ces deux enzymes se séparent très nettement par leur pHi : compris entre 8,5 et 10 pour celle des glandes et entre 7,0 et 7,5 pour l'autre. La β -NAGase salivaire a un pH optimum de 6,0 et une constante de Michaelis égale à $0,36 \pm 0,08$ nM. Elle est inhibée par un excès de substrat. Son activité augmente avec la température jusqu'à 55°C ; au-dessus de 70°C l'enzyme est totalement dénaturée. Maintenu à 45°C cette β -NAGase est très stable : l'activité est conservée pendant 13 heures ; après 24 heures il subsiste encore 45% de l'activité initiale. L'activité totale de la β -NAGase des glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus* est proportionnelle au poids de l'animal. Elle varie de $1,01 \pm 0,20$ nmoles de p-nitrophénol libéré par min et par animal pour les petites ouvrières à $17,11 \pm 3,29$ nmoles de pNP/min/animal pour les sexués mâles. Exprimée par unité de poids, elle est supérieure pour les petites ouvrières et inversement proportionnelle à la taille de l'animal. Le jeûne n'a pas d'influence sur l'activité de la β -NAGase.

Chitobiase : La chitobiase est l'enzyme qui dégrade le chitobiose en deux molécules de N-acétylglucosamine (dernière étape de la digestion de la chitine). Selon les auteurs chitobiase et β -N-acétylglucosaminidase sont soit confondues soit considérées comme enzymes distinctes. Dans les glandes labiales d'*Acromyrmex octospinosus* nous avons démontré l'existence d'une activité chitobiasique. Dans le système électrophorétique utilisé (tampon tris borate, pH = 9,0) la chitobiase et la β -NAGase migrent à la même distance. Toutefois le pH optimum de la chitobiase est compris entre 7,0 et 7,5 (contre 6,0 pour la β -NAGase), son activité est maximale dès 20°C (contre 55°C pour la β -NAGase) et sa stabilité est très grande à 45°C : après 24 heures la totalité de l'activité initiale est conservée (contre 45% pour la β -NAGase). Deux enzymes distinctes paraissent donc être à l'origine des activités chitobiasique et β -N-acétylglucosaminidasique.

Chitinase : La digestion de chitine par des extraits de glandes révèle l'existence d'une chitinase. Son pH optimum de 7,0 est supérieur de 2 unités à ceux décrits dans la littérature. Contrairement à la chitobiase et la β -NAGase, la chitinase est sensible à la chaleur : après 1 heure à 45°C l'activité résiduelle n'est plus que de 23%. La digestion de la chitine constituant les parois du champignon symbiotique d'*Acromyrmex octospinosus* est effective. Un extrait de 3 glandes labiales libère en 24 heures $77,4 \pm 9,6 \mu\text{g}$ de N-acétylglucosamine à partir d'environ 200mg de champignon frais. Outre un gain d'énergie, elle permet aux adultes, privés d'endopeptidases, de bénéficier d'un supplément d'azote ($4,9 \mu\text{g}$ dans l'exemple précité).

6.1.2.3. Système α -glucosidasique chez *Acromyrmex octospinosus*.

L'activité α -glucosidasique est révélée dans les glandes labiales et les estomacs des adultes d'*Acromyrmex octospinosus*. Sur des extraits de ces organes nous avons recherché la digestion de l'amidon et du glycogène (amylase) ; du maltose, étape ultime de la précédente (maltase) ; du tréhalose (tréhalase).

L'activité amyliasique est présente dans les glandes labiales ; les estomacs vidés de leur contenu ne la possèdent pas. Près du quart de l'activité des glandes transite avec l'ingéré et se retrouve dans les estomacs pleins. Tréhalase et maltase sont sécrétées par l'estomac. Ces trois enzymes ont des pH optimum voisins de 5,5. L'amylase ne présente pas d'inhibition par excès de substrat, sa constante de Michaelis (substrat glycogène) est égale à $0,71 \pm 0,28 \text{ g/l}$. L'activité amyliasique est légèrement augmentée par les ions chlore. Elle diminue avec le jeûne pour être presque nulle après 9 jours. Cependant, son activité augmente pour les fourmis recevant une solution de glycogène après 6 jours de jeûne. La tréhalase a une température optimale de 60°C et est dénaturée à 70°C. Son Km est égal à $14,0 \pm 1,4 \text{ nM}$. L'activité de la tréhalase, exprimée par unité de poids, n'est pas différente entre les ouvrières minor, media et major ($6,4 \pm 0,6 \text{ nmoles de glucose libéré par min et par mg frais}$). Comme pour l'amylase, cette activité diminue avec le jeûne. La maltase présente une légère inhibition par excès de substrat. Son Km est égal à $12,7 \pm 3,5 \text{ g/l}$. Cette enzyme est plus sensible à la chaleur que les précédentes. Elle est dénaturée dès 50°C. L'extrait enzymatique maintenu 1 heure à 45°C présente moins de 50% de l'activité maltasique initiale. Après 4 heures, l'activité est pratiquement nulle.

6.2. APPORT NUTRITIONNEL DU CHAMPIGNON ET DIGESTION CHEZ *ACROMYRMEX OCTOSPINOSUS*.

6.2.1. Apport nutritionnel du champignon

Le contenu calorifique de divers champignons consommés s'étend de 0,1 à 0,7 calories par gramme de poids frais (PILAT et USAK, 1958 ; HODGMAN et al, 1959 ; PROUDFIT et ROBINSON, 1961 ; SINGER, 1961). Il est supérieur à beaucoup de fruits et de matériel végétal, mais les tissus fongiques restent moins riches en énergie que les graines et les tissus d'animaux.

Le taux de carbone des champignons est généralement compris entre 40 et 50% du poids sec (WHITAKER, 1951). Les quantités d'azote sont hautement variables et dépendent de l'espèce, de l'âge, du type de tissu et du substrat qui supporte la culture. Elles varient généralement dans des proportions de 2 à 8% du poids sec (MATTSON, 1980). Les minéraux les plus importants sont le phosphore et le potassium (COCHRANE, 1958 ; LILLY, 1965).

Les cellules des champignons sont, comme les autres cellules, constituées d'eau, d'hydrates de carbone, de protéines et de lipides.

La plus grande partie des hydrates de carbone est formée par les polysaccharides structuraux. Les tissus fongiques sont une riche source de sucres pour les organismes possédant les enzymes digestives appropriées. Les parois des champignons sont composées de polysaccharides qui n'existent pas chez les végétaux supérieurs. Le constituant primaire est la chitine, accompagnée de glucanes non cellulosiques (β 1-3 et β 1-6) ainsi que de petites quantités de α -D-glucanes et hétéropolymères contenant du glucose, du mannose, du xylose et du fucose (ARONSON, 1965 ; BARTNICKI-GARCIA, 1968, 1970). Cellulose, lignine et pectine ne sont pas présentes chez les champignons supérieurs. En plus des polysaccharides structuraux des parois, le cytoplasme contient du glycogène, polyoside de réserve (BRACKER, 1967 ; GORIN et SPENCER, 1968) ainsi que des quantités significatives de tréhalose et de mannitol. Ces différents hydrates de carbone sont mis en évidence dans quelques champignons cultivés par les Attines : celui d'*Atta colombica tonsipes* par MARTIN et al (1969b) et ceux d'*Atta cephalotes*, *Atta sexdens* et *Acromyrmex octospinosus* par DECHARME (1980).

Si les cellulases, hémicellulases et pectinases permettent aux Insectes phytophages d'exploiter efficacement les tissus des plantes, la chitinase reste l'enzyme primordiale des consommateurs de champignon. Les glucanases en β (1-6) et β (1-3) ainsi que les glucosidases en α (1-4) et α (1-1) interviendront également sur d'autres glucanes des parois et sur les polysaccharides du cytoplasme.

Les protéines sont les seconds composés majoritaires des tissus fongiques. La plupart des études rapportent une teneur en protéines de 20 à 40% du poids sec (SINGER, 1961). Les protéines des champignons contiennent tous les acides aminés usuels et ne sont pas très différentes de celles des feuilles (THATCHER, 1954). Le mycélium contient aussi des acides aminés libres (BONNET, 1959 ; HEINEMANN et CASIMIR, 1960 ; MILLER, 1961). Il est important de noter l'absence de tannins condensés dans les champignons (ARONSON, 1965 ; BARTNICKI-GARCIA, 1968, 1970). Ces substances, présentes dans la plupart des végétaux supérieurs, se complexent avec les protéines et réduisent ainsi leur appétence et leur digestibilité. L'avantage écologique est évident face aux autres phytophages. La consommation par les Attines d'un champignon cultivé sur un substrat végétal serait pour partie expliquée par ce rôle détoxifiant. Grâce à cet intermédiaire, elles peuvent, avec moins de contraintes, exploiter une gamme très large de plantes.

Les micronutriments (vitamines, précurseurs d'hormones,...) doivent être pris en compte dans les valeurs alimentaires. Le tissu fongique est une source de choline et de vitamine B (BONNET, 1959 ; HODGMAN et al, 1959 ; MILLER, 1961), importantes molécules pour les insectes (HOUSE, 1974). Ces invertébrés dépendent également d'une source de stérol pour leur croissance et leur reproduction. L'ergostérol, stérol majeur des champignons (COCHRANE, 1958 ; MILLER, 1961), s'y trouve en quantités suffisantes pour les besoins des Insectes. Il est présent à un taux d'environ 2‰ (par rapport au poids sec) dans le symbiote cultivé par *Atta colombica tonsipes* (MARTIN et al, 1969b).

Les tissus fongiques ont donc une haute valeur nutritive. Cependant la mycophagie n'est pas une simple modification et extension de la phytophagie, mais une stratégie alimentaire qui exige des capacités digestives particulières.

6.2.2. La digestion chez *Acromyrmex octospinosus*

Acromyrmex octospinosus est une fourmi champignonniste qui possède un bagage enzymatique permettant de digérer son symbiote.

La dégradation des protéines est réalisée chez les larves par une endopeptidase (type chymotrypsine). Les adultes ne présentent pas ce type d'activité et sécrètent uniquement des exopeptidases. Ce caractère n'est pas exceptionnel chez les adultes d'Hyménoptères qui dépendent parfois des sécrétions larvaires pour leurs besoins en acides aminés (MASCHWITZ, 1965, 1966 ; ISHAY et IKAN, 1968 ; WUST, 1973).

Le métabolisme des polysides est à présent bien perçu (fig. 68). Grâce à la présence dans les glandes labiales des enzymes de la chitinolyse (chitinase et chitobiase), la digestion des parois du symbiote est réalisable. Imbibé de salive, le mycélium est incubé dans la poche infrabuccale pendant environ 24 heures. La macération

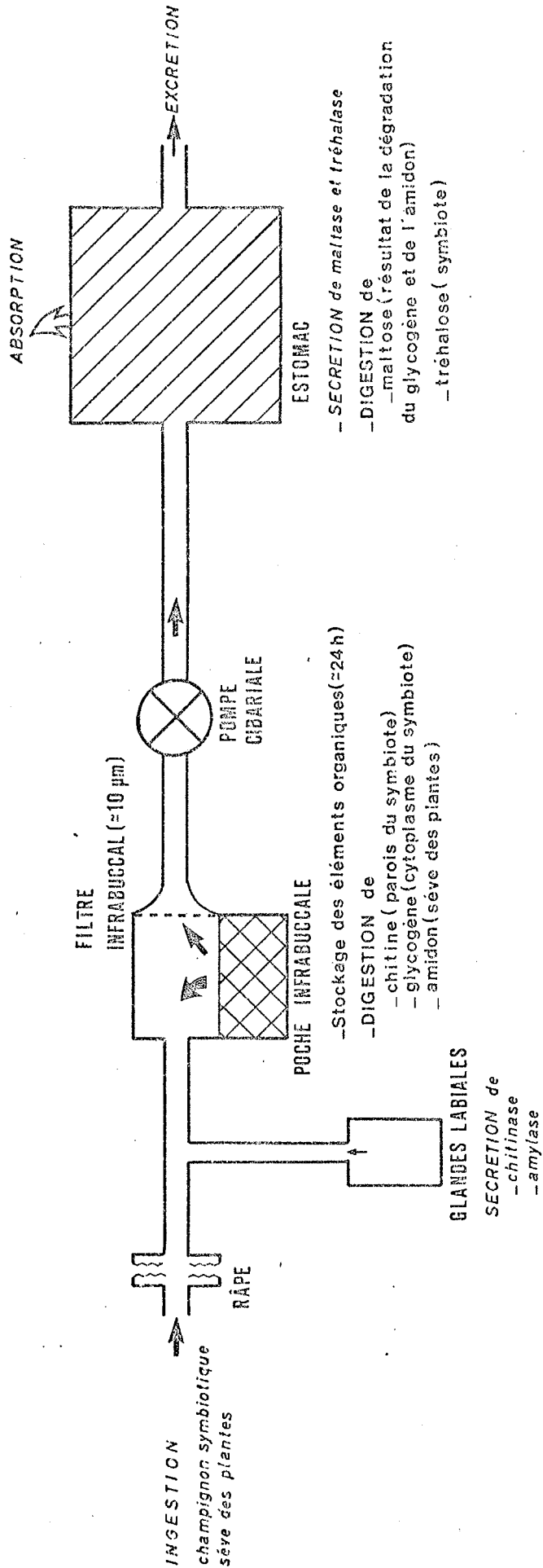


Figure n° 68 : Schéma de la digestion des polysides chez *Acromyrmex octospinosus*.

préorale potentialise cette digestion, source non négligeable d'énergie mais aussi d'azote. L'amylase, également originaire des glandes labiales, permet à l'insecte d'accéder au glycogène et de dégrader ce polysaccharide de réserve du champignon symbiotique. Elle autorise de plus la dégradation de l'amidon ingéré avec la sève des plantes lors de la préparation du substrat végétal. Suite à cette digestion préorale, la pompe cibariale entraîne le maltose qui sera hydrolysé par la maltase stomacale. La dégradation du tréhalose du cytoplasme du symbiote est réalisée au niveau de l'estomac par une tréhalase.

La β -N-acétylglucosaminidase présente dans les glandes labiales est une enzyme distincte de la chitobiase. Son rôle peut ne pas être strictement digestif : son action lysozymique est en effet signalée par IMOTO et al (1972).

La poche infrabuccale présente une microflore complexe provenant du nettoyage du nid et de la préparation des feuilles affouragées. Les bactéries sont observables avec les éléments prélevés directement de cette poche. Cependant, dans la décharge de la société où sont rejetées les boulettes infrabuccales, on n'observe aucun développement bactérien. Au laboratoire, face à des spores de champignon pathogènes (moniliales), en boîte de Petri ou sur la piste, les ouvrières ont un comportement immédiat de nettoyage de la zone souillée. Le compactage des conidiospores a lieu dans la poche infrabuccale et la régurgitation des boulettes est alors plus importante. Les masses de spores ainsi rejetées, déposées sur milieu gélosé, paraissent avoir perdu une grande part de leur capacité germinative (KERMARREC, comm. pers.). Ces observations nous amènent à soupçonner l'existence d'un composé bactério- (et fongi-) statique (et/ou lytique). Comme la poche infrabuccale n'a aucun rôle sécrétoire, un composé antimicrobien devra avoir une origine antérieure. La β -N-acétylglucosaminidase présente dans les glandes labiales pourrait jouer ce rôle grâce à sa fonction lytique. Cette enzyme constitutive a, par mg d'animal frais, une activité plus importante chez les petites ouvrières chargées précisément d'entretenir le jardin fongique, les larves et la décharge. L'idée d'une fonction homéostatique au niveau microbien par la β -N-acétylglucosaminidase est émise. La preuve ne pourra cependant être apportée qu'à l'issue des études complémentaires actuellement en cours.

6.3. QUELQUES PROBLEMES NON RESOLUS.

Les recherches décrites dans les chapitres précédents apportent des données nouvelles sur quelques aspects de la physiologie digestive d'*Acromyrmex octospinosus*. Dans cette association entre un animal et un champignon, de nombreuses questions demeurent sans réponse. Nous pouvons les regrouper sous deux titres :

- les échanges alimentaires dans la colonie d'*Acromyrmex octospinosus*,
- l'avantage de l'utilisation d'un champignon par la fourmi.

6.3.1. Echanges alimentaires dans la colonie d'*Acromyrmex octospinosus*

Comme chez les autres fourmis, la nature exacte des échanges alimentaires est peu connue chez *Acromyrmex octospinosus*. Les difficultés expérimentales liées à la petitesse du matériel ont sans doute freiné les recherches dans ce sens. Le marquage radioactif serait riche d'enseignement, car la vie sociale des Insectes est en grande partie réglée par une alimentation communautaire (estomac social) avec des échanges salivaires variés, aux fonctions complexes. Chez les Attines, les aliments transitent par différents individus : transfert du Mirex dans les colonies d'*Atta texana* (ECHOLS, 1966), trophallaxie dans les nids d'*Atta sexdens* (BAZIRE-BENAZET, 1974).

Chez *Acromyrmex octospinosus* différents flux paraissent importants à étudier :

- Le contenu des glandes post-pharyngiennes qui ne présentent aucune sécrétion enzymatique : PEREGRINE et al (1973, 1974) montrent qu'il est composé d'un mélange d'environ 10 triglycérides ainsi que d'acides gras et de stérols libres en quantités mineures. Il reste à savoir si ces éléments sont régurgités aux larves ou encore à la reine.

- Les sécrétions stomodéales et proctodéales des larves : l'absence d'endopeptidase oblige les ouvrières à trouver les acides aminés libres. Les larves qui possèdent une activité du type chymotrypsique en seraient une source potentielle. La consommation des gouttelettes anales des larves par les ouvrières a pu être observée chez *Acromyrmex octospinosus*. L'existence d'autres sécrétions larvaires consommées par les adultes et le rôle de ces liquides dans leur nutrition restent à déterminer.

- La ponte d'oeufs alimentaires : il y a ponte d'oeufs alimentaires par la reine chez *Atta sexdens rubropilosa* et par les ouvrières chez *Atta laevigata* (BAZIRE-BENAZET, 1957, 1970). Ces oeufs sont présentés à la reine ou aux larves. Chez *Acromyrmex octospinosus*, l'existence même d'un tel processus trophique n'est pas prouvée.

Ces quelques aspects soulignés parmi les mécanismes complexes des flux alimentaires montrent la richesse des relations trophiques dans une société d'Attines.

6.3.2. Avantages de l'utilisation d'un champignon par la fourmi

L'avantage écologique de la domestication d'un champignon par les Attines a été abordé en particulier dans l'introduction de ce travail. Deux notions importantes peuvent être soulignées à nouveau :

- Fonction de détoxification des substances protégeant les plantes des phytophages.
- Fonction de concentration de l'azote dilué des végétaux et synthèse de stérols et de vitamines absents dans les plantes.

6.4. CONSEQUENCES APPLIQUEES : NOUVELLES VOIES POUR UN CONTROLE INTEGRE.

6.4.1. Définition du problème

Les études entreprises sur la physiologie digestive d'*Acromyrmex octospinosus* entrent dans le cadre d'une recherche de nouvelles méthodes de contrôle. La description de l'organisation sociale d'un nid d'Attine a permis de définir les bases éthologiques et écophysiological d'un contrôle intégré (KERMARREC et al, 1977). La destruction des individus présents en surface est totalement inopérante car ils ne représentent qu'une infime partie de la population à l'abri sous terre. Pour détruire la société et mettre fin aux dégâts sur les végétaux cultivés, la qualité primordiale de tout agent insecticide (chimique ou biologique) est son effet retard. Celui-ci est envisageable par enrobage du principe actif dans une gaine (micro-encapsulation). Le toxique ainsi protégé pourra être distribué à toute la société par les échanges trophallactiques. Son action ne débutera qu'ultérieurement après digestion de la gaine par les sécrétions des fourmis.

6.4.2. Les microencapsulés : utilisation et fabrication

Le concept de microencapsulation est maintenant bien connu et de nombreux procédés sont développés pour préparer des microcapsules. Le but de cette technique est la fabrication de conteneurs microscopiques qui protègent les composés enrobés. Leur libération contrôlée est réalisée soit par rupture mécanique soit par digestion de la coque. Certains procédés utilisent aussi la diffusion lente des produits au travers de la membrane.

Le champ d'application de cette technique est vaste et nous ne citerons que certains domaines où l'utilisation de microencapsulés est maintenant courante.

- industrie des parfums (aérosols)
- domaines vétérinaire et pharmaceutique (médicaments à effet retard, implants, masquage de l'odeur des drogues,...)
- domaine agricole (encapsulation des graisses végétales pour l'alimentation du bétail, pesticides microencapsulés,...).

La microencapsulation des insecticides a pris un important essor ces dernières années. Les organochlorés, interdits d'utilisation, sont remplacés par des organophosphorés et des carbamates. Ces derniers présentent cependant le double inconvénient d'avoir une toxicité de choc et d'être peu rémanents. Leur dégradation rapide dans l'environnement nécessite de fréquentes applications. La microencapsulation de ces pesticides prolonge leur efficacité et permet de réduire les traitements, donc la toxicité mammalienne.

Les techniques de fabrication des microcapsules sont très variées et regroupent des procédés physiques, chimiques ou mécaniques. Nous retiendrons ici deux procédés qui paraissent utilisables pour le contrôle des Attines :

- encapsulation par coacervation (VANDEGAER, 1973) : les microcapsules sont fabriquées par dispersion de fines gouttelettes d'huile (solvant de la substance active) dans une phase aqueuse contenant un colloïde hydrophile tel la gélatine, les alginates, l'albumine, la caséine, l'agar-agar, la gomme arabique, la pectine ou l'amidon. La coacervation est menée sur des gouttelettes dispersées et stabilisées autour desquelles s'agrègent les molécules de colloïde. Cette étape peut être réalisée par l'addition d'un composé à grande affinité avec l'eau (alcool, sels...) ou par neutralisation des charges du colloïde.

- encapsulation dans un flux d'air (HALL et HINKES, 1973) : ce procédé applique et sèche simultanément le matériel encapsulant sur les particules flottant dans un flux d'air. Un certain nombre de substances enrobantes sont utilisées selon cette méthode : dérivés de la cellulose, caséine, gélatine, dextrans, amidon, chitosane ...

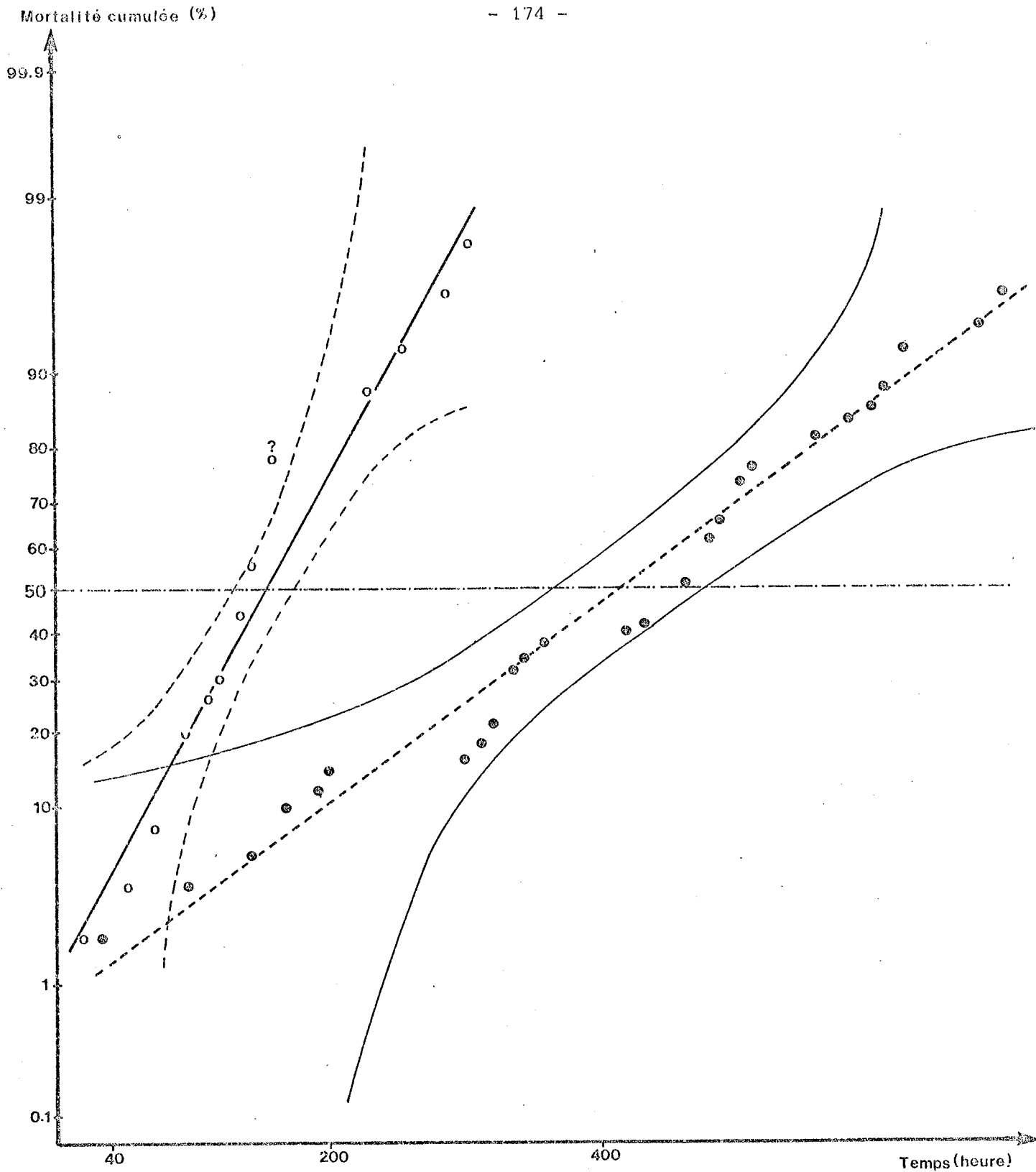
6.4.3. Application au contrôle d'*Acromyrmex octospinosus*

L'utilisation de microencapsulés dans la lutte contre *Acromyrmex octospinosus* nécessite une dégradabilité de la gaine par les enzymes digestives et la diffusion du principe actif dans le corps de l'animal. Nos recherches permettent de définir la nature de la coque enrobante et la taille des microcapsules.

Les adultes ne produisent pas d'endopeptidases, une gaine de nature protéique (gélatine, caséine ...) sera écartée d'entrée. Divers polysides sont digérés (chitine, amidon et glycogène) et peuvent être conseillés pour des essais technologiques d'encapsulation de l'insecticide. L'emploi de l'amidon paraît envisageable selon les deux techniques précédentes. L'encapsulation dans un flux d'air permet de retenir également les dextrines et le chitosane (chitine déacétylée).

La taille des microcapsules reste évidemment un paramètre important à définir. La digestion des polysides est préorale et s'effectue principalement dans la poche infrabuccale. Le diamètre optimal des capsules, supérieur à 10µm, permettra leur blocage par le filtre infrabuccal. Afin d'être ingérées, leur dimension ne dépassera pas 500µm, taille des boulettes d'hyphes ou de *staphylae* (renflements terminaux des hyphes) consommées par ces fourmis. Les deux procédés d'encapsulation précédemment décrits autorisent cette fourchette de taille. Ils permettent en effet la fabrication de capsules de diamètre compris entre quelques microns et 1 mm.

ANNEXES



○—○ lot n° 1 : fourmis en jeûne sur eau
●- - - ● lot n° 2 : fourmis en jeûne sur eau + glucose (2%).

Figure n° 69 : Droites de Henri : mortalité cumulée en fonction du temps (coordonnées gausso-arithmétiques).

ANNEXE n° 1

Courbes de mortalité des ouvrières major en jeûne

Les ouvrières sont isolées par groupes de 10 en boîtes de Petri (\varnothing 90mm). Deux lots de 50 fourmis sont expérimentés.

1er lot : Les ouvrières ont à leur disposition une coupelle contenant du coton hydrophile saturé d'eau.

2ème lot : Les ouvrières ont à leur disposition une coupelle contenant du coton hydrophile saturé d'une solution de glucose à 2%.

La mortalité est relevée à intervalles réguliers.

La représentation en coordonnées gaussio-arithmétiques (fig. 69) de la mortalité cumulée en fonction du temps est linéaire. Cette linéarité nous assure la distribution gaussienne de la probabilité de "mort" des individus en fonction du temps. Il n'y a pas donc d'hétérogénéité dans le groupe des fourmis. Les droites de Henri (en coordonnées gaussio-arithmétiques et non pondérées) sont calculées.

Lot n° 1 : $y = 0,0147 x - 2,2438$

coefficient de corrélation : $r = 0,98$

temps léthal 50% = 153 ± 21 heures.

Lot n° 2 : $y = 0,0058 x - 2,4272$

coefficient de corrélation : $r = 0,99$

temps léthal 50% = 420 ± 60 heures.

ANNEXE n° 2

Droite étalon : Densité optique (DO à 410nm) en fonction de la concentration en p.Nitrophénol.

Essais n°	[pNP] nmole/ml						
	15	20	30	40	50	60	70
1	0,192	0,265	0,388	0,520	0,640	0,76	0,88
2	0,195	0,255	0,385	0,515	0,640	0,76	0,875
3	0,200	0,270	0,395	0,520	0,640	0,77	0,885
4	0,177	0,255	0,375	0,510	0,630	0,76	0,87
5	0,192	0,255	0,380	0,520	0,640	0,76	0,88
6	0,200	0,268	0,400	0,525	0,645	0,77	0,89
7	0,183	0,250	0,380	0,505	0,635	0,765	0,875
8	0,190	0,255	0,375	0,510	0,640	0,76	0,87
9	0,190	0,255	0,380	0,510	0,640	0,76	0,88
10	0,190	0,255	0,380	0,510	0,630	0,75	0,865
11	0,193	0,255	0,385	0,518	0,630	0,75	0,875
12	0,195	0,258	0,382	0,510	0,635	0,75	0,875
Moyennes	0,191	0,258	0,384	0,514	0,637	0,760	0,877
	± 0,004	± 0,010	± 0,005	± 0,004	± 0,003	± 0,004	± 0,004

n = 84

Coefficient de corrélation : r = 0,998

Equation de la droite de régression : DO (410nm) = 1,243 x + 0,009

x = concentration en p.Nitrophénol exprimée en 10⁻⁷ mole/ml.

ANNEXE n° 3

Droite étalon : Densité optique (DO à 585nm) en fonction de la concentration en N-acétylglucosamine

Quantité de N-acétyl-glucosamine dans 500µl (µg)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	60	70	80
Essais n°													
1	0,080	0,160	0,219	0,297	0,362	0,460	0,545	0,560	0,665	0,670	0,835	0,910	0,975
2	0,071	0,159	0,225	0,275	0,390	0,455	0,520	0,600	0,605	0,720	0,800	0,940	0,910
3	0,075	0,152	0,238	0,300	0,388	0,418	0,525	0,530	0,680	0,740	0,925	0,960	1,10
4	0,078	0,155	0,232	0,315	0,383	0,425	0,530	0,580	0,658	0,710	0,780	0,950	1,08
5	0,075	0,149	0,230	0,335	0,380	0,450	0,560	0,600	0,700	0,785	-	0,930	1,02
6	0,070	0,131	0,220	0,310	0,335	0,415	0,500	-	0,610	0,710	0,735	0,940	1,13
7	0,072	0,135	0,218	0,292	0,360	0,440	0,520	0,540	0,625	0,755	0,870	1,00	1,00
8	0,070	0,145	0,220	0,300	0,370	0,445	0,540	0,580	0,650	0,680	0,895	0,940	1,09
9	0,072	0,142	0,228	0,311	0,365	0,470	0,538	0,580	0,670	0,750	0,850	0,975	1,075
Moyennes	0,074 ± 0,001	0,148 ± 0,003	0,226 ± 0,002	0,304 ± 0,006	0,370 ± 0,006	0,442 ± 0,006	0,531 ± 0,006	0,571 ± 0,009	0,651 ± 0,011	0,724 ± 0,012	0,836 ± 0,022	0,949 ± 0,009	1,042 ± 0,024

Droite de régression pour des quantités de N-acétylglucosamine inférieures à 500µg :

n = 89

Coefficient de corrélation : r = 0,996

Equation de la droite de régression : DO (585nm) = 0,01445 x + 0,0064

x = quantité (µg) de N-acétylglucosamine dans 500µl du milieu réactionnel.

ANNEXE n° 4

Droite étalon : Densité optique (DO à 546nm) en fonction de la concentration en maltose.

Concentration en maltose µg/ml µmole/ml Essais n°	50	100	150	200	250	300	350	450
		0,146	0,292	0,439	0,585	0,731	0,877	1,023
1	0,025	0,118	0,218	0,319	0,420	0,547	0,638	0,760
2	0,026	0,126	0,216	0,326	0,414	0,543	0,646	0,779
3	0,018	0,110	0,217	0,314	0,416	0,523	0,634	0,745
4	0,011	0,119	0,206	0,302	0,410	0,525	0,616	0,728
5	0,024	0,114	0,220	0,348	0,417	0,555	0,646	0,756
6	0,022	0,101	0,222	0,315	0,420	0,526	0,625	0,725
Moyennes	0,021 ± 0,006	0,115 ± 0,009	0,216 ± 0,006	0,321 ± 0,016	0,416 ± 0,004	0,536 ± 0,014	0,634 ± 0,012	0,749 ± 0,021

	450	500	600	700	800	900	1000	1250
	1,316	1,462	1,754	2,047	2,339	2,632	2,924	3,655
1	0,870	1,001	1,172	1,404	1,714	1,862	2,099	2,68
2	0,868	0,998	1,194	1,405	1,626	1,855	2,083	2,67
3	0,858	0,958	1,185	1,393	1,576	1,965	2,054	2,70
4	0,828	0,945	1,170	1,381	1,645	1,920	2,058	2,66
5	0,863	0,971	1,187	1,409	1,634	1,849	2,079	2,71
6	0,860	0,953	1,360	1,360	1,615	1,925	2,080	2,61
Moyennes	0,858 ± 0,016	0,971 ± 0,025	1,177 ± 0,016	1,392 ± 0,020	1,635 ± 0,048	1,896 ± 0,050	2,076 ± 0,018	2,67 ± 0,037

n = 78

Coefficient de corrélation : r = 0,999

Equations de la droite de régression :

DO (546nm) = 2,150 x - 0,107 x = concentration en maltose en mg/ml

DO (546nm) = 0,735 x' - 0,107 x' = concentration en maltose en µmole/ml.

ANNEXE n° 5

Droite étalon : Densité optique (DO à 505nm) en fonction de la concentration en glucose.

Concentration en glucose $\mu\text{g/ml}$ $\mu\text{mole/ml}$	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
	Essais n°	0,056	0,111	0,167	0,222	0,278	0,333	0,389	0,444	0,5
1	0,159	0,320	0,480	0,640	0,810	0,967	1,134	1,292	1,458	1,618
2	0,158	0,320	0,480	0,633	0,823	0,966	1,118	1,299	1,452	1,597
3	0,158	0,319	0,481	0,642	0,807	0,984	1,147	1,291	1,458	1,607
4	0,155	0,316	0,482	0,639	0,811	0,966	1,134	1,284	1,454	1,603
5	0,160	0,320	0,478	0,643	0,810	0,962	1,134	1,299	1,443	1,592
6	0,155	0,314	0,474	0,636	0,799	0,962	1,134	1,282	1,457	1,603
7	0,168	0,319	0,477	0,642	0,807	0,973	1,130	1,291	1,454	1,624
8	0,161	0,320	0,481	0,640	0,805	0,967	1,134	1,290	1,457	-
9	0,157	0,319	0,479	0,639	0,808	0,967	1,135	1,290	1,442	1,592
Moyennes	0,159 ± 0,003	0,319 ± 0,002	0,479 ± 0,002	0,639 ± 0,002	0,809 ± 0,005	0,968 ± 0,005	1,133 ± 0,006	1,291 ± 0,004	1,453 ± 0,005	1,605 ± 0,009

n = 89

Coefficient de corrélation : r = 0,999

Equation de la droite de régression :

$$\text{DO (505nm)} = 0,0162 x - 0,003 \quad x = \text{concentration en glucose en } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{DO (505nm)} = 2,9108 x' - 0,003 \quad x' = \text{concentration en glucose en } \mu\text{mole/ml.}$$

Cette droite étalon est réalisée dans les mêmes conditions que le milieu réactionnel soit :

- 500 μl de tampon pH 5,5
- 500 μl de glucose dans de l'eau distillée

Cependant pour la détermination du pH optimum, le tampon du milieu réactionnel varie de pH = 4,0 à pH = 8,0. Cette différence de pH influe ensuite sur le dosage enzymatique du glucose. Nous avons établi de ce fait pour chaque pH une courbe étalon (un seul essai par pH).

Les différentes droites de régression obtenues sont les suivantes :

$$\text{pH} = 4,0 : \text{DO (505nm)} = 1,859 x + 0,039$$

$$\text{pH} = 4,5 : \text{DO (505nm)} = 2,547 x + 0,024$$

$$\text{pH} = 5 : \text{DO (505nm)} = 2,820 x - 0,02$$

$$\text{pH} = 6 : \text{DO (505nm)} = 2,943 x - 0,014$$

$$\text{pH} = 6,5 \text{ à } 8,0 : \text{DO (505nm)} = 3 x - 0,011$$

x représente la concentration en glucose en $\mu\text{mole/ml}$.

BIBLIOGRAPHIE

- ABBOTT A., 1978. - Nutrient dynamics of ants. In : M.V. Brian, ed., *Production ecology of ants and termites*. Cambridge University Press, p. 233-244.
- ABO KHATWA N., 1977 - Biochemistry of "fungus combs" and their rôle in the nutrition of the termites. *Congrès I.U.S.S.I. (Wageningen Sept. 1977)*, 253-256.
- AMANTE E., 1967. - A formiga-sauva *Atta capiguara*, praga das pastagens. *Biologico*, 33, 113-120.
- AMANTE E., 1968. - Emprêgo de nova isca à base de Dodecacloro (Mirex 0.45%) no combate à formiga-sauva *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908) e *Atta laegi-gata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera, Formicidae). *Biologico*, 34, 123-128.
- AMANTE E., 1972. - Preliminary observations on the swarming behaviour of the leaf-cutting ant, *Atta capiguara* (Hymenoptera : Formicidae). *Journal of the Georgia Entomological Society*, 7, 82-83.
- ANGELI-PAPA J. & EYME J., 1979. - Le champignon cultivé par la "fourmi-manioc" *Acromyrmex octospinosus* REICH en Guadeloupe ; résultats préliminaires sur le mycelium en culture pure et sur l'infrastructure des hyphes. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 289, série D, 21-24.
- ARONSON J.M., 1965. - The cell wall. In : G.C. Ainsworth, A.S. Sussman, Eds., *The fungi* Vol I. Acad Press, New York, p. 49-76.
- AUTUORI M., 1942. - Contribução para o conhecimento da saúva *Atta* spp. III. Extracavação de um saúveiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). *Arq. Inst. Biol., Sao Paulo*, 13, 137-148.
- AYRE G.L., 1963. - Feeding behaviour and digestion in *Camponotus herculeanus* (L.) (Hymenoptera : Formicidae). *Ent. Exp. et Appl.*, 6, 165-170.
- AYRE G.L., 1967. - The relationships between food and digestive enzymes in five species of ants (Hymenoptera : Formicidae). *The Can. Entomol.* 408-411.
- BADE M.L. & STINSON A., 1978. - Digestion of cuticle chitin during the moult of *Manduca sexta* (Lepidoptera : Sphingidae). *Insect Biochem.* 9, 221-231.
- BAILEY I.W., 1920. - Some relations between ants and fungi. *Ecology*, 1, 174-189.
- BARGIELLO T.A. & GROSSFIELD J., 1979. - An electrophoretic and biochemical comparison of soluble trehalase from *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Insect Biochem.* 9, 323-329.
- BARRER P.M. & CHERRETT J.M., 1972. - Some factors affecting the site and pattern of leaf-cutting activity in the ant *Atta cephalotes* (L.). *J. Entomol.*, 47, 15-27.
- BARTNICKI-GARCIA S., 1968. - Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Ann. Rev. of Microbiol.* 22, 87-108.

- BARTNICKI-GARCIA S., 1970. - Cell wall composition and other biochemical markers in fungal phylogeny. In : J.B. Harborne, Ed., *Phytochemical Phylogeny*. Academic Press, New York, p. 81-103.
- BAZIRE-BENAZET M., 1957. - Sur la formation de l'oeuf alimentaire chez *Atta sexdens rubripilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera : Formicidae). *C. R. Acad. Sci., Paris* 244, 1277-1280.
- BAZIRE-BENAZET M., 1970. - La ponte des ouvrières d'*Atta laevigata* Fred-Smith 1858 (Hymenoptera, Formicidae). *C. R. Acad. Sci., Paris*, 270, 1614-1615.
- BAZIRE-BENAZET M., 1974. - Relations interindividuelles dans la jeune colonie d'*Atta sexdens* (L.) (Hymenoptera : Formicidae). *C. R. Acad. Sci., Paris*, série D, 279, 1713-1714.
- BELT T., 1874. - *The naturalist in Nicaragua*. John Murray, London.
- BEMELMANS P.F. & AMANTE E., 1968. - Estudos, econômicos sobre o combate às saúvas no estado de Sao Paulo. *Secretaria da Agricultura, Secção de Parasitologia Vegetal do Instituto Biologico, São Paulo, Brasil*.
- BERGER L.R. & REYNOLDS D.M., 1958. - The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 29, 522-534.
- BLANCHE D., 1961. - *La fourmi-manioc*. Ministère de l'Agriculture, Service de la protection des Végétaux. SEP, Ed., Paris 1er.
- BLANCHE D., 1965. - Appâts empoisonnés contre la Fourmi-Manioc à la Guadeloupe. *Congrès de la Protection des Cultures Tropicales. Compte rendu de travaux. Marseille*. p. 449-454.
- BONNET J.L., 1959. - Application de la chromatographie sur papier à l'étude de divers champignons. *Bulletin de la Société mycologique de France*, 75, 215-352.
- BORDAH J., LEABACK D.H. & WALKER P.G. 1957. - Substrates for N-acetyl- β -glucosaminidase. *Biochem. J.* 65, 15 p.
- BOYD N.D. & MARTIN M.M., 1975a. - Faecal proteinases of the fungus-growing ant, *Atta texana* : properties, significance and possible origin. *Insect Biochem.* 5, 619-635.
- BOYD N.D. & MARTIN M.M., 1975b. - Faecal proteinases of the fungus-growing ant, *Atta texana* ; their fungal origin and ecological significance. *J. Insect Physiol.*, 21, 1815-1820.
- BRACKER C.E., 1967. - Ultrastructure of fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 5, 343-374.
- BRACONNOT H., 1811. - Sur la nature des champignons. *Ann. Chi. Phys.* 79, 265-304.
- BRUGNION E., 1930. - Les pièces buccales, le sac infrabuccal et le pharynx des fourmis. *Bull. Soc. R. Ent. Egypte*, 85-210.

- BRUNER S.C. & BARRY F.V., 1949. - Observaciones sobre la biología de la bibijagua. *Mem. Soc. Cubana Hist. Nat.*, 19, 135-154.
- CAMPBELL L.L. & WILLIAMS O.B. 1951. - A study of chitin-decomposing microorganisms of marine origin. *J. Gen. Microbiol.*, 5, 894-950.
- CHEFURKA W., 1965. - Some comparative aspects of the metabolism of carbohydrates in Insects. *Ann. Rev. Ent.*, 10, 345-382.
- CHERRETT J.M., 1969. - Baits for the control of leaf-cutting ants : I. Formulation. *Tropical Agriculture, Trinidad*, 46, 81-90.
- CHERRETT J.M., 1972. - Some factors involved in the selection of vegetable substrate by *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera : Formicidae) in tropical rain forest. *J. Anim. Ecol.*, 41, 647-660.
- CHERRETT J.M., 1980. - Possible reasons for the leaf-cutting ant fungus symbiosis. *Colloque sur les Insectes Sociaux. (IUSSI - Section Française). Marseille - Sénanque* 1980.
- CHERRETT J.M. & SIMS B.G., 1968. - Some costings for leaf cutting ant damage in Trinidad. *J. Agric. Soc.*, 313-322.
- CLEVELAND L.R., 1925. - The feeding habit of termite castes and its relation to their intestinal flagellates. *Bull. Woods Hole*, 48, 295-308.
- COCHRANE V.W., 1958. - *Physiology of Fungi*. John Wiley and Sons, New York.
- CORNELIUS C., DANDRIFOSSE G. & JEUNIAUX C., 1975. - Biosynthesis of chitinase by mammals of the order Carnivora *Bioch. System.* 3, 121-122.
- CRAMER H.H., 1967. - *Plant protection and world crop production*. Bayer Pflanzenschutz, Leverkusen. 523 p.
- CREWE R.M. & BLUM M.S., 1972. - Alarm pheromones of the *Attini*, their phylogenetic significance. *J. Insect Physiol.*, 18, 31-42.
- DAHLMAN D.L., 1971. - Purification and properties of trehalase from tobacco hornworm larvae. *J. Insect Physiol.*, 17, 1677-1687.
- DECHARME M., 1978. - *Contribution à la connaissance de Leucocoprinus gongylophorus (MOELLER) (HEIM), champignon symbiote de la fourmi Acromyrmex octospinosus (REICH)*. D.E.A. de cytologie et morphogénèse végétal. Univ. de Paris VI. 68 p.
- DECHARME M., 1980. - *Les champignons symbiotes de quelques fourmis attines. Différents aspects de leur cytologie et de leur évolution dans la meule*. Thèse de 3ème cycle. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 104 p.
- DELAGE B., 1966. - Sur une fonction particulière des glandes pharyngiennes des fourmis. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 262, 1743-1744.
- DELAGE B., 1968. - Recherches sur les fourmis moissonneuses du Bassin Aquitain : Ethologie, physiologie de l'alimentation. *Ann. Sci. Nat., (Zoologie) Série 12*, 10, 195-265.

- DELAGE DARCHEN B., 1976. - Les glandes post-pharyngiennes des fourmis. Connaissances actuelles sur leur structure, leur fonctionnement leur rôle. *Ann. Biol.*, 15, 63-76.
- DEVERALL B.J., 1976. - Biochemical aspects of plant parasitic relationships. In : J. Friend & Threlfall *Current Perspectives in Research on Phytoalexines*. Acad. Press. p. 208-228.
- DIXON M. & WEBB E.C., 1958. - *Enzymes*. Longmans Green, London.
- DROSTE H.J. & ZEBE E., 1974. - Carbohydrasen und Kohlenhydratverdauung im Darmtrakt von *Locusta migratoria*. - *J. Insect Physiol.*, 20, 1639-1657.
- DUVE H., 1972. - Purification and properties of trehalase isolated from the blowfly *Calliphora erythrocephala*. - *Insect Biochem.*, 2, 445-450.
- ECHOLS H.W., 1966. - Assimilation and transfer of Mirex in colonies of Texas leaf-cutting ants. *J. Econ. Entomol.*, 59, 1336-1338.
- EIDMANN H., 1935. - Zur Kenntnis der Blattschneiderameise *Atta sexdens* L. insbesondere ihrer Ökologie. *Zeitschrift für angewandte Entomologie*, 22, 185-241, 385-436.
- EISNER T., 1957. - A comparative morphological study of the proventriculus of ants (*Hymenoptera, Formicidae*). *Bull. Mus. Comp. Zool.*, 116, 439-490.
- EISNER T. & HAPP G.M., 1962. - The infrabuccal pocket of a Formicine ant : a social filtration device. *Psyche*, 69, 107-116.
- ESCHERICH K., 1929. - Einige Notizen über die Lebensweise, wirtschaftliche Bedeutung und Bekämpfung der Blattschneiderameise (*Atta*). *Zoologischer Anzeiger*, 82, 185-197.
- FENNAH R.G., 1950. - Parasol ants, their life history and methods for their control. *Proceedings of the Agricultural Society of Trinidad and Tobago, Supplement by the Department of Agriculture*. 17 pages.
- FENNY P.F., 1968. - Effect of oak leaf tannins on larval growth of the winter moth *Operophtera brumata*. - *J. Insect Physiol.*, 14, 805-817.
- FENNY P.F., 1970. - Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology*, 51, 565-581.
- FERRAN A., BIGLER R. & LYON J.P. 1976. - Etude des activités enzymatiques des glandes salivaires et des intestins de trois insectes prédateurs de pucerons : *Chrysopa carnea* Steph., *Chrysopa perla* (Névroptères, *Chrysopidae*) et *Semiadalia 11 Notata* Sch. (Coleoptères, *Coccinellidae*). *Ann. Zool. Ecol. anim.*, 8, 513-521.

- FINDLAY J. & LEVY G.A., 1960. - Purification of β -N-acetylglucosaminidase from the pig epididymis. *Biochem. J.*, 77, 170-175.
- FLORKIN M., 1957. - Sur l'origine des cellulases et des chitinases animales. *Proc. Intern. Symp. Enzyme Chem. Tokyo and Kyoto*, 390-391.
- FORBES J. & Mc FARLANE A.M., 1961. - The comparative anatomy of digestive glands in the female castes and the males of *Camponotus pennsylvanicus* (DE GEER) (Formicidae; Hymenoptera). *Journal of the New York Entomological Society*, 69, 92-103.
- GARLING L., 1979. - Origin of ant fungus mutualism: a new hypothesis. *Biotropica*, 11, 284-291.
- GARRETT S.D., 1950. - Ecology of the root inhabiting fungi. *Biol. Rev.* 25, 220-254.
- GEIGER B., BEN YOSEPH Y. & ARNON R., 1974. - Purification of human hexosaminidases A and B by affinity chromatography. *F.E.B.S. Letters*, 45, 276-281.
- GILBY A.R., WYATT S.S. & WYATT G.R., 1967. - Trehalases from the cockroach, *Blaberus discoidalis*: activation solubilization and properties of the muscle enzyme and some properties of the intestinal enzyme. *Acta Biochem. pol.* 14, 83-100.
- GILSON E., 1894. - Recherches chimiques sur la membrane cellulaire des champignons. *Bull. Soc. Chim. Paris*, 3, 1099.
- GORIN P.A. & SPENCER J.F.T., 1968. - Structural chemistry of fungal polysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 23, 367-417.
- GRAF I., 1964. - Untersuchungen zur *Formica* physiologie von *Formica polyctena* Foerst. *Experientia*, 20, 330-331.
- GRASSE P.P., 1951. - *Traite de Zoologie*. Masson Ed. Tome 10, Fascicule II, 972 pp.
- HALL H.S. & HINKES T.M., 1973. - Air suspension encapsulation of moisture-sensitive particles using aqueous systems. In: J.E. VANDEGAER Ed. *Microencapsulation*. Plenum Press, New York and London, 145-153.
- HANSEN BAY C.M., 1978. - The secretion and action of the digestive enzymes of the salivary glands of the blowfly, *Calliphora*. - *J. Insect Physiol.*, 24, 141-149.
- HAYASHI M., 1965. - Histochemical demonstration of N-acetyl- β -D-glucosaminidase employing naphthol AS-BI N-acetyl- β -glucosaminide as substrates. *J. Histochem. Cytochem.*, 13, 355-360.

- HERVEY A. & NAIR M.S.R., 1979. - Antibiotic metabolite of a fungus cultivated by gardening ants. *Mycologia*, 71, 1064-1066.
- HESSE P.R., 1957. - Fungus combs in termite mounds. *E. Afr. Agric. J.*, 23, 104-105.
- HODGMAN C.D., WEAST R.C., SHANKLAND R.S. & SELBY S.M. 1959. - *Handbook of Chemistry and Physics*. Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland.
- HODGSON E.S., 1955. - An ecological study of the behaviour of the leaf cutting ant *Atta cephalotes*. - *Ecology*, 36, 293-304.
- HORTON D. & WOLFROM M.L., 1963. - *Comprehensive Biochemistry*. Volume 5, Carbohydrates, VII, 189-231. M. Florkin & E.H. Stotz, Eds., Elsevier New York.
- HOUSE H.L., 1974. - Nutrition - Digestion In : M. ROCKSTEIN, ed., *The Physiology of Insecta*. Vol., 5, Academic Press New York, 1-117.
- HUBERT J., 1905. - Über die Koloniengründung bei *Atta sexdens*. - *Biol. Zdl.*, 25, 606-619, 625-635.
- HUBER R.E. & LEFEBVRE Y.A., 1971. - The purification and some properties of soluble trehalase and sucrase from *Drosophila melanogaster*. - *Can. J. Biochem.*, 49, 1155-1164.
- IHERING H. Von., 1898. - Die Anlage neuer Colonien und Pilzgarten bei *Atta sexdens*. *Zool. Anz.*, 21, 238-245.
- IMOTO T., JOHNSON L.N., NORTH A.C.T., PHILLIPS D.C. & RUPLEY J.A., 1972. - Vertebrate lysozymes. In : *The Enzymes*. P.D. Boyer, Ed., VII, 21, 665-868.
- ISHAAYA I. & YABLONSKI S., 1978. - Studies of the trehalase activity in eggs of the egyptian cotton worm, *Spodoptera littoralis*. - *Insect Biochem.*, 8, 81-85.
- ISHAY J. & IKAN R., 1968. - Food exchange between adults and larvae in *Vespa orientalis* F. - *Anim. Behav.*, 16, 298-303.
- JANET C., 1895. - Etudes sur les fourmis. 8ème note. Sur l'organe de nettoyage tibiotarsien de *Myrmica rubra* L. race *levinodis* Nyl. *Ann. Soc. Ent. Fr.*, 63, 691-704.
- JANET C., 1905. - *Anatomie de la tête du Lasius niger*. Ducourtieux & Gout, Limoges, 5 pls., 2 figs.
- JÉRONIAUX C. 1950. - Recherche de la chitinase dans les tissus glandulaires digestifs de l'escargot ("*Helix pomatia*"). *Archives Internationales de Physiologie*, 3, 354-355.

- JEUNIAUX C., 1954. - Sur la chitinase et la flore bactérienne intestinale des Mollusques Gastéropodes. *Mem. Acad. Roy. Belg. Class. Sci.*, 28, 5-45.
- JEUNIAUX C., 1961. - Activité chitinolytique de l'hémolymphe de *Bombyx mori* L. au cours des métamorphoses. *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, 69, 750-751.
- JEUNIAUX C., 1963. - *Chitine et chitinolyse*. Masson, Paris.
- JEUNIAUX C., 1967. - Chitinases. In : "*Methods in enzymology*", 8, 644-650.
- KARRER P. & HOFFMANN A., 1929. - Polysaccharides. XXXIX. Enzymic degradation of chitin and chitosan. *Helv. Chim. Acta.*, 12., 616-637.
- KENNARD C.P., 1965. - Control of leaf cutting ants (*Atta* spp.) by fogging. *Experimental Agriculture*, London, 1, 237-240.
- KERMARREC A., 1975. - Etude des relations synécologiques entre les nématodes et la fourmi manioc : *Acromyrmex octospinosus* (REICH). *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, 7, 27-44.
- KERMARREC A., MALATO G. & FEBVAY G., 1977. - Données nouvelles sur l'invasion de la Guadeloupe par *Acromyrmex octospinosus* REICH. (*Formicidae, Attini*). II Bases éthologiques et physiologiques d'un contrôle intégré. *Nouv. Agron. Antilles Guyane*, 3, 486-492.
- KIMURA S., 1974. - The β -N-acetylglucosaminidases of *Bombyx mori* L.- *Comp. Biochem. Physiol.*, 49 B, 345-351.
- KIMURA S., 1976a. - Insect haemolymph exo- β -N-acetylglucosaminidase from *Bombyx mori*. Purification and properties. *Biochem. Biophys. Acta*, 446, 399-406.
- KIMURA S., 1976b. - The chitinase system in the cuticle of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 6, 479-482.
- KIMURA S., 1977. - Exo- β -N-acetylglucosaminidase and chitobiase in *Bombyx mori*. - *Insect Biochem.*, 7, 237-245.
- KONIG J.C., 1779. - Naturgeschichte dersog - Wessein Ameisen. *Beschr. der Berlin gesellschaft naturforsch. Freunde*, IV, 1-28.
- KOTHS J.S. & GUNNER H.B. 1967. - Establishment of a rhizosphere microflora on carnation as a means of plant protection in steamed greenhouse soils. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 91, 617-626.
- LAMY J., LAMY J., COMPIN S. & WEILL J. 1971. - Aspects théoriques et pratiques des nouvelles méthodes d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient de pH et gradient de porosité. *Ann. Biol. clin.* 29, 125-143.

- LASSAIGNE J.L., 1843. - Sur le tissu tégumentaire des Insectes de différents ordres. *Comp. Rend.*, 16, 1087-1089.
- LEDDERHOSE G., 1878. - Über Chitin und seine Spaltung-produkte. *Hoppe-Seiler Z. Physiol. Chem.*, 2, 213-227.
- LEE E.Y.C. & WHELAN W.J., 1971. - *The enzymes*. Volume V : *Hydrolysis, Hydratation*. 7, 192-234. P.D. Boyer, Ed., Academic Press, New York - London.
- LEHMANN J., 1974. - Ist der Nahrungspilz der Pilzzuechenchen Blattschneise der Ameisen und termiten ein *Aspergillus* ? - *Waldhygiene*, 10, 8, 252-255.
- LEHMANN J., 1976. - Neue Erkenstrüsse über die Nahrungspilze von *Attini* (*Myrmicinae*, *Hymenoptera*) und *Macrotermitinae* (*Isoptera*). - *Waldhygiene*, 11, 5, 133-152.
- LEVIN D.A., 1976. - The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 7, 121-159.
- LILLY V.G., 1965. - Chemical constituents of the fungal cell. I Elemental constituents and their roles. *fungi*. Vol. I, G.C. Ainsworth & A.S. Sussman, Ed. Academic Press, New York, pp. 163-177.
- LINEWEAVER H. & BU K D., 1934. - The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.*, 56, 658-666.
- LITTLE C.H., JUSTUM A.R. & CHERRETT J.M. 1977. - Leafcutting ant control. The possible use of growth regulating chemicals. *Congrès IUSSEI, Wageningen*, 1977, 89-90.
- LITTLEDYKE M. & CHERRETT J.M., 1976. - Direct ingestion of plant sap from cut leaves by leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (REICH) (*Formicidae* ; *Attini*). *Bull. Ent. Res.*, 66, 205-217.
- LOWRY D.H., ROSEBROUGH J., FARR A.L. & RANDALL R.J., 1951. - Protein measurement with phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- LUSCHER M., 1976. - *Phase and caste determination in Insects. Endocrine aspects*. Pergamon Press, 130 p.
- LYSENKO O., 1976. - Chitinase of *Serratia marcescens* and its toxicity to Insects. *Journal of Invertebrate Pathology*. 27, 385-386.
- MALATO G. & KERMARREC A., 1976. - Problèmes posés par la lutte chimique contre la fourmi-manioc *Acromyrmex octospinosus* REICH. *Nouv. Agron. Antilles Guyane*, 2, 3, 193-210.
- MALATO G., KERMARREC A. & TROUP J.M., 1977. - Données nouvelles sur l'invasion de la Guadeloupe par *Acromyrmex octospinosus* REICH. (*Formicidae*, *Attini*). I. Aspects biogéographiques et perspectives de contrôle chimique. *Nouv. Agron. Antilles Guyane*, 3, 473-485.

- MARICONI F.A.M., 1970. - *As Sauvas*. Editora Agronômica, "Ceres", São Paulo, 167 pages.
- MARTIN M.M., 1974. - Biochemical ecology of the attine ants. *Acc. Chem. Res.*, 7, 1-5.
- MARTIN M. M., Mac CONNELL J.G. & GALE G.R., 1969a. - The chemical basis for the attine ant fungus symbiosis. Absence of antibiotics. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 62, 386-388.
- MARTIN M.M., CARMAN R.M. & Mc CONNELL J.G., 1969b. - Nutrients derived from the fungus cultured by the fungus growing ant *Atta colombica tonsipes*. - *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 62, 11-13.
- MARTIN M.M. & WEBER N.A., 1969. - The cellulose utilizing capability of the fungus cultured by the attine ant *Atta colombica tonsipes*. - *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 62, 1386-1387.
- MARTIN M.M. & MARTIN J.S., 1970a. - The biochemical basis for the symbiosis between the ant, *Atta colombica tonsipes* and its food fungus. *J. Insect Physiol.*, 16, 109-119.
- MARTIN M.M. & MARTIN J.S., 1970b. - The presence of protease activity in the rectal fluid of attines ants. *J. Insect Physiol.*, 16, 227-232.
- MARTIN M.M. & MARTIN J.S., 1971. - The presence of protease activity in the rectal fluid of primitive attine ants. *J. Insect Physiol.*, 17, 1897-1906.
- MARTIN M.M., GIESELMANN M.J. & MARTIN J.S., 1973. - Rectal enzymes of attine ants : α amylase and chitinase. *J. Insect Physiol.*, 19, 1409-1416.
- MARTIN M.M., BOYD N.D., GIESELMANN M.J. & SILVER R.G., 1975. - Activity of faecal fluid of a leaf cutting ant toward plant cell wall polysaccharides. *J. Insect Physiol.*, 21, 1887-1892.
- MARTIN M.M., GIESELMANN M.J. & MARTIN J.S., 1976. - The presence of chitinase in the digestive fluids of ants., *Comp. Biochem. Physiol.*, 53A, 331-332.
- MASCHWITZ U., 1965. - Larven als Nahrungsspeicher im Wespenvolk (Ein Beitrag zum Trophallaxieproblem). *Vehr. dt. Zool. Ges.*, 50, 530-534.
- MASCHWITZ U., 1966. - Das Speichelsekret der Wespenlarven und seine Biologische Bedeutung. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 53, 228-252.
- MASCHWITZ U., KOOB K. & SCHILDKNECHT H., 1970. - Ein Beitrag zur Funktion der Metathoracaldrüse der Ameisen. *J. Insect Physiol.*, 16, 387-404.

- MATTHEWS J.R., DOWNER R.G. & MORISSON P.E., 1976. - α glucosidase activity in haemolymph of the american cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.*, 22, 157-163.
- MATTSON W.J., 1980. - Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 11, 119-161.
- MEGA T., IKENAKA T. & MATSUSHIMA Y., 1972a. - Studies on N-acetyl- β -D-glucosaminidase of *Aspergillus oryzae*. 3 - Transglycosylation by the enzyme and preparation of crystalline phenyl N,N'-diacetyl- β -chitobioside. *J. Biochem.*, 75, 1197-1203.
- MEGA T., IKENAKA T. & MATSUSHIMA Y., 1972b. - Studies on N-acetyl- β -D-glucosaminidase of *Aspergillus oryzae*. 4 - acceptor specificity and quantitative representation of the transglycosylation reaction. *J. Biochem.*, 72, 1391-1396.
- MICHA J.C., DANDRIFOSSE G. & JEUNIAUX C., 1973. - Distribution et localisation tissulaire de la synthèse des chitinases chez les Vertébrés inférieurs. *Arch. Int. Physiol. Bioch.*, 81, 439-451.
- MICHA J.C., DANDRIFOSSE G. & JEUNIAUX C., 1973. - Activité des chitinases gastriques des Reptiles en fonction du pH. *Arch. Int. Physiol. Bioch.*, 81, 629-637.
- MILLER M.W., 1961. - *The Pfizer Handbook of Microbial Metabolites*. Mc Graw Hill, New York.
- MOELLER A., 1893. - Das Pilzgarten einiger südamerikanischer Ameisen. *Botanische Mitth. aus den Tropen*, 6, 1-127.
- MONGET D., 1978. - *Mise au point d'une microméthode de mesure d'activités enzymatiques (Apizym)*. Thèse de docteur-ingénieur, Univ. Claude Bernard Lyon I. 152 p.
- MONREAL J. & REESE E.T., 1969. - The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.*, 15, 689-696.
- MORRISSEY R.F., DUGAN E.P. & KOTHS J.S. 1976. - Chitinase production by an *Arthrobacter* sp. lysing cells of *Fusarium roseum*. - *Soil Biol. Biochem.*, 8, 23-28.
- MOSER J.C., BROWNLEE R.C. & SILVERSTEIN R. 1968. - Alarm pheromones of the ant : *Atta texana*. - *J. Insect Physiol.*, 14, 529-535.
- MULLER F., 1874. - The habits of various insects. *Nat. Lond.*, 10, 102-103.
- MUZZARELLI R.A.A. 1977. - *Chitin*. Pergamon Press, 309 pages.

- NARDON P., MONGET D., DIDIER-FICHET M.L. & de THE G., 1976. - Comparison of zymogram of three lymphoblastoid cell lines with a new micro-technique. *Biomedicine*, 24, 183-190.
- NICKEL J.L., 1958. - Agricultural insects of the Paraguayan Chaco. *Journal of Economic Entomology*, 51, 633-637.
- NOELTING G. & BERNFELD P., 1948. - Sur les enzymes amylolytiques. III La β -amylase : Dosage d'activité et contrôle de l'absence d' α -amylase. *Helv. chim. Acta*, 31, 289-290.
- ODIER A., 1823. - Mémoire sur la composition chimique des parties cornées des Insectes. *Mém. Soc. Hist. nat., Paris*, 1, 29-42.
- OTAKARA A., 1964. - Studies on the chitinolytic enzymes of blackkoji mold. 4 - Isolation and some properties of N-acetyl- β -glucosaminidase. *Agr. Biol. Chem.*, 28, 745-751.
- PANT R. & MORRIS I.D., 1974. - Variation in trehalase activity in the fat body, intestine and haemolymph of *Philosamia ricini* (erisilk-worm) during development. *Experientia*, 30, 145-146.
- PAPARO K.C., 1972. - A comparison of the digestive systems and associated glands of two leaf-cutter ants, *Atta cephalotes* L. and *Acromyrmex octospinosus* (REICH). Thesis. Fordham University, 115 p.
- PASTEL J., PAPA J. & KERMARREC A., 1980. - Présence d'*Acromyrmex moel-lerius landolti* (FOR.) (Hymenoptera, Myrmicinae) en Guyane française. *Caribbean Plant Protection*, IX, 3.
- PAULSEN R., 1969. - Zur Funktion der Propharynx, Postpharynx und Labialdrüsen von *Formica polycetena* Först. (Hymenoptera, Formicidae). Fakultät Würzburg, 90 p.
- PAULSEN R., 1971. - Characterisation of trehalase from labial glands of ants (*Formica polycetena*). *Arch. Biochem. & Biophys.*, 142, 170-176.
- PEREGRINE D.J., PERCI M.C. & CHERRETT J.M., 1972. - Intake and possible transfer of lipid by the post pharyngeal glands of *Atta cephalotes* (L.). *Entomol. exp. appl.*, 15, 248-249.
- PEREGRINE D.J., MUDD A. & CHERRETT J.M., 1973. - Anatomy and preliminary chemical analysis of the post-pharyngeal glands of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (REICH) (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes sociaux*, 20, 355-363.
- PEREGRINE D.J. & MUDD A., 1974. - The effect of diet on the composition of the post-pharyngeal glands of *Acromyrmex octospinosus* (REICH). *Insectes sociaux*, 21, 417-424.
- PILAT R. & USAK O., 1958. - *Mushrooms*. Spring Books, London.
- PLANTEVIN G. & NARDON P., 1972. - Utilisation d'une microméthode de détection (Auxotab) pour la recherche qualitative d'activités enzymatiques dans les tissus d'Insectes. Tube digestif. *Ann. Zool. Ecol. anim.*, 4, 229-248.

- POTT G., SCHNEIDER M. & GERLACH U., 1978. - Demonstration of isoenzymes of N-acetyl- β -glucosaminidase by electrofocusing in thin layers of polyacrylamide gel. *Science Tools*, 25, 67-69.
- POWNING R.F. & IRZYKIEWICZ H., 1964. - β -N-acetylglucosaminidase in the cockroach (*Periplaneta americana*) and the puffball (*Lycoperdon perlatum*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 12, 405-415.
- POWNING R.F. & IRZYKIEWICZ H., 1965. - Studies on the chitinase system in bean and in other seeds. *Comp. Biochem. Physiol.*, 14, 127-133.
- PREVOT A.R., 1970. - *Humus. Biogénèse-Biochimie-Biologie*. Edition de la Tourelle, 94 St Mandé, 342 p.
- PROUDFIT F.T. & ROBINSON C.H., 1961. - *Normal and Therapeutic Nutrition* Mc Millan, New York.
- PUGH D., LEABACK D.H. & WALKER P.G., - 1957. - Studies on glucosaminidase. N-acetyl- β -glucosaminidase in rat-kidney. *Biochem. J.*, 65, 464-469.
- PUGH D. & WALKER P.G., 1961. - The localization of N-acetyl- β -glucosaminidase in tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 9, 242-250.
- PURCHASE E.R. & BRAUN C.E., 1946. - D-glucosamine hydrochloride. *Org. Synth.*, 26, 36-37.
- QUINLAN R.J. & CHERRETT J.M., 1977. - The role of substrate preparation in the symbiosis between the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (REICH) and its food fungus. *Ecol. Entomol.*, 2, 161-170.
- QUINLAN R.J. & CHERRETT J.M., 1978. - Studies on the role of the infra-buccal pocket of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (REICH) (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes sociaux*, 25, 237-245.
- QUINLAN R.J. & CHERRETT J.M., 1979. - The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecol. Entomol.*, 4, 151-160.
- RATAULT C. & VEY A., 1977. - Production d'estérase et de N-acétyl- β -D-glucosaminidase dans le tégument du coléoptère *Oryctes rhinoceros* par le champignon entomopathogène *Metarrhizium anisopliae*. *Entomophaga*, 22, 289-294.
- REISSIG J.L., STROMINGER J.L. & LELQIR L.F., 1955. - A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugar. *J. Biol. Biochem.*, 217, 959-966.
- REYES F., LAHOZ R. & CORNAGO P., 1977. - Autolysis of *Neurospora crassa* in different culture conditions and release of β -N-acetylglucosaminidase and chitinase. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 68, 357-361.

- RICK W. & STEGBAUER H.P., 1974. - α Amylase. *Methods of enzymatic analysis*. H.U. Bergmeyer, Ed., Academic Press New York. San Francisco. London, 2, 885-890.
- RICKS B.L. & VINSON S.B., 1972. - Digestive enzymes of the imported fire ant, *Solenopsis richteri* (Hymenoptera, Formicidae). *Ent. exp. & appl.*, 15, 329-334.
- RILEY R.G., SILVERSTEIN R.M., CARROLL B. & CARROLL R., 1974. - Methyl 4-Methyl pyrrole-2-Carboxylate a volatile trail pheromone from the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. - *J. Insect Physiol.*, 20, 651-664.
- ROBINSON D. & STIRLING J.L., 1968. - N-acetyl- β -glucosaminidases in human spleen. *Biochem. J.*, 107, 321-327.
- SCHADE F.H., 1973. - *The ecology and control of the leaf-cutting ants of Paraguay*. Paraguay Ecological Essays. J.R. Gorham, Ed., Academy of the Ants and Sciences of the Americas, Miami, Florida 296 p.
- SCHILDKNECHT H. & KOOB K., 1970. - Plant bioregulators in the methathoracic glands of myrmicine ants. *Angewandte Chemie*, 9, 173.
- SCHILDKNECHT H. & KOOB K., 1971. - Myrmicacin, das erste Insekten-Herbizid. *Angewandte Chemie*, 10, 124-125.
- SCHILDKNECHT H., REED P.B., REED F.D. & KOOB K., 1973. - Auxin activity in the symbiosis of leaf-cutting ants and their fungus. *Insect Biochem.*, 3, 439-442.
- SHIMADA S., KAMADA A. & ASANO S., 1980. - The cocoon trehalase of the silkworm, *Bombyx mori*. - *Insect Biochem.*, 10, 49-52.
- SINGER R., 1961. - *Mushrooms and Truffles*. Interscience, New York.
- SNODGRASS R.E., 1935. - *Principles of insect morphology*. Mc Graw-Hill, Book. Company Inc. New York and London. 667 p.
- SNODGRASS R.E., 1942. - The skeleton - muscular mechanism of the honeybee. *Smiths. Misc. coll.*, 103, 1-120.
- SPINDLER K.D., 1976. - Initial characterization of chitinase and chitobiose from the integument of *Drosophila hydei*. - *Insect Biochem.*, 6, 663-667.
- SRIVASTAVA S.K., AWASTHI Y.C., YOSHIDA A. & BEUTLER E., 1974a. - Studies on human β -D-Nacetylhexosaminidases. I - Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 249, 2043-2048.
- SRIVASTAVA S.K., AWASTHI Y.C., YOSHIDA A. & BEUTLER E., - 1974b. - 2 - Kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.*, 249, 2049-2053.

- STAHEL G. & GEIJSKES D.C., 1940. - Observation about temperature and moisture in *Atta* nests. *Rev. de Entomol.*, 11, 766-775.
- TALBOT B.G. & HUBER R.E., 1975. - Partial purification, stabilization and characterization of adult honey bee midgut trehalase and a new trehalase specific disc gel stain method. *Insect Biochem.*, 5, 337-347.
- TANAKA M., KYOSAKA S. & SEKIGUCHI Y., 1977. - Effect of substituents on the hydrolysis of substituted phenyl acetylglucosaminides by bovine liver β -acetylglucosaminidase. *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 3144-3148.
- THATCHER F.S., 1954. - Foods and feeds from fungi. *Annual Review of Microbiology*, 8, 449-472.
- THOMA J.A., SPRADLING J.E. & DYGERT S., 1971. - *The enzymes. Plant and Animal Amylases*. P.D. Boyer, Ed., Academic Press, New York and London, V, 6, 115-189.
- TORREGROSSA J.P., FEBVAY G. & KERMARREC A., - The larval instars of the worker caste in the attine ant, *Acromyrmex octospinosus* (REICH) (Hymenoptera, Formicidae). - Sousmis à *Colemania*.
- TOWNSEND C.H.T., 1923. - Um inseto de um bilhão de dólares e sua eliminação. A formiga saúva. *Almanaque Agrícola Brasileiro, São Paulo*. 12, 253-254.
- TRACEY M.V., 1955. - Chitinase in some Basidiomycetes. *Biochim. J.*, London, 61, 579-586.
- TRACEY M.V. & YOUATT G., 1958. - Cellulase and chitinase in two species of australian termites. *Enzymologia*, 19, 70-72.
- TROPPIAIR., 1973. - *Doctoral thesis*. University of Rio Claro. São Paulo, Brasil.
- TROUP J.M., 1975. - *Vingt ans de lutte contre la fourmi manioc en Guadeloupe*. Rapport d'activité du Service de la Protection des Végétaux, Jardin d'essais, Abymes. 97110 Pointe-à-Pitre.
- VANDEGAER J.E., 1973. - Encapsulation by coacervation. In : *Microencapsulation*. J.E. Vandegaer, Ed., Plenum Press, New York - London, 21-37.
- VEIDKAMP H., 1957. - Aerobic decomposition of chitin by microorganisms. *Mededel. Landbouwhogeschool Wageningen*, 55, 127-174.
- WALKER P.G., WOOLEN J.W. & HEYWORTH R., 1961. - Studies on glucosaminidase, 5. Kidney N-acetyl- β -glucosaminidase and N-acetyl- β -galactosidase. *Biochem. J.*, 79, 288-294.
- WATERHOUSE D.F., HACKMAN R.H. & Mc KELLAR J.W., 1961a. - An investigation of chitinase activity in cockroach and termite extracts. *J. Ins. Physiol.*, 6, 96-112.

- WATERHOUSE D.F. & Mc KELLAR J.W., 1961b. - The distribution of chitinase activity in the body of the american cockroach. *J. Ins. Physiol.*, 6, 185-195.
- WEBER N.A., 1938. - The biology of the fungus growing ants. Part. III. The sporophore of the fungus grown by *Atta cephalotes* and a review of reported sporophores. *Revista de entomologia, Rio de Janeiro*, 8, 265-272.
- WEBER N.A., 1956. - Treatment of substrate by fungus growing ants. *Anatomical Record*, 125, 604-605.
- WEBER N.A., 1957. - Fungus growing ants and their fungi : *Cyphomyrmex costatus*. *Ecol.*, 38, 480-494.
- WEBER N.A., 1958. - Evolution in fungus growing ants. *Proc. 10th Int. Congr. Entomol. Montreal*. 2, 459-474.
- WEBER N.A., 1966. - Fungus growing ants. *Science*, 153, 587-604.
- WEBER N.A., 1972. - Gardening ants. The Attines. *Memoirs of the American Philosophical Society*, 92, 1-146.
- WHEELER W.M., 1907. - Fungus growing ants of North America. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, 23, 669-807.
- WHEELER W.M., 1910. - *Ants*. Columbia University Press. New York and London. 663 p.
- WHEELER G.C. & WHEELER J., 1976. - Ant larvae : review and synthesis. *Mem. Entomol. Soc. Washington*, 7, 108 p.
- WHITAKER D.R., 1951. - Studies in the biochemistry of cellulolytic microorganisms. I : Carbon balances of wood-rotting fungi in surface cultures. *Canadian Journal of Botany*, 29, 159-175.
- WICKER C., 1979. - *La symbiose chez Sitophilus oryzae L. : Etude de la régulation génétique et épigénétique de la P-N-acétylglucosaminidase*. Thèse de 3ème cycle. Univ. de Dijon. 156 p.
- WINICUR S. & MITCHELL H.K., 1974. - Chitinase activity during *Drosophila* development. *J. Insect Physiol.*, 20, 1795-1805.
- WILSON E.O., 1974. - *The insect societies*. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge ; Massachusetts. 527 p.
- WILSON E.O., CARPENTER F.M. & BROWN W.L., 1967. - The first mesozoic ants. *Science*, 157, 1038-1040.

- WOOLEN J.W., HEYWORTH R. & WALKER P.G., 1961. - Studies on glucosaminidase. 3 - Testicular N-acetyl- β -glucosaminidase and N-acetyl- β -galactosaminidase. *Biochem. J.*, 78, 111-116.
- WOOLEN J.W., WALKER P.G. & HEYWORTH R., 1961. - 6-N-acetylglucosaminidase and N-acetyl- β -galactosaminidase activities of a variety of enzyme preparations. *Biochem. J.*, 79, 294-298.
- WUST M., 1973. - Stomodeale und Protodeale Sekrete von Ameisen-larven und ihre biologische Bedeutung. *Proceedings, VIIth International Congress of the U.I.S.S.I. London, 10-15 Sept. 1973*, 412-417.
- WYATT G.R., 1967. - The biochemistry of sugar and polysaccharides in Insects. *Adv. Insect Physiol.*, 4, 287-360.
- YAMASHITA O., SUMIDA M. & HASEGAWA K., 1974. - Developmental changes in mid-gut trehalase activity and its localization in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 20, 1079-1085.
- YEM D.W. & WHU H.C., 1976a. - Purification and properties of β -N-acetylglucosaminidase from *Escherichia coli*. - *J. Bacteriol.*, 125, 324-331.
- YEM D.W. & WHU H.C., 1976b. - Isolation of *Escherichia coli* K-12 mutants with altered levels of β -N-acetylglucosaminidase. *J. Bacteriol.*, 125, 372-373.
- ZECHMEISTER L. & TOTH G., 1931. - Hydrolysis of chitin with hydrochloric acid. *Ber.* 64-B, 2028-2032.
- ZECHMEISTER L. & TOTH G., 1932. - Hydrolysis of chitin with hydrochloric acid. *Ber.* 65-B, 161-162.
- ZECHMEISTER L. & TOTH G., 1939. - Chromatographic analysis of chitinase. *Naturwissens*, 27, 367.
- ZIELKOWSKI R. & SPINDLER K.D., 1978. - Chitinase and chitobiase from the integument of *Locust migratoria*: characterization and titer during the fifth larval instar. *Insect Biochem.*, 8, 67-71.

