

## CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DU GÈNE *ABDOMINAL A* CHEZ UNE MYRMICINAE : *MYRMICA RUBRA*

NICULITA H. & PETROCHILO E.

*Laboratoire d'Évolution et du Développement, Centre de Génétique Moléculaire,  
bât. 14 A, CNRS, 1 avenue de la Terrasse, F-91198 Gif sur Yvette.*

**Résumé:** La famille des Formicidae présente une étonnante spécialisation des segments abdominaux antérieurs ainsi qu'une variabilité de la morphologie du 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> segment abdominal, souvent spécifique de la sous-famille. Cette importante variabilité morphologique est rarement rencontrée au sein des autres familles d'Hyménoptères et même parmi les autres ordres d'insectes. Des changements morphologiques comparables sont induits par mutation chez un Coléoptère *Tribolium castaneum*, ainsi que chez le Diptère *Drosophila melanogaster*. Ces mutations touchent le gène qui détermine l'identité des segments abdominaux antérieurs chez les insectes : *abdominal A*. La caractérisation de ce locus chez les fourmis présentant les différents types morphologiques permettra de mieux comprendre son rôle dans la morphogénèse de l'abdomen, chez les insectes. Nous présentons ici l'organisation du gène *abdominal A* chez *Myrmica rubra*, ainsi que la séquence de la protéine putative.

**Mots-clés:** *Myrmica rubra*, *abdominal A*, gène sélecteur homéotique, évolution morphologique

**Abstract:** **Molecular characterisation of an *abdominal A* ortholog in *Myrmica rubra*.**

The *Drosophila melanogaster* homeotic gene *abdominal A* is important for developmental decisions in the anterior abdomen. Insects vary considerably with respect to abdominal morphology, and change in the function of homeotic selector gene(s) and / or downstream genes under their control presumably have been important for the evolution of these differences. The abdominal phenotype of Myrmicine ants is suggestive of a natural homeotic transformation much like some phenotypes observed through mutations in the *abdominal A* gene of *Drosophila melanogaster* or in the *abdominal A* ortholog of *Tribolium castaneum*. Here we present the organisation of the *abdominal A* ortholog of *Myrmica rubra* and the sequence of its predicted protein. The predicted protein shares N-terminal sequences with that of *Tribolium castaneum* and with a putative form of the *Drosophila melanogaster* protein.

**Key words:** *Myrmica rubra*, *abdominal A*, homeotic selector gene, morphological evolution

### INTRODUCTION

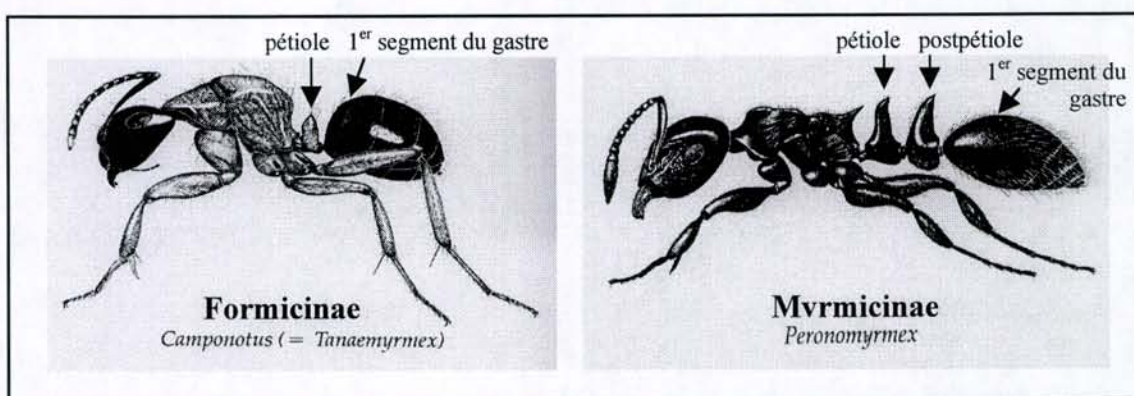
Pendant des siècles, la description et la comparaison des différences morphologiques ont permis de reconstituer l'histoire du vivant. Aujourd'hui, ce sont les mécanismes d'apparition de ces différences qui nous préoccupent et plus précisément les événements génétiques qui leur ont donné naissance.

La famille des Formicidae nous offre l'opportunité d'une telle étude. En effet, une étonnante diversification des segments abdominaux antérieurs est observée au sein de cette famille par rapport aux autres ordres d'insectes. En général peu différenciés, les



segments abdominaux des insectes se définissent par une répétition grossière du 1<sup>er</sup> segment abdominal. Les Hyménoptères aculéate font exception par la fusion du 1<sup>er</sup> segment abdominal avec le thorax et l'apparition d'un étranglement à son extrémité postérieure. Mais, la famille des Formicidae présente en plus de cette caractéristique d'Hyménoptère aculéate, des spécialisations des segments abdominaux 2, 3 et 4, spécifiques à la sous-famille.

Chez toutes les Formicidés, le 2<sup>ème</sup> segment abdominal (A2) est spécialisé en pétiole, de plus, certaines fourmis (les sous-familles des Myrmicinae et Pseudomyrmecinae, les ouvrières de Leptanillinae (Hölldobler et Wilson, 1990a) les ouvrières de certaines espèces de Dorylinae et de certaines espèces d'Ecitoninae (Hölldobler et Wilson, 1990b)) présentent une répétition de cette structure anatomique au niveau du 3<sup>ème</sup> segment abdominal (A3) : le postpétiole (Baroni Urbani, 1988). Ainsi, pour certaines fourmis, le A3 est orienté vers une identité de type pétiolaire (A2) et pour d'autres (comme les Formicinae, Dolichoderinae) vers une identité gastrique (Fig. 1).



**Figure 1.** Exemples de morphologies différentes du 3<sup>ème</sup> segment abdominal (A3) entre les sous-familles : chez les Formicinae, A3 = 1<sup>er</sup> segment du gastre, alors que chez les Myrmicinae, A3 = postpétiole.  
 Examples of different morphologies of the 3<sup>rd</sup> abdominal segment (A3) between subfamilies: in Formicinae, A3 = 1<sup>st</sup> gastral segment or in Myrmicinae, A3 = postpetiole.

Comment peut-on orienter l'identité d'un segment vers un type morphologique ou autre ? Quelle est la base moléculaire d'un tel changement d'identité ?

Chez le Diptère *Drosophila melanogaster*, l'acquisition de l'identité segmentaire a lieu tôt au cours du développement embryonnaire sous l'action des gènes homéotiques. Des mutations induites au niveau de ces gènes se traduisent par un changement d'identité des segments (Lewis, 1978). En ce qui concerne les segments abdominaux 2, 3 et 4 un seul gène homéotique : *abdominal A* est l'acteur majeur de l'orientation de l'identité de ces segments (Busturia et coll., 1989).

La conservation moléculaire du gène *abdominal A*, plus précisément d'un de ses domaines : l'homéoboîte, a été mise en évidence au sein de la classe des insectes. De plus, des analyses génétiques effectuées chez le Coléoptère *Tribolium castaneum* apportent la preuve d'une conservation de la fonction d'*abdominal A* en tant qu'aiguilleur de l'identité des segments abdominaux antérieurs. Un joli exemple est illustré par le phénotype d'un mutant du gène *abdominal A* de *Tribolium castaneum* chez lequel le 3<sup>ème</sup> segment abdominal perd son identité propre de A3 et prend une



identité de 2<sup>ème</sup> segment abdominal, A2 (Stuart et coll., 1993). Le phénotype de ce mutant, induit au laboratoire, rappelle le phénotype sauvage des Myrmicinae : A3 qui a une identité de 1<sup>er</sup> segment gastrique chez les Formicinae, perd cette identité et prend une identité de type pétiolaire A2.

Ces comparaisons morphologiques proposent une corrélation entre l'évolution du locus *abdominal A* et la variabilité morphologique du 3<sup>ème</sup> segment abdominal entre sous-familles de fourmis.

Pour tester cette hypothèse, une caractérisation comparée du locus *abdominal A* d'un point de vue moléculaire et fonctionnel a été entreprise entre une Myrmicinae et une Formicinae. Nous décrivons ici, la caractérisation moléculaire du locus *abdominal A* chez une Myrmicinae : *Myrmica rubra*. La caractérisation moléculaire de ce locus a mis en évidence une organisation simple du gène par rapport à celle de *Drosophila melanogaster*, organisation comparable à celle de *Tribolium castaneum*.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'ADN génomique de *Myrmica rubra* est isolé à partir d'ouvrières grâce au QIAamp tissue kit (QIAGEN). A partir de cet ADN génomique, l'homéoboîte d'*abdominal A* est isolée par PCR avec le couple d'oligonucléotides *Apis mellifera* ayant servi à l'isolement de la région correspondante chez l'abeille (Walldorf et coll., 1989). La séquence ainsi obtenue est utilisée comme sonde lors du criblage d'une banque génomique de *Myrmica ruginodis* (Bigot et coll., 1994). Le clone isolé par cette technique nous fournit la séquence en aval de l'homéoboîte et permet la synthèse d'oligonucléotides *abdominal A* *Myrmica* spécifiques.

Les ARN totaux de *Myrmica rubra* sont extraits d'embryons ainsi que de larves de 1<sup>er</sup> stade (protocole SV Total RNA Isolation System, PROMEGA). Un passage sur billes polyT (DYNAL) permet d'isoler les ARN polyadénylés. Ces ARN polyA sont soumis à une transcription reverse grâce à un oligonucléotide polyT, puis une cassette est liguée à chacune de leurs extrémités (la séquence de l'oligonucléotide polyT ainsi que celle de la cassette sont décrites dans le protocole Marathon de CLONTECH). L'utilisation d'un oligonucléotide *Mr abd-A* spécifique et d'un oligonucléotide spécifique de la cassette permet d'isoler les régions 5' et 3' de la phase codante. Les régions ainsi isolées sont séquencées par séquençage automatique ABI 310.

Une fois toute la phase codante connue, l'utilisation de plusieurs paires d'oligonucléotides à son niveau permet de sonder le gène pour la présence d'introns par PCR comparative sur ADNc et ADN génomique.

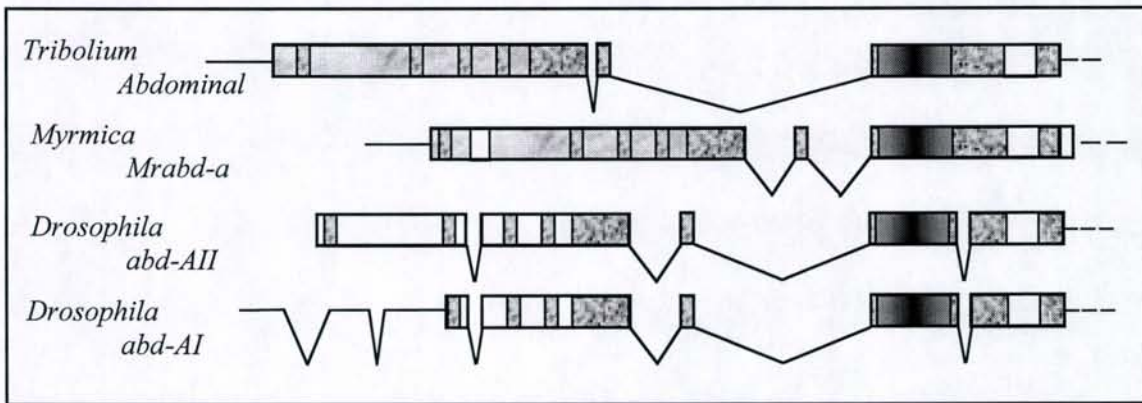
## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Nous avons caractérisé le locus *abdominal A* de *Myrmica rubra* (*Mr abd-A*) comme décrit plus haut. D'une taille de 9 kb, il contient une seule unité de transcription composée de 3 exons et 2 introns. La phase ouverte de lecture code pour une protéine de 407 acides aminés. La présence de ce transcrit a été détecté par PCR dès les stades précoces du développement embryonnaire jusqu'au stade adulte.

Des séquences putatives de la protéine *abdominal A* dans son ensemble ont été proposées pour deux espèces d'insectes seulement : *Drosophila melanogaster* (Karch et coll., 1990 ; Martin et coll., 1995) et *Tribolium castaneum* (Shippy et coll., 1988). La protéine putative *abdominal A* que nous proposons pour *Myrmica rubra* présente une composition en acides aminés comparable à l'homologue *Tribolium castaneum* (*Abdominal*) ou *Drosophila melanogaster* (*abd-A*) ce qui lui confère des propriétés fonctionnelles comparables.



Lors d'une comparaison des séquences en acides aminés des protéines *abdominal A* entre les trois espèces, une conservation de séquence est mise en évidence qui s'étend de part et d'autre de l'homéodomaine (Fig. 2). Un grand degré d'identité (80%) est observé entre les protéines *abdominal A* de *Myrmica rubra* (*Mr abd-A*) et *Tribolium castaneum* (*Abdominal*) sur toute leur longueur ce qui souligne l'importance fonctionnelle de la protéine dans son ensemble. Par contre, une divergence plus importante est notée entre *Myrmica rubra* et *Drosophila melanogaster*, en particulier au niveau du domaine N terminal (60% d'identité entre les deux protéines prises dans leur ensemble). Cette divergence entre la séquence de *Mr abd-A* et *abd-A* fait ressortir la présence de petits motifs conservés de 5 à 6 acides aminés qui témoignent vraisemblablement des régions soumises à une pression fonctionnelle.



**Figure 2.** Organisation du locus *abdominal A* chez *Tribolium*, *Myrmica* et *Drosophila*. Les rectangles correspondent aux exons et les lignes aux introns.

- ▨ Motifs conservés entre les 3 espèces
- ▩ Motifs conservés entre *Tribolium* et *Myrmica*
- ▧ Motif conservé entre toutes les insectes : l'homéoboîte

Organisation of *abdominal A* locus in *Tribolium*, *Myrmica* and *Drosophila*. The exons are shown as open rectangles and the introns as thin black lines

- ▨ Motifs conserved between the 3 species
- ▩ Motifs conserved between *Tribolium* and *Myrmica*
- ▧ Motif conserved between all insects: the homeobox

Une distance évolutive comparable sépare les Hyménoptères des Coléoptères et des Diptères, pourtant la conservation au niveau protéique n'est pas aussi étendue entre *Myrmica rubra* et *Drosophila melanogaster* qu'entre *Myrmica rubra* et *Tribolium castaneum*. S'agit-il de vitesses d'évolution différentes ou de pressions sélectives différentes ? Des études ultérieures menées en particulier chez *Drosophila melanogaster* nous le diront.

La conservation de séquence entre *Myrmica rubra* et *Tribolium castaneum* propose des fonctions comparables pour ces protéines dans les deux organismes. Si l'évolution moléculaire du locus *abdominal A* est impliquée dans l'apparition du post-pétiole chez les Myrmicinae, ce ne serait donc pas des modifications dans la phase codante de la protéine, mais des changements dans sa distribution qui en seraient la cause. Une caractérisation fonctionnelle de la régulation du gène *abdominal A* chez les Myrmicines et chez les Formicines est donc primordiale pour notre étude.

Cette caractérisation peut être poursuivie par une description de l'expression du gène *abdominal A* au cours du développement embryonnaire dans les deux familles de fourmis.



## RÉFÉRENCES

- Baroni Urbani, C., 1988. Phylogeny and behavioral evolution in ants, with a discussion of the role of behaviour in evolutionary processes. *Ethol. Ecol. Evol.* 1: 137-168.
- Bigot, Y., M.H. Hamelin, P. Capy and G. Periquet, 1994. Mariner-like elements in hymenopteran species: insertion site and distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 3408-3412.
- Busturia, A., J. Casanova, E. Sanchez-Herrero, R. Gonzalez and G. Morata, 1989. Genetic structure of the *abd-A* gene of *Drosophila*. *Development* 107: 575-583.
- Karch, F., W. Bender and B. Weiffenbach, 1990. *abdA* expression in *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* 4: 1573-1587.
- Hölldobler, B. and E.O. Wilson, 1990a. The Ants. *Springer-Verlag* fig.16.16 pp.590.
- Hölldobler, B. and E.O. Wilson, 1990b. The Ants. *Springer-Verlag* fig.16.5 pp.578.
- Lewis, E.B., 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 275: 565-570.
- Martin, C.H., C.A. Mayeda, C.A. Davis, C.L. Ericsson, J.D. Knafels, D.R. Mathog, S.E. Celniker, E.B. Lewis and M.J. Palazzolo, 1995. Complete sequence of the bithorax complex of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 8398-8402.
- Shippy, T.D., S.J. Brown and R.E. Denell, 1988. Molecular characterisation of the *Tribolium abdominal A* ortholog and implications for the products of the *Drosophila* gene. *Dev. Genes Evol.* 207: 446-452.
- Stuart, J.J., S.J. Brown, R.W. Beeman and R.E. Denell, 1993. The *Tribolium* homeotic gene *Abdominal* is homologous to *abdominal A* of the *Drosophila* bithorax complex. *Development* 117: 233-243.
- Walldorf, U., F. Richard and W.J. Gehring, 1989. Comparison of homeobox-containing genes of the honeybee and *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 9971-9975.