

## UTILISATION DE MARQUEURS CHIMIQUES ET MOLÉCULAIRES : L'ÉTUDE DES COLONIES PARISIENNES DU TERMITE *RETICULITERMES SANTONENSIS*

**S. Dronnet, P. Uva, J.-P. Christides, A.-G. Bagnères**

Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, CNRS UMR 6035, Université de Tours,  
Faculté des Sciences et Techniques, Parc de Grandmont, 37200 Tours, France.  
E-mail :bagneres@univ-tours.fr, dronnet@univ-tours.fr

### RÉSUMÉ

Dans cette étude sur le termite souterrain *Reticulitermes santonensis*, espèce présente à Paris, nous proposons une double approche méthodologique pour analyser les colonies aux niveaux intra- et inter-colonial. Les profils d'hydrocarbures cuticulaires (HCs) et les microsattellites sont les deux types de marqueurs retenus pour appréhender cette recherche :

- intra-colonial : inférence de la structure reproductive basée sur l'analyse microsattellites des génotypes d'ouvriers en milieu urbain (*F*-statistics, relatedness)
- inter-colonial : discrimination des colonies à l'aide d'une comparaison des données chimiques (HCs, ACP) et génétiques (microsattellites, approche phylogénétique).

### INTRODUCTION

L'espèce de termite souterrain *Reticulitermes santonensis* cause de sérieux dommages en milieu urbain, particulièrement à Paris où elle est connue pour s'attaquer aux bâtiments depuis les années 1950, mais également aux arbres d'alignement des rues adjacentes aux bâtiments infestés, et ceci dans plusieurs arrondissements (Lohou et al., 1997). Identifier les différentes colonies dans les aires infestées, connaître leurs limites physiques et les éventuelles connections entre les colonies s'est avéré nécessaire pour les contrôler d'une manière ciblée et efficace.

Les précédents travaux sur les colonies de *Reticulitermes* ont fait appel à l'utilisation de marqueurs chimiques tels que les hydrocarbures cuticulaires pour étudier les processus de reconnaissance des congénères ou encore la discrimination des castes (Howard, 1978 ; Bagnères et al., 1990, 1998). D'autre part, depuis les travaux de Clément (1986) et Reilly (1987) utilisant les allozymes, de nouveaux marqueurs génétiques moléculaires hautement polymorphes ont permis d'analyser l'organisation sociale et la structure génétique des populations de *Reticulitermes*, tels les microsattellites (Vargo, 2002 ; Dronnet et al., 2002).

Évaluer la structure reproductrice des colonies est aussi important que d'être capable d'identifier les différentes colonies, puisque le mode de reproduction (essaimage, bouturage) et la composition des colonies (présence ou non de nombreux reproducteurs secondaires ou néoténiques, ...) influencent notablement la dynamique de propagation des colonies.

Notre objectif est de présenter des approches méthodologiques pour étudier les colonies de *Reticulitermes santonensis* à deux niveaux : le niveau *intra-colonial*, qui concerne l'inférence de la structure reproductrice des colonies, fait appel aux microsatellites, tandis que le niveau *inter-colonial*, dont l'analyse permet de distinguer les différentes colonies, est abordé par une analyse double, chimique (hydrocarbures cuticulaires) et génétique (microsatellites).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

**Colonies étudiées.** Pour l'analyse au niveau intra-colonial, les ouvriers de *Reticulitermes santonensis* provenant de sept colonies ont été prélevés dans les localités suivantes (les codes d'identification des colonies sont en accord avec Dronnet et al., 2002) :

- 5 colonies parisiennes : 8<sup>ème</sup> arrdt (8C), 13<sup>ème</sup> (13AB et 13C), 17<sup>ème</sup> (Clichy 17A), Créteil (CRE7),
- 2 colonies non-parisiennes : Joué-les-Tours (JO1) (Indre-et-Loire) et Olonnes (OL) (Vendée).

L'analyse au niveau inter-colonial (microsatellites et hydrocarbures cuticulaires) a été basée sur cinq colonies : les trois colonies 8C, 17A, JO1 et deux autres colonies IV1 (Ivry-sur-Seine) et CRE (Créteil).

**Marqueurs microsatellites.** L'ADN génomique a été extrait individuellement pour vingt ouvriers issus de chaque colonie. Les produits amplifiés à cinq loci microsatellites (Vargo, 2000) ont été séparés sur gel de polyacrylamide à l'aide d'un séquenceur d'ADN LiCor. La taille des allèles a été déterminée avec Gene Profiler v4.03 (Scanalytics©).

- *Analyse de la structure reproductrice des colonies.* Les valeurs de parenté ont été calculées avec le programme Relatedness v.5.00 (Queller et Goodnight, 1989). Les écart-types de parenté ont été estimés par jackknife sur tous les loci. Les *F*-statistiques ont été calculées avec Genetic Data Analysis v.1.1 (Lewis et Zaykin, 2000).

- *Discrimination des colonies.* L'approche phylogénétique choisie permet de définir les distances entre les individus sur la base de la proportion des allèles partagés. Les individus sont comparés à chaque locus selon la relation de Lynch (1990) :  $S_{xy} = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$  où  $n_{xy}$  est le nombre de bandes partagées entre les individus  $x$  et  $y$ , et  $n_x$  et  $n_y$  sont les nombres de bandes des individus  $x$  et  $y$  respectivement. La distance génétique entre les individus est ensuite définie selon  $D_{xy} = 1 - S_{xy}$ ,  $D_{xy}$  variant de 0 (toutes les bandes sont partagées) à 1 (aucune bande n'est partagée). Identity v.1.0 (Wagner et Sefc, 1999) a permis de configurer les données microsatellites au format requis par le programme Microsat (Minch et al., 1997). À partir de la matrice de distances construite avec les 100 individus, un arbre est obtenu avec la méthode de Neighbor-Joining à l'aide de Paup v.4.0b10 (Swofford, 2001).

**Hydrocarbures cuticulaires.** Onze à treize ouvriers pour chacune des cinq colonies étudiées chimiquement ont été extraits individuellement dans du pentane et analysés par chromatographie en phase gazeuse (Perkin-Elmer Autosystem XL, colonne DB1 de 25 m).

- *Discrimination des colonies* : les proportions relatives d'hydrocarbures cuticulaires ont été déterminées pour chaque individu, puis une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée avec Statistica v. 5.1 (StatSoft®). La séparation des groupes sur l'ACP a été évaluée par le Test *t* de Fisher non paramétrique.

## RÉSULTATS

### Structure reproductrice des colonies.

- *Analyse des pedigrees.* L'analyse des génotypes pour chaque colonie a révélé que toutes les colonies étaient non-Mendéliennes, c'est-à-dire qu'elles ne pouvaient être des familles simples menées par un seul couple de reproducteurs, mais au contraire étaient complexes.

- *Inférence du système de reproduction* (Tableau 1). FIT est le coefficient de consanguinité de l'individu par rapport à la population totale, FCT celui de la colonie par rapport à la population totale et FIC celui de l'individu par rapport à la colonie.

	F <sub>IT</sub>	F <sub>CT</sub>	F <sub>IC</sub>	r
<b>Résultats empiriques</b>				
(i) toutes les colonies (n=7)	0.30 (0.22-0.38)	0.32 (0.28-0.35)	-0.04 (-0.11-0.06)	0.49 (0.42-0.56)
(ii) colonies parisiennes (n=5)	0.23 (0.13-0.39)	0.26 (0.20-0.33)	-0.04 (-0.12-0.12)	0.38 (0.29-0.47)
<b>Systèmes de reproduction simulés *</b>				
<b>(A) Un couple de reproducteurs</b>	0.00	0.25	-0.33	0.50
<b>(B) Reproduction entre néoténiques</b>				
(i) N <sub>f</sub> = N <sub>m</sub> =1, X=1	0.33	0.42	-0.14	0.62
(ii) N <sub>f</sub> = N <sub>m</sub> =1, X=3	0.57	0.65	-0.22	0.82
(iii) N <sub>f</sub> = N <sub>m</sub> =10, X=1	0.33	0.34	-0.01	0.51
(iv) N <sub>f</sub> = N <sub>m</sub> =10, X=3	0.37	0.38	-0.02	0.56
(v) N <sub>f</sub> =200, N <sub>m</sub> = 100, X=3	0.33	0.34	-0.00	0.50

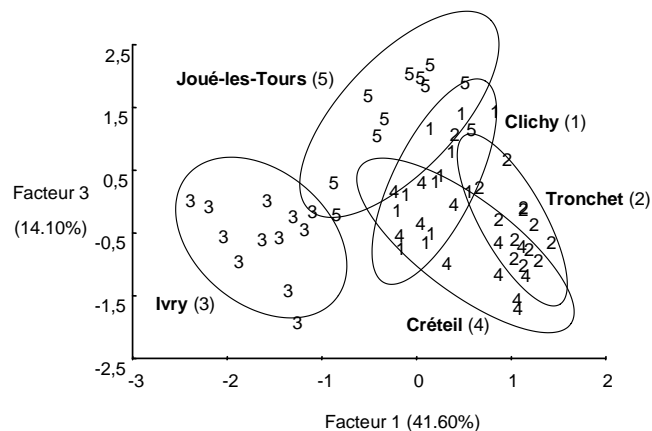
**Tableau 1** : Comparaison des mesures empiriques d'*inbreeding* (*F*-statistiques) et de parenté moyenne (*r*), obtenues pour les colonies de *R. santonensis* (intervalles de confiance à 95%), avec les valeurs simulées (Thorne et al., 1999) de différents systèmes de reproduction. (N<sub>f</sub> et N<sub>m</sub> = nb reproducteurs néoténiques femelles et mâles, produits par génération X).

FIC est très proche de 0, ce qui indique un nombre élevé de reproducteurs de remplacement. La parenté moyenne est inférieure à 0.50. Les valeurs empiriques correspondent aux valeurs simulées des colonies (Thorne et al., 1999) avec reproduction entre néoténiques depuis au moins trois générations

Différents patterns possibles de reproduction peuvent être envisagés : seuls un roi et une reine non apparentés auraient fondé la colonie puis auraient été relayés par de nombreux cycles de reproduction intra-coloniale entre néoténiques, ou encore il y aurait eu plus d'un roi et d'une reine non apparentés à l'origine de la colonie (pléométrie, cas non montré ici) puis de nombreux cycles de reproduction intra-coloniale via les néoténiques. Ce dernier cas est suggéré pour quelques colonies au vu de la présence d'un locus avec plus de quatre allèles. Étant donné la complexité du système, d'autres patterns de reproduction avec, par exemple, des situations intermédiaires sont également envisageables.

### Discrimination des colonies

#### Analyse des hydrocarbures cuticulaires



**Figure 1** : Analyse en composantes principales des proportions relatives d'hydrocarbures cuticulaires chez *R. santonensis*. Projection des individus des 5 colonies sur les axes factoriels 1 et 3 avec les ellipses de confiance à 90% (colonies : 1 : 17A, 2 : 8C,

Les cinq colonies ont pu être différenciées par les proportions relatives d'hydrocarbures cuticulaires (Figure 1). Les analyses statistiques (test t de Fisher non paramétrique) montrent en effet que ces colonies sont statistiquement différentes en utilisant les trois premiers axes de l'ACP (respectivement 41.60%, 15.09% et 14.10% de la variance ;  $p < 0.05$ ).

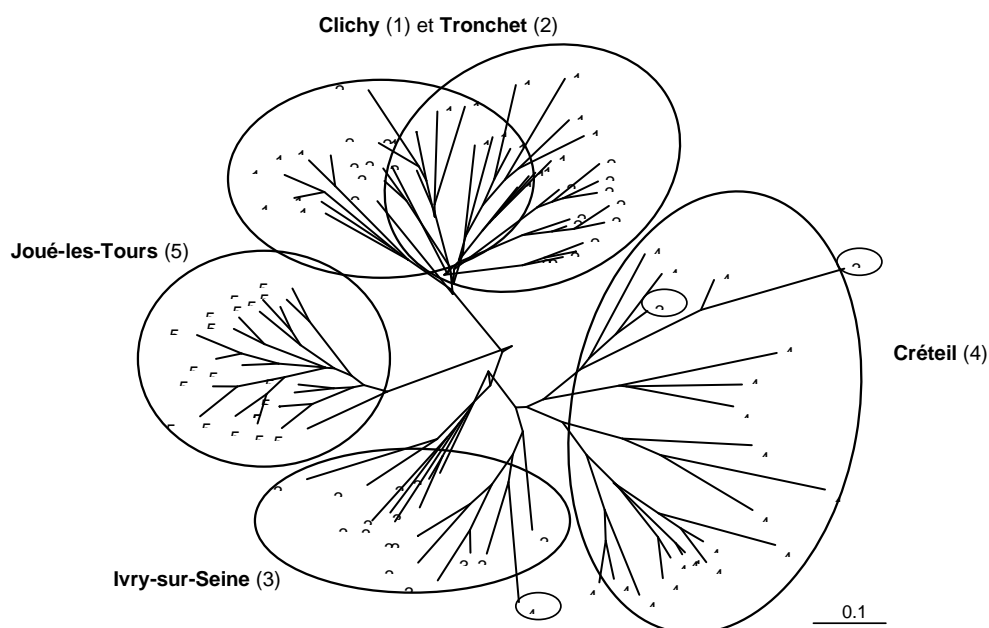
#### Marqueurs microsatellites

Les individus sont regroupés en raison de leur colonie d'appartenance (Figure 2). Le degré de séparation entre les colonies est estimé par la longueur des branches basales, qui est inversement proportionnelle au nombre d'allèles partagés.

Les colonies parisiennes Clichy (1) et Tronchet (2) présentent une superposition partielle justifiée par la présence d'un certain nombre d'allèles communs, alors que les individus de

Joué-les-Tours (5) sont bien regroupés du fait de la présence d'allèles diagnostiques qui sont absents dans les autres colonies. Quelques cas isolés (deux individus d'Ivry et un de Créteil) se situent dans l'autre groupe, respectivement.

Nous pouvons remarquer que pour la colonie de Créteil (4), on observe une variabilité dans la longueur des branches apicales, ce qui correspond à une forte hétérogénéité génétique au sein de la colonie. Ces résultats correspondent à ceux précédemment obtenus pour la structure reproductrice de cette colonie : la colonie était non-mendélienne, avec la plupart des loci ayant plus de quatre allèles (voir Dronnet et al, 2002).



**Figure 2 :** Arbre de distance obtenu avec la méthode neighbor-joining à partir des distances entre 60 génotypes microsatellites. Les ellipses, sans valeur statistique, ont été dessinées pour une meilleure visualisation des groupes (pour les codes des colonies, voir la Figure 1).

## CONCLUSION

L'emploi de marqueurs, l'un phénotypique (hydrocarbures cuticulaires), l'autre génétique (microsatellites), nous a permis d'étudier les colonies de *R. santonensis* aux niveaux intra- et inter-colonial. En milieu urbain, le système de reproduction de *R. santonensis* serait donc influencé par cet environnement particulier puisque la voie de reproduction via les reproducteurs secondaires semble être favorisée. Ainsi, le mode de propagation par bouturage aurait des conséquences importantes sur la répartition des colonies en milieu urbain, colonies qui peuvent être distinguées grâce à des critères chimiques et génétiques. Cette discrimination des colonies est essentielle afin d'optimiser l'efficacité des traitements sur la ville de Paris. Un plus grand nombre de colonies à échantillonner est nécessaire pour confirmer les analyses employées, mais également pour en réaliser d'autres qui combinerait les deux marqueurs chimiques et génétiques.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions M. Ohresser (CNRS, Tours) et E.L. Vargo (Dept. Of Entomology, NCSU) pour leur aide précieuse dans l'analyse des microsatellites au niveau intra-colonial. Nous remercions particulièrement C. Lohou du Service des Sciences et Techniques du Végétal (Direction des Parcs, Jardins et Espaces Verts, Ville de Paris). Merci au SMASH (Service Municipal d'Hygiène, Ville de Paris). Ce projet est financé par la Direction des Parcs, Jardins et Espaces Verts de la ville de Paris et par le CNRS.

## RÉFÉRENCES

- Bagnères A.-G., Clément J.-C., Lange C., Blum M.S., 1990. Cuticular compounds in *Reticulitermes* termites: species, caste and colonial signature. In: Social Insects and the Environment, Veeresh G. K., Mallik B., Viraktamath C. A. (eds), Oxford & IBH, pp. 423-424.
- Bagnères A.-G., Rivière G., Clément J.-L., 1998. Artificial neural network modeling of caste odor discrimination based on cuticular hydrocarbons in termites. *Chemoecology*, 8, 201-209.
- Clément J.-L., 1986. Open and closed societies in Termites of the genus *Reticulitermes*, geographic variations and seasonality. *Sociobiol.*, 11, 311-323.
- Dronnet S., Ohresser M., Vargo E.L., Lohou C., Clément J.-L., Bagnères A.-G., 2002. Colony studies of the subterranean termite, *Reticulitermes santonensis* (Isoptera: Rhinotermitidae), in the city of Paris. In: Proceedings of the 4th International Congress of Urban Pest, S.C. Jones, J. Zhai, W.H. Robinson (eds), Pocahontas Press, inc., VA, USA, pp. 295-301.
- Howard R.W., McDaniel C.A., Blomquist G., 1978. Cuticular hydrocarbons of the Eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes*. *J. Chem. Ecol.*, 4, 233-245.
- Lohou C., Burban G., Clément J.-L., Jequel M., Leca J.-L., 1997. Protection des arbres d'alignement contre les termites souterrains. L'expérience menée à Paris. *Phytoma*, 492, 42-44.
- Lynch M., 1990. The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol. Biol. Evol.*, 7, 478-484.
- Reilly L. M., 1987. Measurements of inbreeding and average relatedness in a termite population. *Am. Nat.*, 130, 339-349.
- Thorne B.L., Traniello J.F.A., Adams E.S., Bulmer M.S., 1999. Reproductive dynamics and colony structure of subterranean termites of the genus *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae): a review of the evidence from behavioral, ecological, and genetic studies. *Ethol. Ecol. Evol.*, 11, 149-169.
- Vargo E.L., 2000. Polymorphisms at trinucleotide microsatellite loci in the subterranean termite *Reticulitermes flavipes*. *Mol Ecol.*, 9, 817-820.
- Vargo E.L., 2002. Molecular genetic analysis of colony and population genetic structure of eastern subterranean termite *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae) in North Carolina, In: Proceedings of the 4th International Congress of Urban Pest, S.C. Jones, J. Zhai, W.H. Robinson (eds), Pocahontas Press, inc., VA, USA, pp. 289-294.

### Références des logiciels et programmes utilisés :

- Lewis P.O., Zaykin D., 2000. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.1. <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/gda.html> (Jan. 7, 2002).
- Minch E., 1997. MICROSAT 1.5b. Stanford University Medical Center, Stanford.

- Queller D.C., Goodnight K.F. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 43, 258-275.
- Swofford D.L., 2001. PAUP\* 4.0b10. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Wagner H.W, Sefc K.M., 1999. IDENTITY 1.0. Center for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, Vienna.