

**MICROSATELLITES ET STRUCTURE  
GENETIQUE CHEZ UNE FOURMI DES BOIS,  
*FORMICA LUGUBRIS***

**Michel Chapuisat (1,2) et Daniel Cherix (1)**

(1) *Musée de Zoologie, CP 448, 1000 Lausanne 17, Suisse*

(2) *Institut de Zoologie et d'Ecologie animale, 1015 Lausanne,  
Suisse*

**Résumé:** Les microsatellites sont des segments d'ADN avec des répétitions en tandem de courts motifs. Ils sont très polymorphiques à cause de variations dans le nombre de répétitions du motif, et cette variabilité de taille peut être analysée au moyen de la réaction de polymérase en chaîne (PCR). Chez les insectes sociaux, qui montrent un faible taux de polymorphisme enzymatique, les microsatellites sont particulièrement prometteurs: ils permettront d'analyser de manière fine la structure génétique des populations et des colonies, et seront utiles pour des études sur l'évolution nécessitant une distinction génétique précise. Des microsatellites de motifs TG/AC et TC/AG ont été clonés et séquencés chez *Formica lugubris*, une espèce polygyne et polycalique du groupe des fourmis des bois. Ces microsatellites permettront d'une part d'estimer le flux génétique entre deux formes sympatriques, et d'autre part d'analyser la structure reproductive des colonies et ses effets sur le degré de parenté.

**Mots-clés:** *microsatellites, ADN, structure génétique, Formica lugubris*

**Summary:** **Microsatellites and genetic structure in a red wood ant, *Formica lugubris***

Microsatellites are DNA segments with short, tandemly repeated, sequence motifs. They are highly polymorphic because of variations in the number of repeats of the sequence motifs, and this length variability can be analyzed by the polymerase chain reaction (PCR). In social insects, which typically exhibit low level of enzymatic polymorphism, microsatellites are especially promising: they will permit to analyse colony and population genetic structure at a fine scale, and will be useful for evolutionary studies needing a precise genetic distinction. TG/AC and TC/AG microsatellites have been cloned and sequenced in the red wood ant *Formica lugubris*, a polygynous and polydomous species. These microsatellites will be used first to measure gene flow between two sympatric forms and secondly to analyse colony reproductive structure and its effects on genetic relatedness.

**Key-words:** *microsatellites, DNA, genetic structure, Formica lugubris*

## INTRODUCTION

Les études génétiques des colonies et des populations d'insectes sociaux dépendent de façon critique de marqueurs génétiques polymorphiques. D'une part, ces marqueurs sont les outils de base pour les études de génétique des populations (structuration génétique des populations, restriction du flux génétique, spéciation, etc...). D'autre part,



ils permettent d'étudier le système de reproduction, la structure reproductive des colonies et le degré de parenté, ainsi que d'établir des filiations. Ces éléments sont importants pour comprendre les bases évolutives de l'organisation sociale, et en particulier le rôle des stratégies basées sur la sélection de parentèle (kin-selection).

Chez les abeilles, les fourmis et les guêpes sociales, la faible variabilité des isozymes limite sérieusement ce type de recherche. Pour des études génétiques plus fines, de nouveaux marqueurs génétiques très variables appelés microsatellites sont très prometteurs (Queller et al., 1993).

Les microsatellites sont des répétitions en tandem de séquences simples d'ADN, constitués de 10 à 50 copies de motifs de 1 à 6 paires de bases. Ils sont abondants dans le génome nucléaire de tous les eucaryotes et sont en général inclus dans des séquences uniques, ce qui permet une amplification par la réaction de polymérase en chaîne (PCR). Cette technique puissante permet de travailler à partir de très petits échantillons, ce qui est un avantage certain pour l'étude des insectes. Les microsatellites sont extrêmement polymorphiques à cause de variations dans le nombre de répétitions du motif de base, tout en étant hérités de manière mendélienne (Tautz, 1989)

La caractérisation de microsatellites a été entreprise chez *Formica lugubris*, une espèce du groupe *Formica rufa* qui forme de grandes colonies dans le Jura suisse, avec de nombreux nids reliés entre eux, et où chaque nid contient de nombreuses reines (Cherix et al., 1991). La structure génétique de la population a été étudiée par électrophorèse des isozymes (Pamilo et al., 1992). L'espèce *Formica lugubris* semble en fait constituée de deux groupes génétiques isolés, qui représentent vraisemblablement deux espèces jumelles récemment séparées. Il n'y a toutefois pas d'allèle discriminant, et il est en général possible de classer les nids, mais pas les individus, dans un type ou l'autre, sur la base de covariations de fréquences alléliques à plusieurs loci.

Les microsatellites seront employés pour:

1. Déterminer le niveau du flux génétique entre les deux formes sympatriques de *Formica lugubris*. Si ce flux est totalement interrompu et qu'il existe des allèles discriminants, il sera possible d'étudier les mécanismes de cette isolation reproductive.

2. Etudier de façon fine la structure reproductive des colonies (nombre effectif minimal de reines, nombre d'accouplements par reine, division du travail reproductif entre les reines) et ses effets sur le degré de parenté.

3. Examiner si une différenciation génétique locale correspond aux groupes de nids coopérant entre eux.

## MATERIEL ET METHODES

Une première phase consiste à trouver et à caractériser des microsatellites. Dans un deuxième temps, quelques loci choisis seront amplifiés par PCR, fournissant ainsi des marqueurs génétiques variables qui pourront être typés chez les individus des colonies et des populations.

Le protocole expérimental détaillé est pour l'essentiel celui de Estoup et al. (1993). Queller et al. (1993) présentent les principes généraux de la méthode de façon illustrée.

### 1. Recherche et caractérisation de microsatellites

Une banque génomique partielle a été construite dans un vecteur plasmidique. Le DNA génomique de 42 fourmis a été extrait de façon douce, puis digéré par une enzyme de restriction. Les fragments entre 300 et 550 paires de bases ont été isolés à partir d'un gel d'agarose, puis clonés dans un vecteur plasmidique. Des bactéries compétentes ont



ensuite été transformées, c'est-à-dire ont incorporé ces plasmides contenant une collection de fragments avec des séquences d'ADN de fourmi. 2400 colonies recombinantes, transférées sur des boîtes avec du milieu solide, constituaient la banque génétique dans laquelle il fallait retrouver les clones contenant un microsatellite de fourmi.

La banque a donc été criblée par hybridation avec des sondes, qui sont des oligonucléotides avec une séquence microsatellite. Deux sondes oligonucléotiques (TC)<sub>10</sub> et (TG)<sub>10</sub> ont été marquées de façon à pouvoir les détecter par une réaction immunologique sans recourir à la radioactivité. La banque génétique a été répliquée sur une membrane de nylon, et ces membranes ont été criblées par hybridation avec les sondes: ces dernières s'hybrident spécifiquement avec les séquences complémentaires, ce qui permet d'"allumer" les clones contenant des microsatellites correspondant aux sondes employées. La présence de microsatellites a été vérifiée ensuite dans un Southern blot.

21 clones positifs ont été isolés puis séquencés, ce qui a permis de déterminer exactement les microsatellites et les séquences adjacentes.

## 2. Détection de ces marqueurs génétiques polymorphiques

Pour 5 loci, des amorces complémentaires à des séquences uniques flanquant le microsatellite ont été mises au point, ce qui permettra d'amplifier spécifiquement par PCR le locus contenant la séquence répétée de longueur variable. Le polymorphisme de taille de ces loci sera analysé par électrophorèse sur gel de séquençage, ce qui permettra d'identifier efficacement les allèles de chaque locus.

## RESULTATS

Chez *Formica lugubris*, 21 clones contenant des microsatellites (TG)<sub>n</sub> et (TC)<sub>n</sub> ont été isolés parmi 2400 colonies recombinantes. La taille moyenne d'un insert étant de 395 paires de bases (N=29), la densité moyenne des répétitions (TG)<sub>n</sub> et (TC)<sub>n</sub> peut être estimée à un motif tous les 40'000 à 50'000 paires de bases. Cette estimation grossière dépend de l'efficacité de la détection, mais correspond environ aux estimations obtenues pour *Bombus terrestris* (Estoup et al., 1993). Le séquençage des clones positifs a permis de confirmer la présence de microsatellites dans 17 cas. Pour les 4 clones restant, la séquence exacte n'a pas pu être déterminée pour l'instant car deux colonies ont été isolées et séquencées conjointement. Si nécessaire, ces 4 clones pourront être séparés et réanalysés ultérieurement. 10 microsatellites (TC)<sub>n</sub> et 7 (TG)<sub>n</sub>, avec des répétitions non interrompues de 4 à 20 motifs dinucléotidiques, ont été trouvés. Le microsatellite est associé à d'autres types de répétitions dans deux cas pour les motifs TC et dans 5 cas pour les motifs TG (microsatellite complexe).

Des amorces flanquant les microsatellites suivants ont été mises au point: (TG)<sub>20</sub>, et (TC)<sub>19,16, 12 et 10</sub>. Plus les microsatellites sont longs, plus la probabilité est grande qu'un polymorphisme élevé soit présent. L'analyse de la variabilité de ces loci dans les colonies et les populations est en cours.

## DISCUSSION

Des microsatellites (TG)<sub>n</sub> et (TC)<sub>n</sub> ont été isolés et séquencés chez *Formica lugubris*. Cela confirme la présence fréquente de ces séquences répétées dans les génomes eucaryotes. Les microsatellites ne sont pas trop difficiles à cloner et sont donc une source abondante de marqueurs génétiques variables. Ce sont essentiellement des considérations pratiques (coût et temps de travail) qui limitent le nombre de loci disponibles.

Le principal désavantage des microsatellites réside dans le fait que des amorces mises au point dans une espèce n'amplifient pas forcément de fragment variable dans une



autre espèce. Chez les mammifères, les amorces fonctionnent souvent dans des espèces proches (Schlötterer et al., 1991, Moore et al., 1991), mais chez les insectes cela devra être testé de cas en cas. Il est toutefois peu probable que des amorces puissent être employées dans des espèces ayant depuis longtemps divergé, puisque les microsatellites sont en général inclus dans des séquences non codantes susceptibles d'évoluer rapidement. L'effort pour rechercher et caractériser des microsatellites devra probablement être répété pour chaque grand groupe d'espèces. Au sein des insectes sociaux, des microsatellites ont déjà été développés chez les abeilles et les bourdons (Estoup et al., 1993), les polistes (Hughes et Queller, 1993), et les fourmis des genres *Leptothorax* (Hamaguchi et al., 1993) et *Myrmica* (Evans, sous presse).

Chez *Formica lugubris*, le niveau de polymorphisme de 5 loci sera analysé par PCR. Les loci avec les répétitions pures les plus longues (20, 19 et 16 motifs) sont susceptibles d'être très variables, avec de nombreux allèles et des taux d'hétérozygotie élevés. Ils seront principalement employés pour étudier la structure génétique fine des colonies et les mécanismes générant ces patterns (structure reproductive). Les loci avec des répétitions plus courtes ou impures (12 et 10 motifs) sont potentiellement moins variables, et seront probablement mieux indiqués pour étudier la structure génétique des populations et le flux génétique entre les deux formes sympatriques de *Formica lugubris*.

Les microsatellites sont des marqueurs génétiques très prometteurs. Leur grande variabilité, la qualité de l'information qu'ils procurent (allèles codominants hérités de façon mendélienne) et les avantages d'une détection directe par PCR en font des outils de choix pour analyser la structure génétique fine des colonies et des populations d'insectes sociaux.

## REFERENCES

- Cherix, D., Chautems, D., Fletcher, D., Fortelius, W., Gris, G., Keller, L., Passera, L., Rosengren, R., Vargo, E. and Walter, F., 1991. Alternative reproductive strategies in *Formica lugubris* Zett. (Hymenoptera Formicidae). *Ethology Ecology Evolution, Special Issue, 1*:61-66.
- Estoup, A., Solignac, M., Harry, M. and Cornuet, J.M., 1993. Characterization of (GT)<sub>n</sub> and (CT)<sub>n</sub> microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Res. 21*:1427-1431.
- Evans, J., 1993. Parentage analyses in ant colonies using simple sequence repeat loci. *Molecular Ecology*, in print.
- Hamaguchi, K., Itô, Y. and Takenaka, O., 1993. GT dinucleotide repeat polymorphisms in a polygynous ant, *Leptothorax spinosior* and their use for measurement of relatedness. *Naturwissenschaften 80*:179-181.
- Hughes, C. and Queller, D., 1993. Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. *Molecular Ecology 2*:131-137.
- Moore, S., Sargeant, L., King, T., Mattick, J., Georges, M. and Hetzel, D., 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics 10*:654-660.
- Pamilo P., Chautems, D. and Cherix, D., 1992. Genetic differentiation of disjunct populations of the ants *Formica aquilonia* and *Formica lugubris* in Europe. *Ins. Soc. 39*:15-29.
- Queller, D., Strassmann, J. and Hughes, C., 1993. Microsatellites and kinship. *TREE 8*:285-288.
- Schlötterer, C., Amos, B. and Tautz, D., 1991. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature 354*:63-65.
- Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res. 17* : 6463-6471.