

CONTROLE ROYAL DANS L' ETABLISSEMENT DU SEX RATIO CHEZ LES *FORMICIDAE*.
UTILISATION DU F.I.S.H. COMME NOUVELLE TECHNIQUE
DE DETERMINATION DU SEXE DES OEUFS

L. de Menten¹, H. Niculita², S. Aron¹

¹ Laboratoire de Biologie des Communautés Animales, Université Libre de Bruxelles, Avenue F.D. Roosevelt, 50 - CP160/12, 1050 Bruxelles, Belgique

² Laboratoire d'Evolution et Contraintes génomiques, Centre de Génétique Moléculaire, Bat 26, Centre National de la Recherche Scientifique, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

RESUME

Les asymétries génétiques induites par la détermination du sexe de type haplodiploïde caractéristique des Hyménoptères se répercutent sur les intérêts reproductifs des individus. Chez les fourmis, l'investissement à mettre dans chacun des sexes de la descendance est sous l'influence de deux parties : les reines pondueuses et les ouvrières éleveuses du couvain. Ces deux parties ont des intérêts génétiques qui peuvent différer, au quel cas, elles entrent en conflit quant au sex ratio de la descendance sexuée. En règle générale, le contrôle du sex ratio est attribué aux ouvrières. Cependant, les reines ont également la possibilité de biaiser le sex ratio par la proportion d'œufs haploïdes et diploïdes qu'elles pondent et peuvent forcer les ouvrières à élever un sexe en limitant le nombre d'œufs pondus de l'autre sexe. Afin d'étudier la contribution des reines dans l'établissement du sex ratio des sociétés de fourmis, nous avons mis au point une technique "universelle" permettant de "sexer" efficacement les œufs pondus par les reines chez une majorité d'espèces de fourmis. Cette technique, appelée *Fluorescence in situ Hybridization* (F.I.S.H.), permet la détermination du sexe des œufs à partir du degré de ploïdie de leurs noyaux : un noyau haploïde révélant un spot fluorescent, un noyau diploïde deux spots fluorescents, etc.

INTRODUCTION

La détermination du sexe haplodiploïde caractéristique des Hyménoptères induit des asymétries de parenté ainsi que des conflits entre les individus d'une même société lorsque les intérêts reproducteurs de chacun diffèrent. Chez les fourmis, le conflit le plus manifeste oppose les reines aux ouvrières quant au sex ratio de la descendance sexuée. Globalement, l'investissement relatif dans chaque sexe au niveau de la population semble se trouver entre l'optimum des ouvrières et des reines, suggérant que les deux parties ont au moins un contrôle partiel du sex ratio (Bourke and Franks 1995 ; Crozier and Pamilo 1996). Plusieurs études montrent que le sex ratio primaire est généralement supérieur au sex ratio secondaire, ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle les ouvrières manipulent activement le sex ratio en éliminant sélectivement du couvain mâle (Aron *et al.* 1994; Aron *et al.* 1995; Keller *et al.* 1996; Sundström *et al.* 1996; Chapuisat *et al.* 1997). Récemment, des travaux ont montré que les reines de *Solenopsis invicta* peuvent contrôler le sex ratio dans les sociétés monogynes (Passera *et al.* 2001) en limitant le nombre d'œufs diploïdes pondus. Peu d'autres études ont été réalisées sur les variations du sex ratio primaire en fonction des conditions sociales ou écologiques. Ce manque d'études résulte de la difficulté d'estimer la proportion d'œufs haploïdes et diploïdes pondus par les reines. Jusqu'à présent, 2 méthodes ont été utilisées pour sexer les œufs : les caryotypes (Aron *et al.* 1994; Sundström *et al.* 1996) et l'utilisation des marqueurs microsatellites (Chapuisat *et al.* 1997; Passera *et al.* 2001; Hammond *et al.* 2002). Aucune de ces méthodes ne s'avère être totalement satisfaisante : la détermination du sexe des œufs par caryotypes est laborieuse et le nombre de chromosomes doit être connu pour chaque espèce. L'utilisation des marqueurs microsatellites est certainement beaucoup plus efficace mais est coûteuse et les marqueurs doivent être caractérisés pour chaque espèce. De plus, le génotype de la mère et de son partenaire doivent être connus et le père doit avoir un locus différent de celui de la mère pour au moins un allèle afin que les œufs fertilisés apparaissent hétérozygotes pour ce locus.

Pour étudier la contribution des reines dans l'établissement du sex ratio des sociétés, nous avons adapté aux *Formicidae* la méthode de *Fluorescence in situ Hybridization* (F.I.S.H.) afin de mettre au point une technique "universelle" permettant de sexer efficacement les œufs pondus par les reines chez une majorité d'espèce de fourmis. Le F.I.S.H. consiste en l'hybridation d'une séquence d'ADN (sonde), marquée en fluorescence, avec la séquence chromosomique-cible complémentaire (Muleris *et al.* 1996; Stanley 1996).

La sonde que nous avons développée est une séquence génomique de 4,5kpb isolée chez la fourmi *Myrmica rubra* et correspondant au gène homéotique Abdominal-A lequel code pour la formation du premier segment abdominal chez tous les insectes. Ce gène est unique dans le génome des insectes et est conservé au minimum à 80% entre les différentes sous-familles de fourmis.

MATERIEL ET METHODES

Le gène Abdominal-A a été isolé chez *Myrmica rubra* et cloné par PCR puis séquencé. La sonde utilisée pour notre application du F.I.S.H. aux fourmis correspond aux deux premiers exons et au premier intron du gène. La conservation des séquences a été testée entre 10 espèces appartenant à 8 sous-familles de *Formicidae*: Myrmicinae, Dolichoderinae, Formicinae, Dorylinae, Ecitoninae, Leptanillinae, Myrmecinae et Ponerinae. La sonde a ensuite été marquée en indirect par le nucléotide modifié avec la biotine, 16-dUTP, par le procédé de *nick-translation*.

Notre protocole de F.I.S.H. est une modification du protocole standard utilisé dans les laboratoires de cytogénétique humaine (Knoll & Lichter 1994). Le signal d'hybridation est détecté grâce à des couches successives d'anticorps fluorescents, l'avidine conjuguée au fluorochrome FITC (fluorescéine isothianocyanate) ainsi qu'un anti-avidine biotinylée. L'ADN nucléaire sera coloré par le DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) qui se fixe spécifiquement aux bases A et T de l'ADN. Le marquage en indirect avec utilisation d'anticorps fluorescents permet l'amplification du signal fluorescent qui sera observé avec un microscope à épifluorescence. Les spots fluorescents se verront en vert et les noyaux en bleu. Le FISH a été testé sur les œufs de 15 espèces appartenant à 4 sous-familles de *Formicidae* : Myrmicinae, Dolichoderinae, Formicinae et Ponerinae. Ces 15 espèces sont différentes des 10 espèces testant la conservation de la séquence-sonde afin de compléter les données de cross-hybridation.

La détermination du sexe du couvain repose sur l'analyse du niveau de ploïdie de certains noyaux, avec un noyau haploïde révélant un seul spot fluorescent, un noyau diploïde, deux spots fluorescents, un triploïde trois spots et ainsi de suite. La proportion de noyau contenant un seul spot est estimée pour chaque œuf et est utilisée comme la variable principale pour différencier les œufs mâles des œufs femelles.

Pour la mise au point de la technique, nous avons utilisé des œufs de sexe connu, les œufs haploïdes proviennent d'œufs pondus par des ouvrières ou des gynes tandis que les œufs diploïdes proviennent d'œufs pondus par des reines fondatrices ou des reines hors de la période de production des sexués.

RESULTATS

Une seule copie du gène Abdominal-A a été trouvée chez les 10 espèces de fourmis testées. L'alignement nucléotidique montre un taux de similarité extrêmement élevé entre les gènes Abd-A venant des ces 10 espèces très divergentes. La sonde de 4,5kpb est conservée à 80% en moyenne entre les différentes sous-familles de *Formicidae*. D'ailleurs, la cross-hybridation sur les 15 autres espèces montre que notre sonde s'hybride avec succès avec celles-ci.

La méthode du F.I.S.H. apparaît très efficace pour déterminer le sexe des œufs. Nos données indiquent l'absence de recouvrement dans la distribution de la proportion de noyaux à 1spot entre les œufs haploïdes et diploïdes, les œufs femelles ayant toujours une proportion inférieure à 0,5 et les œufs mâles une proportion supérieure à 0,5. La proportion moyenne de noyaux à 1spot est de 0,16 dans un œuf femelle et de 0,71 dans un œuf mâle. Une estimation par le modèle binomial montre pour 10 noyaux observés, la probabilité d'erreur est de 1,4% pour un œuf femelle et de 3% pour un œuf mâle.

De plus, il n'y a pas de différence dans la proportion de noyaux à 1spot en fonction de la sous-famille (ANOVA à 2 facteurs, 1^{er} facteur : sexe, $p < 0.001$; 2^d facteur : sous-famille, $p = 0.426$; interaction sexe*sous-famille, $p = 0.233$).

L'hybridation ne correspond pas toujours avec le niveau de ploïdie attendu. Par exemple, un œuf haploïde peut révéler des noyaux contenant plus d'un spot et similairement un œuf diploïde peut révéler des noyaux contenant un seul spot ou plus de 2 spots fluorescents. De telles déviations peuvent résulter de plusieurs causes : (1) les œufs sont des embryons en développement, donc riches en mitoses. Au moment de la division cellulaire, un embryon haploïde apparaîtra diploïde et un embryon diploïde apparaîtra tétraploïde. (2) Les chromosomes ne se répliquent pas tous en même temps, il se peut qu'un allèle soit répliqué mais pas encore le second lors de l'hybridation, ce qui amène à des noyaux $3n$ chez un embryon diploïde. (3) L'hybridation ne se fait pas toujours à 100% dans tous les noyaux, elle varie en fonction de la phase cellulaire ainsi que de l'accessibilité du gène pour la sonde dû à la conformation tridimensionnelle de l'ADN.

CONCLUSION

Le FISH permet donc de sexer les œufs avec une efficacité supérieure aux caryotypes et, grâce à la sonde unique et conservée chez les fourmis, son avantage ultime est son application directe sur une majorité des espèces de fourmis.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les personnes qui nous ont fourni les échantillons utilisés dans ce travail.

Ce travail est supporté par le "Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'industrie et dans l'agriculture" (F.R.I.A.) pour L. de Menten, la "Fondation Nationale pour la Recherche Scientifique" (F.N.R.S.) pour S. Aron, l' "Association pour la Recherche contre le Cancer" (A.R.C.) et le "Centre National de la Recherche Scientifique" (C.N.R.S.) pour H. Niculita.

REFERENCES

- Aron S., Passera L. & Keller L. (1994). Queen-worker conflict over sex ratio: a comparison of primary and secondary sex ratios in the Argentine ant, *Iridomyrmex humilis*. *J. Evol. Biol.*, 7: 403-418
- Aron S., Vargo E.L., Passera L. (1995). Primary and secondary sex ratios in monogyne colonies of the fire ant. *Animal Behaviour*, 49: 749-757
- Keller L, Aron S, Passera L (1996) Internest sex ratio variation and male brood survival in the ant *Pheidole pallidula*. *Behavioral Ecology*, 7 (3): 292-298
- Sundström L, Chapuisat M & Keller L (1996) Conditional manipulation of sex ratios by ant workers: a test of kin selection theory. *Science*, 274: 993-995
- Chapuisat M., Sundström L. & Keller L. (1997). Sex-ratio regulation: the economics of fratricide in ants. *Proceedings of Royal Society of London Serie B*, 264: 1255-1260
- Passera L, Aron S, Vargo L & Keller L (2001) Queen control of sex ratio in Fire Ants. *Science*, 293: 1308-1310
- Muleris M, Richard F, Apiou F, Dutrillaux B (1996) *Hybridation in situ en cytogénétique moléculaire. Principes et techniques*. Tec & Doc Lavoisier. Ed Médicales Internationales. Collection Génie Génétique G2. 180pp.

Stanley K (1996) Chromosomes: Molecular systematics. Principles and comparison of methods. In Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. (eds). *Molecular systematics*. Sunderland, MA: Sinauer Associates. Second edition, pp134-166

Knoll JHM & Lichter P (1994) In situ hybridization to metaphase chromosomes and interphase nuclei. Unit 4.3. In Dracopoli N.C., Haines J.L., Korf B.R., moir D.T., Monton C.C., Seidman C.E., Seidman J.G., Smith D.R. (eds): *Current Protocols in Human genetics*. Vol 1. New York, Greene-Wiley.

Bourke A.F.G. & Franks N.R. (1995). *Social Evolution in Ants*. (Princeton: Princeton University Press), 529 pp

Crozier R.H. & Pamilo P. (1996). *Evolution of Social Insect Colonies: Sex Allocation and Kin Selection*. (Oxford : Oxford University Press). 306 pp