



Thèse de Doctorat

Associations biologiques entre
les termites du genre *Nasutitermes*
et leur microflore actinomycétale:
spécificité et évolution.

par

Thomas Lefebvre

Soutenance prévue le 17 décembre 2008 devant le jury composé de :

Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse
Examinateur
Examinateur

Alain Brauman
Alain Robert
Corinne Rouland-Lefèvre
Anne Geneviève Bagnères
Edouard Miambi

Remerciements

Cette thèse est le fruit d'un long travail réalisé au sein du Laboratoire d'Ecologie des Sols Tropicaux à l'IRD de Bondy. Elle représente pour moi une période très intense de ma vie, ponctuée par des expériences et rencontres, professionnelles et personnelles, toutes déterminantes. S'il a été surtout question de termites, l'humain a été le facteur essentiel. J'ai beaucoup de personnes à remercier, la liste qui va suivre ne serait être exhaustive.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à Corinne Rouland-Lefèvre qui m'a permis de réaliser cette thèse sous sa direction et de continuer à explorer le monde des termites. A ses côtés, l'aventure a été particulièrement enrichissante. Je reste profondément admiratif de ses qualités humaines et scientifiques. Et je m'interroge encore comment elle arrive à faire autant de choses à la fois tout en gardant une bonne humeur constante et un enthousiasme communicatif. Je la remercie pour tout ce qu'elle a fait pour moi et tout ce qu'elle m'a permis de faire, pour ses conseils judicieux de directrice de thèse et de mère.

Je tiens également à exprimer mes sincères remerciements à Edouard Miambi qui a été d'un soutien si précieux dans la réalisation de cette thèse. Son attention, son implication, ses conseils et ses critiques m'ont permis de progresser. C'est la générosité qui le caractérise. J'ai énormément apprécié sa disponibilité et son amabilité qui ont dépassé le simple cadre scientifique. Je lui dois beaucoup.

J'exprime mon immense reconnaissance à Anne-Geneviève Bagnères, elle qui m'a fait entrer dans le monde scientifique et m'a fait découvrir l'univers des termites. Elle a été pour moi d'une bienveillance maternelle et d'un soutien continu. Je ne sais comment la remercier. Mais je sais qu'elle sera fière si je réussis professionnellement, car elle est l'initiatrice de mon parcours.

Je remercie également Alain Robert que je connais depuis peu mais pour qui je ressent beaucoup d'estime et de sympathie. J'ai beaucoup appris sur les termites auprès de ce spécialiste. J'ai même eu le privilège de prendre soins de ses colonies d'élevage, c'est dire la confiance qu'il m'a accordé. Je le remercie aussi d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse malgré la précipitation. Merci aussi pour ses nombreux encouragements.

De la même manière, j'exprime ma gratitude à monsieur Alain Brauman pour avoir accepté, malgré ses nombreuses sollicitations, à participer à mon jury de thèse en tant que rapporteur. C'est un honneur d'avoir l'avis d'un spécialiste sur le sujet.

Je remercie les membres du LEST avec qui j'ai partagé de très bons moments : Jocelyne Roman, Annabelle Melot, Anne Pando, Nuria Ruiz, Sébastien Barot, Jérôme Mathieu, Thierry Desjardins, Patrick Lavelle. Passer ces dernières années dans une ambiance aussi agréable a été un réel plaisir. Merci aussi pour l'aide et les conseils qu'ils m'ont donné. J'ai une pensée particulière pour les "3 drôles de dames" de ce laboratoire, elles savent combien je les apprécie.

Merci également aux collègues de Paris XII : Phillippe Mora, Virginie Roy, Vincent Chassany, Lise Dupont, Alexandre Livet, Léonide Celini, Myriam Harry. J'ai passé un peu plus de temps auprès d'eux cette dernière année. J'en garde de très bons souvenirs. C'était aussi l'occasion pour moi de faire mes premiers pas dans l'enseignement, et je remercie ces différentes personnes pour m'avoir aidé à réaliser ce petit rêve d'enfant.

Un grand merci à Michel Diouf. Il m'a accompagné pendant la première année de ma thèse, m'a conseillé et m'a initié à la DGGE et à la microbiologie. Il est pour grand chose dans mon adaptation rapide au sein laboratoire. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour ce temps passé à m'aider. Mais au-delà de ses qualités scientifiques, je retiens avant tout ses qualités humaines. Je lui témoigne à nouveau de mon amitié.

Merci à mes compagnons de route, aux autres thésards avec qui j'ai eu le plaisir d'échanger des connaissances scientifiques mais également de bonnes parties de rigolade ou de football (Joseph, Anouar, Roll, Bakary, Kam-rigne, Simon, Ignace, Yong Tao, Trang, Huynh, Anaan, Fatima). Je leur souhaite bon courage et bonne continuation.

Merci à Jamila et Hind qui ont été les charmantes étudiantes que j'ai encadrée durant ma thèse. J'aurais certainement aimé les voir plus longtemps. Merci pour leurs petites contributions et leur amabilité. Merci également aux autres étudiants de passage au laboratoire qui ont tous étaient d'agréables camarades, et tout particulièrement François et Ibrahima.

Merci à tous mes amis mes proches et ma belle famille pour la sympathie qu'il éprouve envers ma petite personne et leur compréhension quant à ma passion des termites.

Merci à l'IRD Bondy dans son ensemble, du personnel de service à la direction, en passant par la photographe Annick. C'est aussi grâce à eux que j'ai passé ces quelques années dans un environnement propice à mon épanouissement.

Je ne pouvais pas oublier de remercier les termites, notamment ceux qui ont généreusement donné leur corps à la Science. J'ai passé beaucoup de temps à les observer et je reste toujours aussi admiratif devant leur organisation innée. Ce sont des petites bêtes très attachantes.

A toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin, je dis merci.

Enfin, je désire dédicacer cette thèse à plusieurs proches qui me sont chers. On oublie souvent de témoigner de ses sentiments les plus profonds, cette fois ils sont écrits et publiés.

Je tiens d'abord à dédicacer ma thèse à mon grand-père Octave décédé, il y a près d'un an, au début de la rédaction de cette thèse. Toute la famille sait combien cet homme, simple et fort, a contribué à la réussite et à l'épanouissement de ses enfants et petits-enfants. Il nous a transmis son exemplarité et son humilité extraordinaires, son dévouement, son courage et sa grande intelligence. C'est à sa mémoire et ses valeurs que je pense en achevant ce travail. Je sais qu'il aurait été fier de me voir finir mes longues études. Je suis petit fils de gueule-noire et, grâce à lui, cela signifie beaucoup de choses.

Je tiens ensuite à dédicacer ma thèse à ma fille Eden née en début de cette année. Elle représente déjà tout pour moi. Un petit trésor que j'adore et qui me remplit d'un bonheur intense. J'espère qu'elle lira ces lignes et le reste de la thèse dans quelques années et qu'elle ressentira beaucoup de fierté. Cette thèse est aujourd'hui pour elle.

Je dédie mon travail à cette autre moitié de moi-même, Sandra. Je te remercie infiniment pour tes sacrifices et pour tout ce que tu es pour moi. Je t'aime.

Enfin je dédie cette thèse à ma famille, mes chers parents, mon bien-aimé frère et sa famille, mes grands parents, mes tantes et mes oncles. Je les remercie pour leur soutien sans faille et de leur attachement à me voir réussir dans toutes mes ambitions. Je pense à ma maman qui s'est dévouée entièrement à mon éducation durant toute mon enfance, à mon père qui a toujours veillé à mon meilleur développement, à mon frère que j'ai toujours pris comme un modèle. Qu'ils trouvent ici un accomplissement à leur dévouement ainsi que ma reconnaissance éternelle.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE

I / Les Termites	12
I-1/ Les termites : l'histoire d'un succès évolutif.	12
I-2/ Diversité et distribution.	14
I-3/ Le cas complexe du genre <i>Nasutitermes</i>	18
II / Le tube digestif des termites : la clef du succès évolutif	19
II-1/ Morphologie générale du tube digestif.	19
II-2/ L'environnement physicochimique	23
II-3/ Les mécanismes de la digestion	24
III / La symbiose digestive	26
III-1/ Le rôle des symbiontes	26
III-2/ Evolution de la symbiose	28
III-3/ Diversité de la symbiose digestive	29
III-4/ La microflore actinomycétaire des termites	32
IV / Les Actinomycètes	34
IV-1/ Les actinomycètes : un embranchement à part.....	34
IV-2/ Intérêts biotechnologiques	36
V / Présentation du sujet d'étude	36

MATERIELS ET METHODES

I/ Matériel biologique : Les <i>Nasutitermes</i>	39
I-1/ Collecte et origines de colonies de termites.	40
I-2/ Dissection du tube digestif des termites.	41
II / Techniques microbiologiques	41
II-1/ Le milieu de sélection des actinomycètes : Le milieu HV.	41
II-2/ Préparation, ensemencement et énumération.	42
II-3/ Isolement et caractérisation des souches.	43
III/ Techniques moléculaires	43
III-1/Extraction d'ADN	43
III-2/ Contrôle et purification de l'ADN extrait	45
III-3/ Amplification de l'ADN	45
III-4/ Analyse des structures communautaires des populations d'actinomycètes.	47
III-5/ Identification et analyse des produits d'amplification d'ADN.	49

RÉSULTATS

Partie A

Caractérisation et comparaison des communautés actinomycétales associées spécifiquement à la panse de plusieurs espèces de *Nasutitermes* spp. 52

A-I/ Introduction	56
A-I-1/ Sur la spécificité de la microflore bactérienne digestive chez les termites	52
A-I-2/ Les actinomycètes : un modèle particulier pour la question de la spécificité.	53
A-I-3/ Sujet et objectifs de l'étude.	54
A-II/ Influence du facteur alimentaire sur la microflore actinobactérienne associée à la panse des termites du genre <i>Nasutitermes</i>	58
A-II-1/ Objectifs et protocole expérimental	54
A-II-2/ Résultats	55
A-II-3/ Comparaison à l'échelle interspécifique entre plusieurs espèces de <i>Nasutitermes</i> spp	59
A-IV/ Identification des bandes selon leur affiliation phylogénétique.	62
A-V/ Discussion globale.	66
A-V-1/ Sur la question de la spécificité de la microflore actinomycétale résolue par la technique de nested PCR - DGGE	66
A-V-2/ Sur la variation des structures des communautés actinobactériennes à l'échelle interspécifique	67
A-V-3/ Diversité des actinobactéries peuplant le tube digestif des <i>Nasutitermes</i> spp.	68
A-V-4/ Sur la pertinence des séquences d'actinobactéries découvertes.	68
A-VI/ Conclusion, limites et perspectives	70

Partie B

Etude de différents paramètres visant à l'isolement par la culture des actinomycètes associés spécifiquement au tube digestif du terme *Nasutitermes voeltzkowi*. 71

B-I/ Introduction	71
B-I-1/ L'apport des "cultivables" du tube digestif des termites.	71
B-I-2/ Le cas particulier des actinomycètes cultivés à partir du tube digestif des termites.	72
B-II/ Analyse de l'influence de différents facteurs expérimentaux sur la culture des actinomycètes issus du tube digestif des termites	74
B-II-1/ Objectif de l'étude.	74
B-II-2/ Méthodologie détaillée.	74
B-II-3/ Croissance actinobactérienne sur les milieux de sélection.	79
B-II-4/ Résultats des énumérations bactériennes en fonction des facteurs testés.	79
B-II-5/ Conclusion partielle sur l'influence des différents facteurs testés	81
B-III/ Identification des Actinobactéries Non-Streptomycètes (NSA)	81
B-III-1/ Méthodologie	81

B-III-2/ Différenciation morphologique des isolats	84
B-III-3/ Détection des souches de NSA par l'ARDRA.....	89
B-III-4/ Identification taxonomique des souches NSA 89	
B-III-5/ Comparaison des souches isolées avec celles obtenues à partir des profils DGGE	90
B-IV/ Discussion et conclusion.....	92
B-IV-1/ Diversité des actinomycètes cultivés	92
B-IV-2/ Influence des facteurs	93
B-IV-3/ La vérité sur les actinomycètes cultivés à partir des tubes digestifs de termites	94
B-IV-4/ Conclusion, limites et perspectives	95

Partie C

Etude microbiologique et phylogénétique d'un nouveau genre de *Propionibacteriaceae* (Actinomycetales) associé spécifiquement au tube digestif des termites.

C-I/ Introduction	97
C-I-1/ Présentation générale des propionibactéries.....	98
C-I-2/ Les propionibactéries associées à la panse des termites.	99
C-II/ Approche méthodologique	100
C-II-1/ Sujet et objectif de l'étude.	100
C-II-2/ La P.W.-P.C.R. (Plate Wash - Polymerase Chain Reaction)	101
C-II-3/ Approche expérimentale	101
C-III/ Conception des oligonucléotides spécifiques aux propionibactéries de termites.	103
C-III-1/ Principe général pour la conception d'amorces PCR.	103
C-III-3/ Définition des oligonucléotides synthétisés et résultats des tests.	105
C-IV/ Recherche d'une stratégie d'isolement des propionibactéries de termites par la culture, application de la PW-PCR.	113
C-IV-1/ Choix du milieu d'isolement et des conditions de culture.	113
C-IV-2/ Protocole expérimental.	116
C-IV-3/ Résultats des cultures bactériennes.	118
C-IV-4/ Capacité des milieux testés à isoler les propionibactéries spécifiques aux termites, vérifiée par PW-PCR	120
C-V/ Etude phylogénétique des séquences de propionibactéries issues de la panse de plusieurs espèces de termites	122
C-V-1/ Etats des connaissances et présentation de l'étude.	122
C-V-2/ Approche expérimentale.	123
C-V-3/ Résultats. 125	
C-V-4/ Discussions.	131
C-VI/ Conclusion générale sur les propionibactéries de termites.	134

Discussion-Conclusion générale

I/ Diversité des actinomycètes identifiés à partir du tube digestif des termites.....	137
I-1/ Inventaire	137
I-2/ Deux méthodes (moléculaire et microbiologique) pour deux visions.	139
II/ Spécificité et nature des interactions biologiques entre les termites et les actinomycètes	140
II-1/ Spécificité et origine endogène ou exogène des actinomycètes du tube digestif des termites.....	141
II-2/ Une microflore permanente, semi-permanente ou transitoire.....	141
II-3/ La nature des interactions biologiques.	142
II-4/ Degré de spécificité et transmission entre congénères.	142
III/ Perspectives et applications.	143

Bibliographie

Références bibliographiques	145
-----------------------------------	-----

Résumé	166
--------------	-----

Abstract	167
----------	-----

Avant-propos

d'une thèse en Termitologie



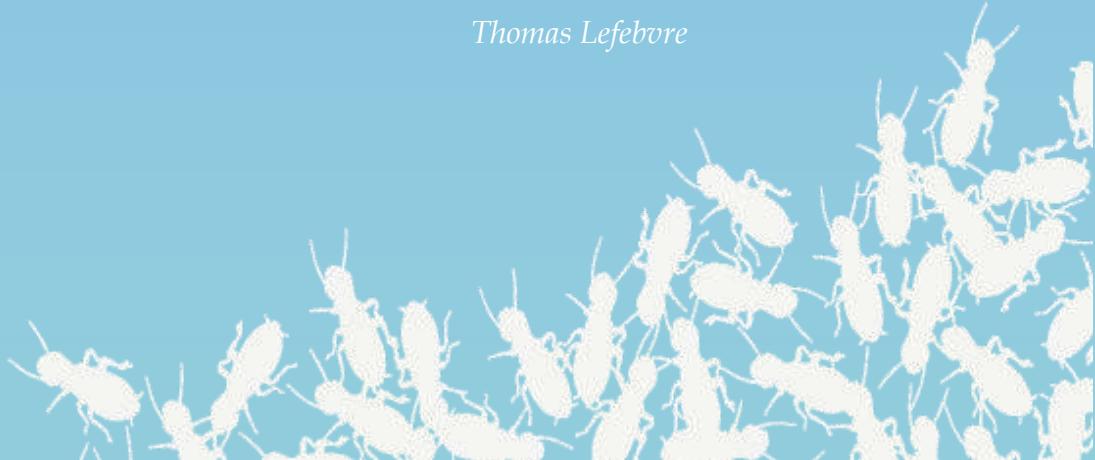
Dans le monde animal, l'univers des termites est des plus fascinants. Il est comme un univers à plusieurs dimensions que les scientifiques se passionnent à explorer. Les champs d'études y sont multiples, au moins aussi nombreux que les domaines où excellent les termites : ingénierie écologique, mode de socialité, intelligence collective, architecture animale, association symbiotique, perfection du système digestif... Etudier la biologie de ces insectes revient à s'immiscer dans un monde complètement étranger au nôtre. C'est un vrai "microcosmos" régi par des lois moléculaires et par un langage physique et chimique que l'homme peine à décrire. Isolée dans la termitière, c'est toute une société qui grouille, avec ses milliers d'individus qui s'affairent à leurs tâches élémentaires. L'organisation est impressionnante. En les observant se mouvoir, l'entomologiste a beaucoup de mal à s'extraire de ses repères anthropiques, pourtant ici rien n'est pensé ni réfléchi mais tout a un sens.

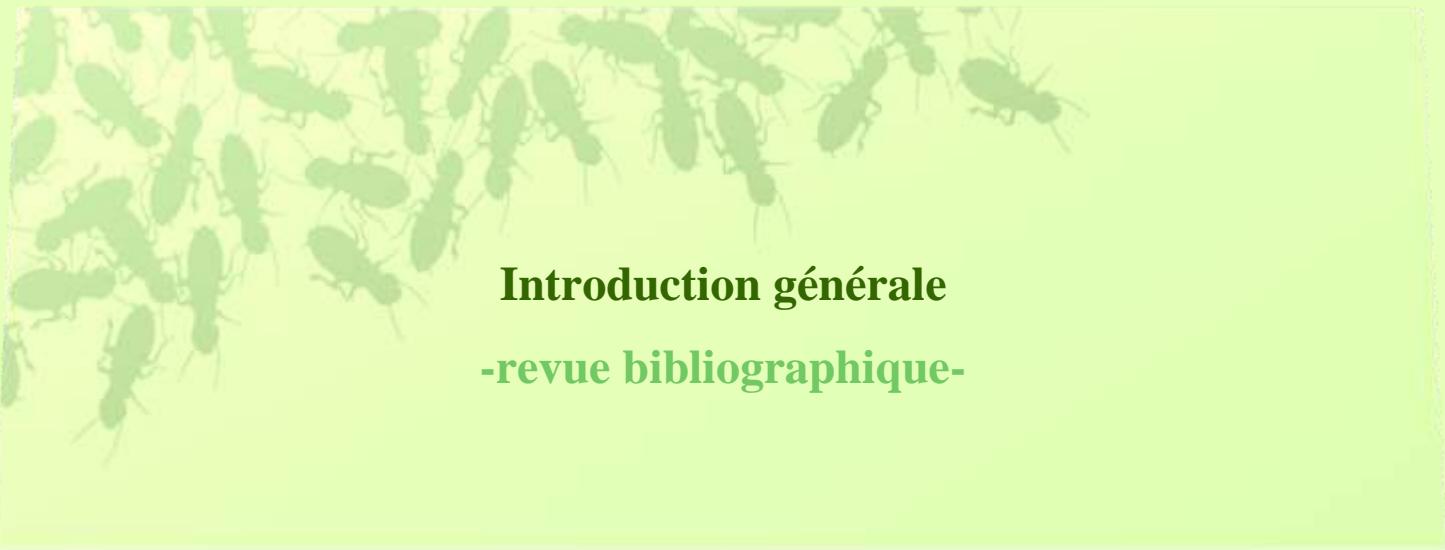
Le terme en lui-même n'est pas très attrayant. Il n'a pas l'élégance d'une fourmi ou d'une guêpe, ni l'excentricité d'une mante religieuse ou la parure colorée d'un papillon ou d'un coléoptère, il est humble jusque dans son allure. C'est un petit insecte primitif, livide, à la cuticule molle, dont la plupart de la colonie est à l'état larvaire, sans ailes et sans yeux, finalement réduit à un véritable tube digestif sur pattes. Dans les galeries obscures, il n'a pas besoin de fioritures. La Nature semble avoir optimisé au maximum ces organismes et ces sociétés pour ne sélectionner que l'essentiel. Et si à l'échelle individuelle le terme n'est rien, la colonie est capable des plus grandes prouesses. Victor Hugo aurait écrit que chez les termites, tout est minuscule mais rien n'est petit. Les termites n'ont pas l'apparence

d'organismes évolués, pourtant l'Evolution en a faits des êtres d'une efficacité remarquable. Essentiels pour le vivant, ils sont des piliers de nos écosystèmes tropicaux. Ils interviennent en effet activement dans l'équilibre de notre planète en recyclant la matière organique, en minéralisant le carbone, en drainant le sol, en stimulant les populations microbiennes, et en rendant accessible de nombreux nutriments essentiels à la vie.

Néanmoins, l'idée générale qu'on se fait des termites reste largement péjorative. Bien sûr, certains admireront leur indéniable talent de constructeurs, qui est sans doute ce que les termites ont fait de plus visible. Mais pour la plupart des humains, ces petites bêtes traînent l'image dédaigneuse de redoutables nuisibles capables de ruiner nos bâtis et nos cultures. En réalité, elles ne sont qu'une petite minorité à causer ces dégâts parmi la grande diversité des termites. Puis, c'est souvent l'homme qui les importe dans nos villes et agrandissent sans le vouloir leur aire de répartition. Quoiqu'il en soit, les dommages sont très importants et coûtent chaque année plus de 50 milliards de dollars US dans le monde. Le termitologue est d'ailleurs souvent confronté à cette vision schizophrène entre le terme bienfaiteur et le terme destructeur. Depuis longtemps, une grande partie de la recherche scientifique est orientée, pour des raisons économiques, sur la lutte anti-termite. Mais cela n'a souvent était qu'un prétexte, ou du moins un objectif lointain, pour s'intéresser à la biologie fondamentale de l'insecte. Aujourd'hui, les termites ont trouvé une meilleure presse et sont même devenus à la mode. Le nouveau filon concerne l'exploitation de leur système digestif, peut-être le plus perfectionné au monde, avec l'objectif de trouver des applications pour fabriquer des biocarburants. La planète souffre des excès de la race humaine, et on se retourne alors vers de petits insectes qui depuis l'aube des temps ont compris comment vivre sur Terre sans l'exploiter à ses dépens. Les humbles termites peuvent bien se moquer de notre démesure, ils ont vu naître et mourir les dinosaures !

Thomas Lefebvre





Introduction générale -revue bibliographique-

I / Les Termites

I-1/ Les termites : l'histoire d'un succès évolutif.

Rien d'autre que des blattes évoluées ?

Dans l'histoire de la Vie, les termites occupent une place à part. Leur histoire est le témoignage d'un succès évolutif qui leur a permis de prospérer à travers le monde au fil des âges géologiques. Leur genèse remonterait à environ 350 millions d'années, vers la fin de l'ère primaire (paléozoïque) (Emerson 1967 ; Thorne et al. 2000 ; Davies et al. 2003). A cette époque où les dinosaures et les mammifères n'existaient pas, les termites sont certainement apparus dans les grandes forêts humides du Carbonifère. On sait maintenant avec certitude qu'ils ont évolué de blattes ancestrales aux mœurs grégaires et au régime alimentaire omnivore, capables de coprophagie (Lo et al. 2000 ; Grimaldi & Engel 2005 ; Inward et al. 2007 ; Klass et al. 2008). Ces caractéristiques ont permis la co-évolution des symbiontes en favorisant la transmission d'assemblages microbiens stables entre congénères de génération en génération. Le changement évolutif clé semble alors être l'acquisition de mutualistes flagellés cellulolytiques (Eggleton 2006). Par cette association, les ancêtres des termites et des blattes du genre *Cryptocercus* se sont spécialisés dans une nouvelle niche écologique et sur le substrat quasi- inépuisable qu'est la matière ligno-cellulosique, ils deviennent des mangeurs de bois et s'isolent à jamais des autres variétés de blattes. Désormais, il est nécessaire de transmettre efficacement les protistes symbiontes à ses descendants. Il est probable que le transfert a été réalisé dans un premier temps par des mécanismes de trophallaxie proctodéale (transfert de nourriture entre deux individus de l'anus à la bouche) (Nalepa et al. 2001 ; Eggleton 2006). Ces mœurs vont conduire ces insectes à se regrouper encore plus intimement en des sociétés familiales. Pour assurer leur sécurité, les colonies s'isolent à l'intérieur de la

pièce de bois qu'ils consomment.

Ils entrent alors inexorablement dans la voie de l'eusocialité (i.e. un mode d'organisation sociale évolué où les individus sont répartis en castes stériles et fertiles) (Wilson 1971 ; Thorne 1997). A l'abri du monde extérieur, ils perdent progressivement des caractères anatomiques (simplification de l'appareil génital mâle et des spermatozoïdes), physiologiques (perte de l'oothèque) et comportementaux (monogamie) qui semblent superflus (Inward et al. 2007). C'est ainsi que se développent d'abord les castes ouvrières et nourricières autour des couples fondateurs. Chez cet insecte hémimétabole, elles sont composées des larves et des néoténiques (i.e. des adultes ou imago ayant gardé des caractères juvéniles) (Roisin 2000). Puis la division du travail s'intensifie avec la création de la caste des soldats pour la défense de la colonie et celle des reproducteurs pour la pérennité de la colonie (Roisin 2000 ; Thorne et al. 2003). Enfin, avec le besoin de prospection pour trouver de la nourriture, apparaissent les vrais ouvriers altruistes complets entièrement dévoués au bon fonctionnement de la société (Noirot & Pasteels 1987 ; Thompson et al. 2000 ; Legendre et al. 2008). L'organisation eusociale est établie, toutes les castes sont présentes, la termitière fonctionne. C'est la première fois dans l'histoire de la Vie qu'un groupe d'animaux acquiert un tel degré de socialité.

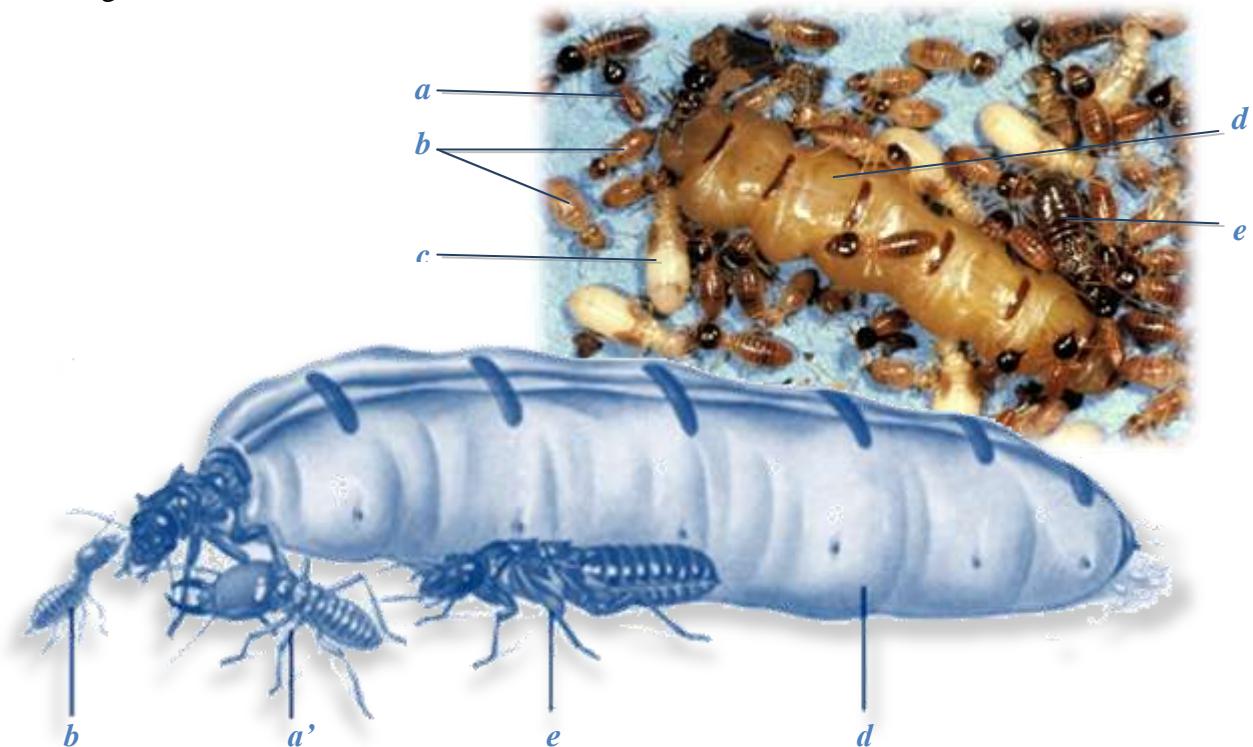


Figure I-1 | Photographie et dessin représentant les différentes castes de termites au sein d'une colonie de *Nasutitermes* sp. et de *Macrotermes* sp. respectivement.

a : soldat ; b : ouvrier ; c : nymphe ; d : reine ; e : roi.

Insectes venus des temps anciens.

Jusqu'à nos jours, les termites ont continué à évoluer en perfectionnant leur système digestif, leur organisation sociale, leur comportement ou leur habitat. Leur apparence n'a en revanche pas beaucoup varié. Protégés du monde extérieur dans leurs nids souterrains, autour du couple royal, ils ont traversé les âges géologiques, survécu aux crises majeures (extinctions du permien et du crétacé, glaciations, inversions des pôles magnétiques...) et accompagné les dérives tectoniques du Gondwana aux continents actuels (Davies et al. 2003). Ils sont ainsi des survivants des âges très anciens. Les premières formes de termites fossiles datent de la fin du crétacé, il y a 65 millions d'années (Jarzembowski 1981 ; Thorne et al. 2000). Déjà à cette époque, ils se répartissaient à travers le monde, occupant, semble-t-il, un rôle clé dans les écosystèmes. Aujourd'hui, ils prospèrent dans les zones tropicales sèches voire arides et de plus en plus sous nos climats tempérés.

I-2/ Diversité et distribution.

Répartition mondiale.

Il existe dans le monde près de 3000 espèces de termites connues (Eggleton 2001). La diversité est plus élevée autour de l'équateur et s'annule vers les 45° de latitude nord et sud (Eggleton 2000). Les termites supportent mal le froid limités certainement par l'inefficacité de leurs associations symbiotiques à basse température (Lavelle & Spain 2001). Cependant, les frontières de répartition des espèces ont tendances à s'étendre avec l'activité anthropique. Pour des populations qui sont de nature très endémiques, l'Homme a bouleversé les flux migratoires des termites en les introduisant loin de leur aire d'origine (Leniaud et al. 2008 ; Lefebvre et al. 2008). On trouve ainsi des infestations dans des villes inattendues comme Hambourg (Allemagne) ou Devon (Angleterre) (Clément et al. 2001). A l'inverse, la diversité spécifique dans des zones naturellement termitées -où leur présence est bénéfique (forêts tropicales humides, savane)- peut être fortement affectée par les activités humaines (Eggleton et al. 1996).

Classification taxonomique.

Bien que l'étude scientifique des termites date de la fin du XVIII^{ème} siècle, la classification taxonomique des 3000 espèces est encore sujette à controverse (Khambhampati & Eggleton 2000 ; Inward et al. 2007). Les bases taxonomiques proviennent des travaux de Holmgren (1909, 1911, 1912) repris et complétés par Emerson (1941), Snyder (1949) et

Grassé (1949). Plus récemment, de séduisants travaux ont tenté de reconstruire la phylogénie des termites en se basant sur les méthodes modernes de biologie moléculaire (Khambhampati et al. 1996; Thompson et al. 2000 ; Ohkuma et al. 2004 ; Legendre et al. 2008). Ces études ont confirmé dans les grandes lignes la systématique décrite par les pères de la termitologie. Cependant, la topologie des arbres et les problèmes de cladistique sont encore discutés (Eggleton 2001 ; Legendre et al. 2008). La controverse la plus animée est celle de l'emplacement que doivent prendre les termites dans la classe des insectes. Jusqu'à présent, les termites sont également appelés isoptères, du nom de l'ordre regroupant exclusivement toutes les espèces connues, il se peut, cependant, que ce terme devienne un jour désuet (Inward et al. 2007). En effet, de récentes études phylogénétiques montrent que les termites font partie intégrante des blattes et donc de l'ordre des Dictyoptères (incluant déjà les mantidés et les blattidés) (Lo et al 2003 ; Inward et al. 2007). Plus généralement, les termites sont séparés en deux catégories : les termites dits "inférieurs" ou primitifs qui ont gardé des symbiontes zooflagellés et les termites dits "supérieurs" ou évolués qui se sont beaucoup diversifiés. Le premier groupe intègre six familles (*Mastotermitidae*, *Hodotermitidae*, *Termopsidae*, *Serritermitidae*, *Kalotermitidae* et *Rhinotermitidae*) alors que le deuxième qui représente pourtant 75% des termites n'en compte qu'une seule (*Termitidae*). Ces familles sont clairement définies mais leur apparentement est toujours discuté.

Classifications fonctionnelles.

D'autres classifications plus fonctionnelles ont alors été proposées sur la base de critères morphologiques, alimentaires et comportementaux. Ces classifications plus empiriques et très utiles en écologie permettent également de mieux appréhender l'évolution et l'écologie globale des termites. On oppose généralement deux visions : celle de Abe (1987) regroupant les termites selon leur type d'habitat ("Lifetypes") et celle de Donovan (2001) basée principalement sur les différents types d'alimentation ("Feeding groups").

+ *Lifetypes*. L'habitat primitif des ancêtres aux termites se trouvaient certainement être à l'intérieur d'un bois mort dans lequel la colonie trouvait à la fois de la nourriture et un toit. Une des évolutions majeures a consisté en une séparation progressive de la nourriture et du nid. Ainsi, Abe distingue trois groupes : (i) Le nid à "une seule pièce", tel que l'habitat primitif, contenant toute la colonie qui par conséquent reste limitée en taille ; (ii) Le nid "intermédiaire" où la colonie vit toujours à l'intérieur du bois consommé mais prospecte également par un réseau de galeries vers de nouvelles sources de nourriture ; (iii) Les nids

“séparés” qui sont complètement distincts de la nourriture et obligent la colonie à de gros efforts de prospection. La classification peut être encore affinée en tenant compte des structures des nids qu’ils soient hypogé (souterrains), épigé (dépassant la surface du sol) ou arboricoles (dans ou sur les arbres).

+ *Feeding groups*. Eggleton et son équipe se sont plutôt focalisés sur les habitudes alimentaires des termites. La spécialisation puis la diversification alimentaire ont en effet été des événements clés du succès évolutif des termites. La matière cellulosique est certes peu nutritive, mais c’est une source de nourriture inépuisable. Aidés par la supériorité du nombre et de leur organisation sociale, les termites ont ainsi conquis de nombreuses niches écologiques faiblement concurrencées. On trouve chez les isoptères des espèces capables de consommer des substrats aussi variés que le bois à un état plus ou moins décomposé (bois sec ou humide), l’herbe et les petites graminées, le lichen (ou mousse et algues sur l’écorce des arbres), la litière de feuille et de bois, le sol minéral et le sol contenant encore des débris de bois. Le cas le plus extrême est celui des termites champignonnistes qui se nourrissent grâce au champignon extra-symbiotique qu’ils cultivent dans les loges de la termitière. En regroupant ces données et en examinant le contenu et plusieurs critères anatomiques du tube digestif, Donovan et al. (2001) ont proposé une hiérarchisation heuristique divisée en quatre groupes séparés statistiquement et suivant un gradient d’humification du matériel cellulosique: (i) le groupe I comprend les termites “inférieurs” mangeurs de bois, de litière et de graminées; (ii) le groupe II comprend les termites “supérieurs” avec le même type d’alimentation que le premier groupe ; (iii) le groupe III regroupe les termites “supérieurs” consommant le bois fortement décomposé ou le sol avec une forte proportion organique ; (iv) le groupe IV réunit les vrais humivores se nourrissant du sol minéral à relativement faible contenance organique.

En synthétisant les deux classifications, Eggleton et Tayasu (2001) retracent un schéma évolutif et écologique qui résume avec concision et intelligence les événements importants qui ont permis la radiation adaptative du monde des termites (Figure I-2).

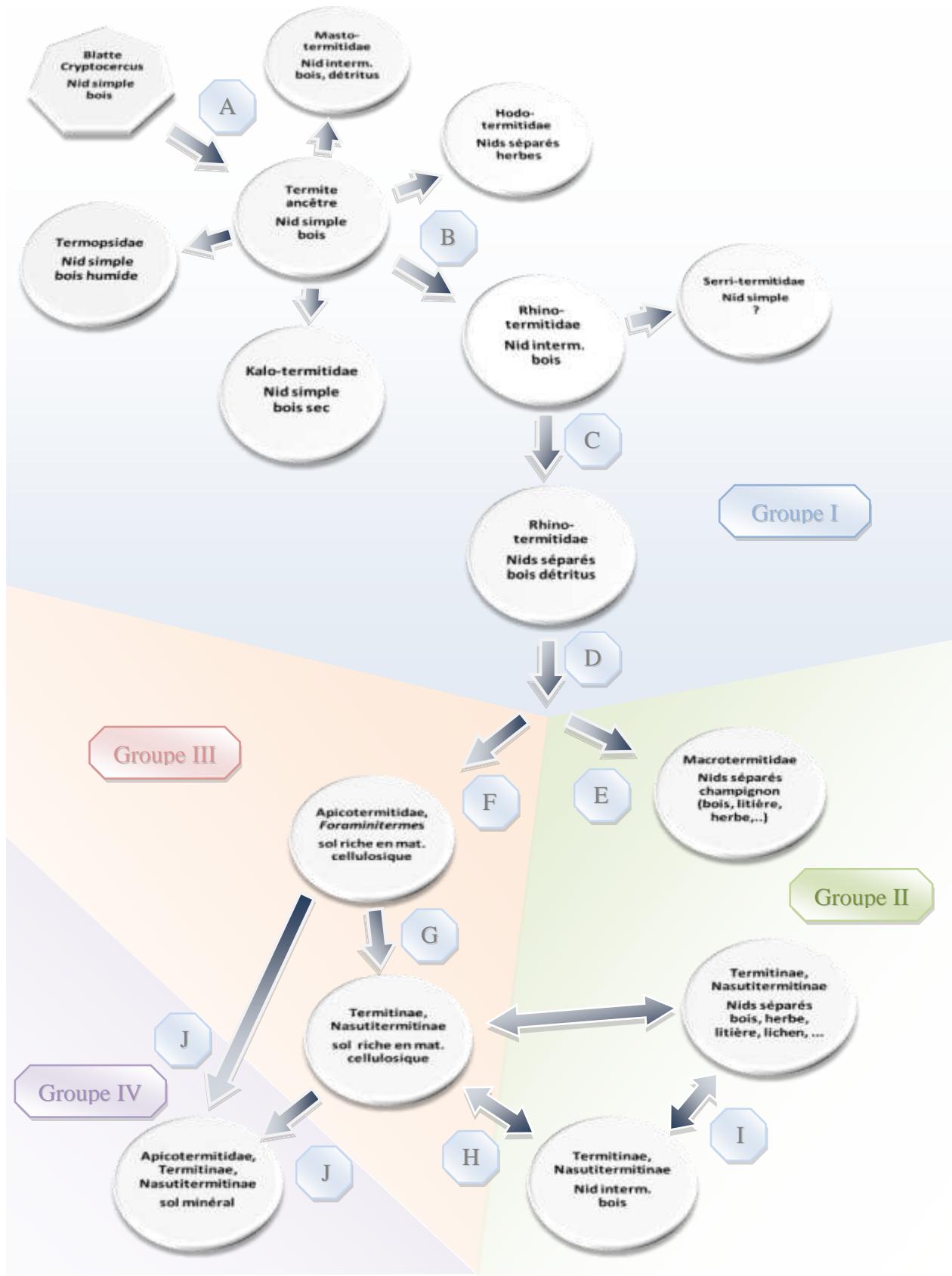


Figure I-2 | Schéma des transitions adaptatives dans l'histoire évolutive des termites. (Eggleton & Tayasu 2001)
 I : Non-Termitidae ; II : Termitidae non-humivores ; III: Termitidae humivore (soil-feeding) consommant le sol riche en matière organique; IV: Termitidae humivores (soil-feeders) consommant le sol minéral

A : Eusocialité ; B : Nid intermédiaire ; C : Nids séparés ; D : Perte des symbiontes flagellés ;
 E : Symbiose avec le *Termitomyces* ; F : Sol utilisé comme substrat de la nourriture ; G : Complexification du tube digestif unique chez les insectes ; H : “Retour” à la xylophagie et à la nidification intermédiaire ;
 I : Différenciation trophique et séparation des nids ; J : Digestion des éléments minéraux du sol.

I-3/ Le cas complexe du genre *Nasutitermes*.

Avec plus de 200 espèces largement diversifiées et réparties à travers toutes les régions tropicales du globe (pannéotropical), le genre *Nasutitermes* (Dudley 1890) forme l'un des groupes de termites les plus étonnant (Eggleton 2000 ; Miura et al. 2000). Classiquement, les *Nasutitermes*, encore appelés "nasutes", sont des espèces xylophages généralement arboricoles qui construisent de petits nids sphériques sur les branches des arbres. Dans ces petits habitats en "carton mâché", leurs colonies sont très populeuses et comptent souvent plusieurs centaines de milliers d'individus. Ils se reconnaissent facilement par les nombreux soldats qui arborent une protubérance céphalique en forme de pointe (Figure I-3). Celle-ci est une arme défensive qui leur permet de propulser une substance gluante sur leurs ennemis. Au sein de la sous-famille des *Nasutitermitinae*, les "vrais nasutes" se distinguent des "nasutes mandibulés" qui, eux, ont gardé des mandibules fonctionnelles.



Figure I-3 | Photographie d'un soldat de *Nasutitermes* sp.
source : Alex Wide 2003, Tree of Life.

A la fin du siècle dernier, la monophylie des *Nasutitermes* a été établie selon des critères morphologiques (Miller 1997), chimiques (Prestwich 1983) ou d'organisation sociale (Roisin 1992 ; Roisin 1996). Cependant, de nouvelles investigations basées sur des approches moléculaires montrent une énorme complexité des relations phylogénétiques et biogéographiques dans ce groupe d'espèces (Miura et al. 2000 ; Constantino 2002 ; Engel & Krishna 2005 ; Scheffrahn et al. 2005). D'après les plus récents travaux, les *Nasutitermes* semblent être un genre basal, xylophage et arboricole, généralisé dans les zones pantropicales, mais à partir duquel se seraient créés d'autres formes plus spécialisées (diversification

trophique) dans des endroits distincts du monde. Certaines de ces formes sont aujourd’hui considérées comme des genres à part entière. C’est le cas des nasutes consommant de la litière (*Velocitermes* et *Diversitermes* dans les régions néotropicales, *Longipeditermes* en Asie du sud-est), des ravageurs de culture (*Trinervitermes* en Asie et en Afrique, *Tumulitermes* en Australie), des fourrageurs à l’air libre (*Constrictotermes* dans les zones néotropicales, *Hospitalotermes* en Asie) et des termites souterrains ou vivant dans le bois (*Obtusitermes* et *Pavitermes* dans les néotropiques, *Niuginitermes* et *Diwaiterms* en Nouvelle Guinée, *Occasitermes* en Australie). Le genre *Nasutitermes* serait donc un genre “propagule”, comme le nomme P. Eggleton (Eggleton & Tayasu 2001), propice à de nombreuses radiations adaptatives (cf. la diversification alimentaire chez les espèces malgaches de *Nasutitermes*). C’est d’ailleurs le seul genre de terme qui renferme quasiment tous les “groupes alimentaires”, allant des xylophages aux humivores. L’évolution de ces complexes d’espèces n’est toujours pas résolue, est reste un pensum délicat pour les taxonomistes soucieux de leur classification.

II / Le tube digestif des termites : la clef du succès évolutif

Dans le monde des termites, il existe un autre univers caché. C’est un écosystème microscopique surpeuplé abritant plus de 10 milliards d’organismes au centimètre cube. Les conditions de vie y sont extrêmes, avec des zones dépourvues d’oxygène et des taux de basicité atteignant des records mondiaux. Au centre de cet univers, la dite “lumière” est d’une obscurité ténèbreuse. Ce monde est enfoui dans l’abdomen des termites, il s’agit bien sûr de leur tube digestif.

II-1/ Morphologie générale du tube digestif.

Bien plus élaboré qu’une panse de ruminants miniaturisée, l’intestin des termites est d’une remarquable complexité. Sa structure diverse témoigne, plus que tout autre élément anatomique, de la formidable évolution des termites. Leur examen morphologique est d’ailleurs un puissant moyen pour la détermination taxonomique des termites (Donovan et al. 2000). Respectant la structure de base des insectes, le tractus digestif est organisé en trois compartiments majeurs : l’intestin antérieur, l’intestin moyen et l’intestin postérieur (Noirot & Kovoor 1958 ; Grasse 1982 ; Noirot 1995).

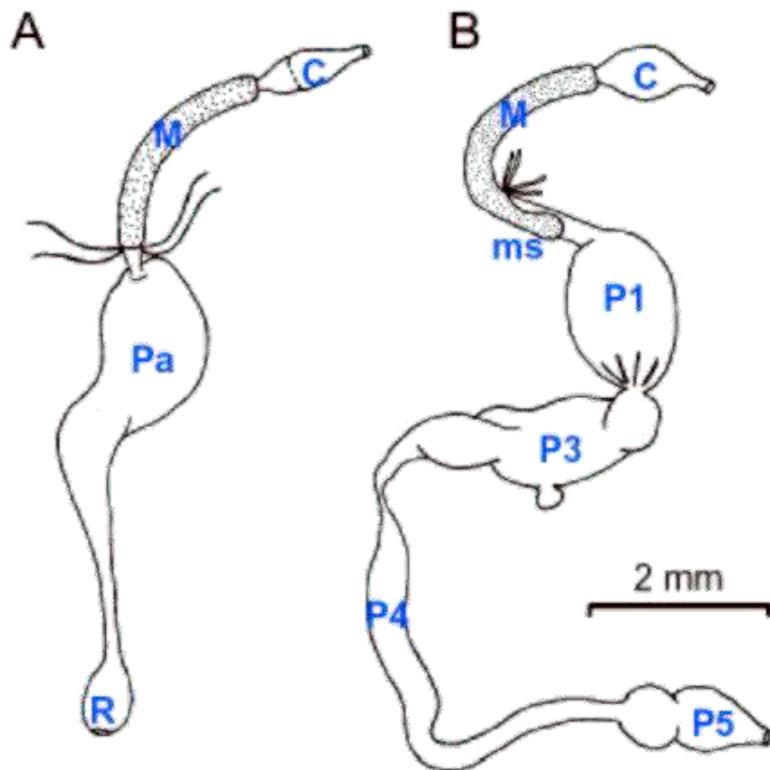


Figure I-4 | Structure du tube digestif d'une espèce de *Reticulitermes* (A) et de *Cubitermes* (B). (Brune 2006).
 C : Jabot ; M : Mésentéron ; ms : Segment mixte ; R : Rectum ; P1-P5 : Segments proctodéaux.

(i) *L'intestin antérieur (ou stomodeum)* est relativement classique. D'origine ectodermique, il part du pharynx et se termine par la valvule œsophagienne. La structure principale est le jabot qui s'individualise en gésier. Caractérisé par une forte musculature et un épithélium complexe, il forme un petit renflement où les aliments sont broyés. Contrairement aux vertébrés herbivores, l'intestin antérieur des isoptères n'a pas de rôle de fermenteur.

(ii) *L'intestin moyen (ou mésentéron)* est, comme chez la plupart des insectes, un lieu important de la digestion. D'origine endodermique, l'épithélium est relativement uniforme, caractérisé par des cellules en brosse assurant la sécrétion d'enzymes digestives. C'est là que se ferait la dégradation de la cellulose, des hémicelluloses et d'autres polysaccharides (Bignell 2000). Plusieurs publications ont en effet montré que le terme est capable de produire sa propre cellulase (endoglucanase) au niveau des cellules mésentériques et des glandes salivaires (Watanabe et al. 1998 ; Tokuda et al. 2002). Bien que le sujet soit encore débattu, il semblerait que les termites “supérieurs” assure eux-mêmes une partie de leur activité cellulolytique alors que chez les termites “inférieurs” la cellulolyse serait principalement effectuée par les protozoaires flagellés. (Li et al. 2002 ; Bignell 2000).

(iii) *L'intestin postérieur (ou proctodeum)*, d'origine ectodermique, commence au niveau des tubes de Malpighi -organes excréteurs de l'insecte- et termine le tube digestif. Il est clairement le fragment entérique ayant subi le plus de modifications au cours de l'Evolution. Pour les espèces primitives de termites, il consiste surtout en une poche dilatée, la panse, contenant les symbiontes flagellés. Mais l'organisation devient beaucoup plus complexe chez les termites "supérieurs" avec notamment une compartimentation poussée à l'extrême chez les humivores. Bignell et Eggleton (1995) corrèlent ainsi la complexification de l'appareil digestif avec la baisse de qualité de la nourriture consommée (du bois au sol). L'intestin postérieur est divisé en cinq parties : Le premier segment (IP1) est un tube plus ou moins long, parfois dilaté qui débouche sur la valvule entérique (IP2). Cette dernière, considérée comme le deuxième segment, contrôle le flux de nourriture entrant dans la panse (IP3). C'est au niveau de ce troisième segment très dilaté que se situe la majorité de la microflore symbiotique et toute l'activité fermentaire. Enfin, le tractus redevient tubulaire sur le quatrième segment (IP4) et se termine en ampoule rectale (IP5) contenant les excréments.

II-2/ Microhabitats et adaptations structurelles

La modification de l'organisation spatiale et de la physiologie du tube digestif des termites est sans doute l'aspect le plus accessible de la formidable coévolution entre les symbiontes et leur hôte. Tout semble avoir été développé pour accueillir les microorganismes dans des conditions optimales, tant par des structures physiologiques adaptées que des environnements physicochimiques contrôlés. Le long du tractus intestinal, les microorganismes ne se répartissent pas de manière aléatoire ; ils colonisent des micro-habitats distincts qui leur offrent les meilleures conditions de croissance.

Structures d'accueil des micro-organismes

Plusieurs éléments structurels permettent aux symbiontes de se développer à la surface du tube digestif sans être entraîné par le bol alimentaire. Dans l'intestin moyen par exemple, il existe une protection muqueuse commune à plusieurs insectes qui sépare l'épithélium mésentérique du contenu intestinal et "piège" les microbes symbiontes (Terra 1990). Constituée de mucoprotéines et de chitine, cette membrane, dite péritrophique, fonctionne à la manière d'un filtre en laissant passer dans un sens les enzymes sécrétées et dans l'autre les produits de la digestion. Sous cette membrane, se trouve un espace densément colonisé par une microflore bactérienne distincte (Breznak & Pankratz 1977). Celle-ci semble associée intimement aux microvillosités cellulaires et reste ainsi protégée du flux alimentaire. De

même, des observations en microscopie électronique ont montré que de nombreux microorganismes restaient accrochés aux parois de la panse de différents termites (Breznak & Pankratz 1977 ; Yara et al. 1989). Dans cette partie de l'intestin postérieur, l'épithélium chitineux présente de nombreux replis, des épines cuticulaires et autres ornementations caliciformes qui sont autant de sites d'attachement pour la microflore digestive (Figure I-5 ; Bignell et al. 1979). Un autre cas assez insolite et bien documenté est celui des procaryotes ectobiotiques qui s'installent sur la surface des protozoaires flagellés (Inoue et al. 2000 ; Brune & Stingl 2005). Cette association tripartite (termite-protozoaire-bactérie) est facilitée par des structures spécialisées mises à disposition par les protistes (Cleveland & Grimstone 1964 ; Brune & Stingl 2005).

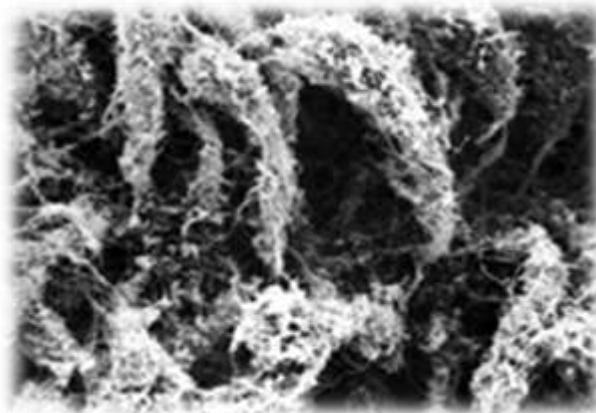


Figure I-5 | Epines cuticulaires de la panse du terme *Procubitermes aburinessi*, montrant des bactéries filamenteuses (type-actinomycètes) accrochées (Bignell 1979).

Le segment mixte

Le tube digestif de quelques termitidés atteint un degré supplémentaire de sophistication par la présence d'une structure composite unique chez les insectes. Cette formation originale constituée par le chevauchement d'une section proctodéale avec une section mésentérique est appelée le segment mixte (Figure I-6). Les renflements de cette structure seraient propices à sa colonisation par de nombreuses bactéries filamenteuses et clostridiennes (Bignell et al. 1983) mais l'évolution et la fonction du segment mixte ne sont toujours pas élucidées. Sa partie mésentérique pourrait être un site important d'échange cationique libérant de grande quantité d'ions potassium (Bignell 2000). Ces fluides cationiques auraient pour conséquence d'elever le pH de la panse (Brune & Kühl 1996). La structure composite de cette zone aurait également un rôle de régulateur du flux alimentaire et

contrôlerait ainsi l'irrigation de l'intestin postérieur. Assurer un flux constant de substrat est un gage d'efficacité pour l'activité microbienne. De cette manière, le tube digestif agit comme un chemostat stimulant la microflore et assurant son exposition continue et prolongée avec le contenu digestif (Bignell 1983). D'autres dilatations proctodéales permettent également d'accroître le temps de rétention du bol alimentaire qui est proche de 24 heures chez les xylophages et de 48 heures chez les humivores (Bignell 1994).

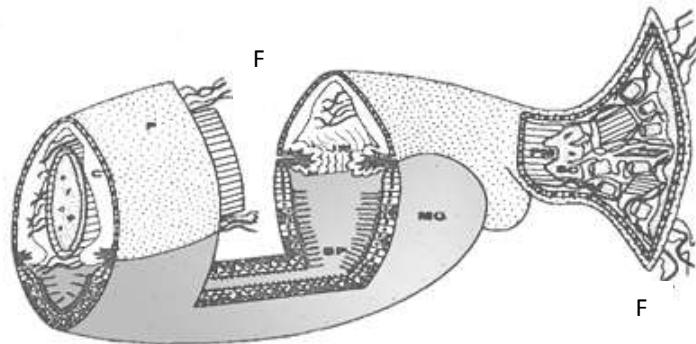


Figure I-6 | Segment mixte de termite *Cubitermes severus* (Bignell 1979).

La partie grisée correspond à la composante mésentérique, la partie en pointillé à la composante proctodéale, les filaments (F) correspondent à des bactéries de type actinomycétal.

II-2/ L'environnement physicochimique

La compartimentation de l'intestin des termites n'est pas uniquement le fruit d'un développement anatomic, elle est aussi largement induite par l'environnement physico-chimique du tractus digestif. Les gradients de pH, d'oxygénation et d'autres métabolites (dont la source de carbone) conditionnent particulièrement la répartition spatiale des populations microbiennes.

pH. Selon plusieurs études, il apparaît que le pH intestinal global de la plupart des termites se rapproche de la neutralité (Bignell & Anderson 1980 ; Brune et al. 1995). Pourtant, chez les termitidés (à l'exception des termites champignonnistes), les premières parties de l'intestin postérieur (IP1) sont très alcalines, atteignant même les valeurs les plus élevées du monde vivant (11-12,5) chez les termites humivores (Brune & Kühl 1996). Cette augmentation de la basicité serait due à une forte concentration en ions K⁺ sécrétés par le segment mixte qui permettrait la solubilisation de la matière organique. La matière organique serait ensuite digérée par les bactéries spécialistes situées dans la panse (Bignell 2000).

O_2 . Il existe également un gradient d’oxygénation dans le tube digestif des termites. Pourtant, celui-ci a longtemps été considéré comme entièrement anaérobie à l’image de l’intestin des ruminants. L’existence d’une zone aérobie a clairement été démontrée à l’aide de microélectrodes permettant la mesure *in situ* du taux d’oxygène et du potentiel redox (Brüne et al. 1995). Pour tous les termites étudiés, les auteurs montrent que la périphérie de la panse est aérobie, l’oxygène pénétrant sur 50 à 200 μm dans la lumière. Vers le centre du tube, le milieu devient anaérobie et plus riche en hydrogène (Figure I-7 ; Brune 1998). Les cellules intestinales étant directement en contact avec les gaz atmosphériques grâce aux nombreuses trachées qui assurent la respiration des insectes, il n’est pas étonnant que l’oxygène entre par diffusion dans le système digestif. Loin d’un simple fermenteur anoxique, le tractus intestinal des termites constitue donc un système hétérogène hautement structuré, tant radialement que longitudinalement. Dans cet univers, les microorganismes symbiontes se partagent l’espace selon leur préférence métabolique, qu’ils aient besoin d’oxygène pour dégrader des composés récalcitrants (comme les molécules aromatiques dérivées de la lignine) ou qu’ils utilisent plutôt l’hydrogène comme les bactéries homoacétogènes ou méthanolgènes.

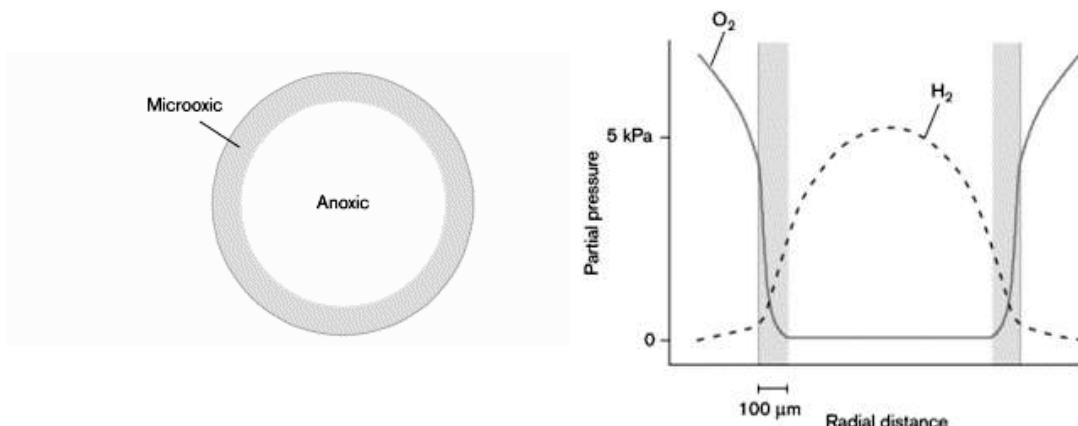


Figure I-7 | Gradients de dihydrogène et d’oxygène au niveau de la panse de *Reticulitermes flavipes* (Brune 1998).
Discrimination entre la partie anoxique au centre du tube digestif et la partie aérobie en périphérie.

II-3/ Les mécanismes de la digestion

La haute sophistication de l’intestin des termites associée à l’efficacité de sa microflore particulière font de ce système digestif le “plus petit bioréacteur du monde” (Brune 1998). Théoriquement, les termites seraient capables de transformer une feuille de papier A4 en deux litres d’hydrogène (Brune 2007). Cette observation a engendré une certaine émulation scientifique qui a placé les termites comme de potentiels “producteurs de biocarburants”. Plus

précisément, ce sont les enzymes produites par les bactéries symbiontes qui intéressent le département américain de l'énergie (DOE JGI) avec l'objectif d'améliorer la production d'éthanol à partir de composés végétaux (Warnecke et al. 2007). Pourtant, avant de reproduire le métabolisme intestinal des termites dans le moteur de nos véhicules, nous sommes aujourd'hui encore loin de comprendre correctement les associations digestives chez les termites. En dépit d'une centaine d'années de recherche sur le sujet, nous savons concrètement que le terme ne peut pas survivre sans sa microflore intestinale, et que dans de nombreux cas, ces micro-organismes sont des spécialistes, qui ne vivent pas en dehors des termites. En revanche, il n'existe pas encore de schéma clair et approfondi des processus digestifs réalisés par les symbiontes et des engrenages biochimiques mis en jeu (Brune 2006). Les mécanismes fins du mutualisme microbien restent encore énigmatiques. La réunion de plusieurs éléments peuvent nous permet néanmoins de proposer une représentation synthétique de ce que pourraient être ces mécanismes digestifs -notamment chez les termites "inférieurs" (Figure I-8 ; Slaytor 2000 ; Brune 2006 ; Ohkuma 2003 ; Brugerolle & Radek 2006 ; Warnecke et al. 2007).

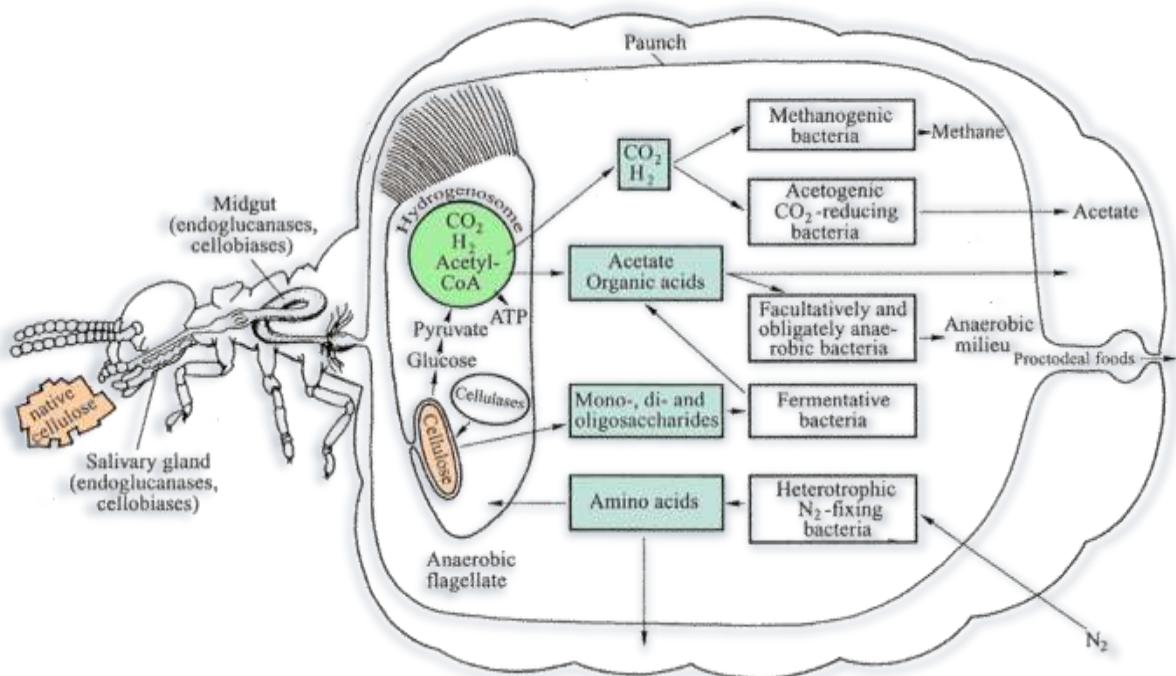


Figure I-8 | Schéma simplifié des processus digestifs ayant lieu dans la panse d'un terme "inférieur" (Brugerolle & Radek 2006).

Les fonctions remplies par les flagellés sont remplacées par l'action du *Termitomyces* chez les *Macrotermitinae* ou par les bactéries symbiontes ou le terme lui-même chez tous les autres *Termitidae*.

III / La symbiose digestive

III-1/ Le rôle des symbiontes

Les recherches accumulées sur la symbiose digestive (notamment sur les bactéries isolées en culture) nous permettent d'appréhender les activités associées à la microflore intestinale (Rouland-Lefèvre & Bignell 2001 ; Brune 2006).

(i) Le métabolisme de la cellulose et de l'hémicellulose.

C'est la fonction couramment citée pour la microflore symbiotique. Elle consiste à dégrader les macromolécules végétales (cellulose, lignine, hémicellulose, composés aromatiques...) pour permettre leur assimilation par les termites. De nombreux isolats ont ainsi montré une certaine capacité à dégrader les différents constituants du bois (König et al. 2006). Une importante étude sur le métagénome d'une espèce de *Nasutitermes*, publiée récemment dans *Nature*, indique que de nombreuses enzymes d'origine bactérienne pourraient être impliquées dans la décomposition des structures ligno-cellulosiques (Warnecke et al. 2007). De même, la contribution des protozoaires ou du champignon exosymbiotique dans ce rôle digestif a largement été montrée (Inoue et al. 2000 ; Brune & Stingl. 2005 ; Ohkuma et al. 2003 ; Rouland-Lefèvre et al. 2006). Pour la plupart des microbiologistes, c'est l'exemple type de symbiose digestive cependant, cette fonction est depuis quelque temps remise en question, surtout depuis que l'on sait que le terme est capable de produire ses propres enzymes cellulolytiques (Tokuda et al. 2002 ; Ohkuma et al. 2003 ; Li et al. 2006).

(ii) La dégradation partielle de polymères aromatiques.

Dans la nature, la cellulose est souvent renforcée mécaniquement par ses liaisons avec les lignines. La lignine est un polymère aromatique qui est particulièrement difficile à décomposer. Seuls certains microorganismes (dont les champignons et les actinomycètes) sont capables de le réaliser cette hydrolyse. En ce qui concerne, la microflore associée au tube digestif des termites il a été montré qu'elle présentait des activités de déméthylation, déacétylation, décarboxylation et même de lyse des noyaux aromatiques (Brune 2006). Quelques bactéries isolées du tractus digestif de termites montrent aussi des capacités de solubilisation de la lignine ou de ses dérivés (Kuhnigk et al. 1994 ; Harazano et al. 2003 ; König et al. 2006).

(iii) *La consommation d'oxygène (et la capture d'électrons).*

Cette fonction est notamment importante pour réguler les conditions anaérobies et oxydo-réductrices à l'intérieur du tractus intestinal. Certaines bactéries, situées en périphérie, telles que les bactéries réductrices de sulfate (*Desulfovibrio*), utilisent l'oxygène intestinal aussi vite qu'il arrive (Brune et al. 1995). L'oxygène est un élément indispensable pour certaines réactions chimiques telles que la dénaturation des composés aromatiques dérivés de la lignine ou de l'acide humique (Kappler & Brune 2002) mais, la partie centrale de l'intestin doit absolument être anoxique pour que d'autres organismes puissent développer un métabolisme fermentaire, comme les bactéries lactiques ou les *Bacteroidetes*.

(iv) *L'économie de l'azote.*

C'est un des principaux défis que le termite doit relever en mangeant uniquement du bois naturellement pauvre en azote. Plusieurs voies sont empruntées pour arriver à cette fin. Certains termites se nourrissent préférentiellement de bois dégradé par des champignons ou de la matière organique humifiée du sol riche en azote (Breznak 2000). Plus communément et comme d'autres insectes, les termites sécrètent de l'acide urique par les tubes de Malpighi qui est transformé par la microflore intestinale anaérobie en ammonium (Lenoir-Labé, 1998). La concentration en ammonium dans la panse peut-être très élevée, de l'ordre de 3mM chez *Nasutitermes walkeri* (Slaytor & Chappell 1994). L'ammonium est ensuite assimilé par la biomasse microbienne que le terme excrete dans ses fèces. Le cycle de l'azote est bouclé quand les termites ingèrent ce qu'ils ont rejeté, assimilant l'azote dans les premiers segments intestinaux. Les microbes intestinaux peuvent également, dans certains cas, fixer l'azote atmosphérique. Enfin, une certaine activité nitrogénase a été montrée chez plusieurs espèces, par la détection des gènes *nifH* (Ohkuma et al. 1999 ; Ohkuma et al. 2006).

(v) *La production et la consommation d'hydrogène (et d'électrons) par acétogenèse et méthanogenèse.*

Il existe au centre de la panse une accumulation très importante d'hydrogène qui diminue brutalement en périphérie (Schmitt-Wagner & Brune 1999). Ceci tendrait à prouver que l'hydrogène jouerait un rôle clé dans les processus digestifs (Pester & Brune 2007). Plusieurs études montrent que ce sont les protozoaires flagellés et les bactéries fermentaires (clostridies) qui produisent de grandes quantités de dihydrogène (Brune & Stingl 2005). A l'inverse, certaines bactéries utilisent intensément l'hydrogène produit, les bactéries homoacétogènes ou méthanogènes. La production d'acétate semble être une composante majeure de l'activité microbienne (Breznak 2000). Des études moléculaires portant sur le

gène codant pour la FTHFS (formyl tetrahydrofolate synthase) indiquent cependant que les spirochètes seraient responsables de la majorité des activités acétogènes dépendantes en dihydrogène (Pester & Brune 2006). L'autre voie de consommation de ce gaz est la production de méthane réalisée par des archéobactéries spécialisées (Brauman et al. 1992).

(vi) *L'humification.*

Par leurs différentes activités métaboliques, les bactéries produisent des composés carbonés qui ne sont pas assimilables par le terme. Ces composés insolubles se fixent aux colloïdes et aux minéraux du sol pour former de l'humus. Bien que n'apportant rien directement au terme, le processus est toutefois bon pour les écosystèmes, puisqu'il rend le sol fertile. Dans ce sens, les termes sont donc les fertilisateurs de leur propre environnement et assurent ainsi leur avenir (Rouland-Lefèvre & Bignell 2001).

III-2/ Evolution de la symbiose

L'évolution des termes serait donc intimement liée à celle de leur microflore digestive mais ce thème de recherche reste encore largement inexploré (Bignell 2000). Aujourd'hui nous ne connaissons que les grands traits de l'évolution digestive chez les termes (Eggleton 2006). Celle-ci commence par l'acquisition de protozoaires flagellés permettant aux termes dits "inférieurs" et aux espèces de *Cryptocercus* de digérer la matière cellulosique. Puis, les termes hormis le genre le plus primitif (*Mastotermes*) perdent l'endosymbionte propre aux blattidés (*Blattobacterium*). La perte des flagellés est ensuite l'autre événement clé de l'évolution en faisant apparaître la famille des Termitidés. Celle-ci se diversifie avec l'acquisition pour certains (les Macrotermitinés) d'un champignon exosymbiotique ou pour d'autres (comme les termes humivores), la complexification de leurs communautés bactériennes à travers un tube digestif hautement compartimenté.

Par ailleurs, il est intéressant, dans un système mutualiste, de regarder l'histoire au niveau des deux partenaires. Les vrais vainqueurs de l'Evolution ne pourraient-ils pas être alors les micro-organismes spécialisés du tube digestif des termes plus que les termes eux-mêmes. En effet, ces derniers occupent un milieu protégé qu'ils ont même contribué à améliorer. Grâce la co-évolution, ils ont développé un environnement adapté, leur livrant, tel un chemostat, une source constante de nourriture. Dans ces habitats, protégés de la concurrence et peut-être aidés biologiquement par leur hôte (facteurs de croissances, nutriments rares), ils ont pu évoluer et ainsi former des groupes phylétiques uniques dans la Nature (Hongoh et al. 2005). Toute cette évolution s'est réalisée en association non seulement

avec le termite mais également avec l'ensemble des différentes communautés microbiennes. Enfin, ce qui est sûrement une performance pour des organismes inertes, ils ont colonisé un organisme mobile ce qui leur a permis de se répartir sur une grande partie de la planète.

III-3/ Diversité de la symbiose digestive

Dans le tube digestif des termites, la variété des micro-organismes associés est remarquablement importante : protozoaires flagellés, champignons, levures, archéobactéries et bactéries filamenteuses, spiralées, cocoïdales ou en bâtonnets. Cette diversité est, aujourd’hui, de mieux en mieux connue grâce à l’apport de la biologie moléculaire (Ohkuma et al. 2006). Une très faible minorité de la microflore intestinale a été cultivée ; la plupart de nos connaissances se base sur les banques de clones réalisées à partir du séquençage de l’ADNr 16S.

La symbiose avec les protozoaires.

Parmi les relations mutualistes entretenues dans l’intestin du terme, la symbiose avec les protistes flagellés est un cas d’école. La panse est remplie par ces eucaryotes (1/3 de la masse du terme). Initialement considéré comme des parasites (Leidy 1881 ; Koidzumi 1921), il faut attendre les travaux de Cleveland en 1925 et 1926 pour comprendre que ces protistes forment une microfaune symbiotique permettant au terme de digérer la cellulose. Il existe de nombreuses espèces appartenant aux oxymonadines ou aux parabasaliens (Brugerolle & Radek 2006). Leur rôle dans la digestion de la cellulose a été de nombreuses fois établi par des expériences en culture, en enzymologie, de défaunation ou en biologie moléculaire.

Les procaryotes associés aux protozoaires.

Symbiontes de symbiontes, il existe également des populations bactériennes qui sont associées à la surface (épibiontes) ou dans le cytoplasme (endobiontes) des protistes intestinaux des termites. Ces associations étonnantes ont largement été documentées par des observations en microscopie électronique (Inoue et al. 2000) mais on connaît peu le rôle que jouent ces bactéries, ni la nature de leurs interactions métaboliques avec leur hôte. De récentes analyses moléculaires ont permis d’en savoir plus sur leur diversité : on détecte ainsi des membres des *Bacteroidales*, d’un nouveau phylum d’*Endomicrobia* (Termite Group 1), des *Methanoarchaeae* et des spirochètes du genre *Treponema* (Tokura et al. 2000 ; Brune & Stingl 2005 ; Yand et al. 2005 ; Ohkuma 2008). Les expériences menées par Odelson et Breznak en

1985 avaient déjà montré qu'au moins une partie d'entre eux étaient des méthanogènes. Ils appartiennent au genre *Methanobrevibacter* et sont phylogénétiquement différents de ceux de la paroi intestinale (Tokura et al. 2000). Par ailleurs, les spirochètes ectobiontes, fixés à la surface des zooflagellés au niveau de sites d'attachement, seraient impliqués dans la locomotion de leur hôte. L'étude de cette microflore particulière nécessite encore de se développer (Brune & Stingl 2005).

*La symbiose externe avec le champignon *Termitomyces*.*

La relation mutualiste entre les termites et le champignon *Termitomyces* sp. est un exemple rare de symbiose digestive (Rouland-Lefèvre & Bignell 2001 ; Rouland-Lefèvre et al. 2006). Peut-être aussi évidente que la relation avec les protistes, les naturalistes du début du siècle dernier -voire même avant par les travaux de G. Gardner (1799) ou J. D. König (Petch 1913) ont très vite noté que certains termites cultivaient dans leur nid un champignon formant de larges carpophores hors de la termitière (Figure I-9) et de petits nodules (mycotètes) dedans. Ces termites sont tous de la famille *Macrotermitinae* (Grassé 1959) et ces champignons du genre *Termitomyces* (Heim 1941). Convergentes bien que fondamentalement différentes des fourmis champignonnistes, leurs interactions obligatoires et leur évolution conjointe (Aanen et al., 2002) ont été récemment étudiées. Les ouvriers récoltent à l'extérieur de la termitière de la matière végétale qu'ils pré-digèrent, défèquent et utilisent pour la construction de structures alvéolaires, les meules, placées dans des loges particulières à l'intérieur du nid. Ces structures sont ensemencées avec le mycelium du *Termitomyces* qui s'y développe et dégrade les composés ligno-cellulosiques. Les ouvriers consomment alors les meules âgées, la digèrent et/ou la distribuent au reste de la colonie. Aujourd'hui, le rôle précis de l'exosymbionte fongique est encore discuté (Slaytor 1992 ; Crosland et al. 1996 ; Rouland-Lefèvre & Bignell 2001). Si on sait qu'il est une source sûre d'azote, d'eau et de nombreux produits métaboliques, il semblerait plutôt jouer le rôle de décomposeur de la lignine que de la cellulose. Cette dernière fonction serait réalisée par le terme lui-même bien que des transferts d'enzymes provenant du *Termitomyces* soit avérée (Martin & Martin 1978 ; Rouland et al. 1988). Le champignon est donc un élément indispensable à la nutrition du terme et les termites permettent au champignon de se développer dans des conditions idéales de température, de pH, de substrat et isolé de tous compétiteurs. Cette symbiose très aboutie est souvent citée en exemple au même titre que les mycorhizes ou le lichen.



Figure I-9 | Photographie de carpophores de *Termitomyces eurhizus* provenant d'une meule à champignon de termes de l'espèce *Macrotermes sp.*
source : NMNS Taïwan

La symbiose avec les levures.

Beaucoup moins connus, des champignons unicellulaires se développant dans le tube digestif des termites ont été signalés par plusieurs auteurs (Prillinger & König 2006). Les informations sur ces levures sont très rares, elles se basent essentiellement sur l'isolement en culture de souches à partir de l'intestin de différentes espèces de termites. Ces levures appartiennent aux *Endomycetales* pour les genres *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia* et *Sporothrix* ou aux *Basidiomycetes* pour le genre *Trichosporon*. Et bien que ces espèces soient capables de dégrader les matières cellulosiques et hémicellulosiques, leur rôle et leur persistance dans le tube digestif n'ont pas encore été démontrés.

La symbiose avec les prokaryotes.

La microflore bactérienne est la plus importante et la plus diversifiée du système digestif (Brune, 2006) mais sa nature et son fonctionnement ont longtemps été ignorés au profit des symbioses beaucoup plus flagrantes avec les protozoaires ou avec le champignon *Termitomyces*. Plusieurs techniques ont néanmoins permis d'appréhender cette immense diversité microbienne. L'approche microbiologique par isolement sur boîte de Pétri a apporté, dans un premier temps, beaucoup d'informations sur les capacités métaboliques des souches provenant des broyats de tubes digestifs (König et al. 2006). En revanche, les biais liés à la

culture n'ont jamais permis d'avoir une représentation correcte de la réelle structure des communautés bactériennes (Schultz & Breznak 1978 ; Tholen et al. 1997 ; Eutick et al. 1978 ; Breznak 2000). La microflore intestinale de divers termites a ensuite été étudiée en microscopie électronique (Czolij et al. 1985 ; Bignell et al. 1980 ; Yara et al. 1989 ; Breznak & Pankratz 1977). Plus de 30 morphotypes bactériens différents par espèce de termites ont ainsi pu être distingués dont des actinomycètes et des spirochètes. Il faut cependant attendre le milieu des années 1990 pour voir émerger des approches moléculaires indépendantes de la culture, permettant donc d'analyser la structure des communautés bactériennes. Basées essentiellement sur l'amplification par PCR, le clonage et le séquençage du gène codant l'ARNr 16S, ces études moléculaires ont permis d'identifier des bactéries jusqu'alors inconnues (Ohkuma & Kudo 1996 ; Ohkuma et al. 2003 ; Schmitt-Wagner et al. 2003 ; Hongoh et al. 2003 ; Hongoh et al. 2005 ; Yang et al. 2005 ; Shinzato et al. 2007 ; Fall et al. 2007 ; Mackenzie et al. 2007). Cependant, quelques imprécisions liées aux limites de la PCR empêchent encore une analyse exhaustive de la diversité bactérienne. Afin de contourner ce biais, Hongoh et al. (2003) ont analysé 1923 séquences issues de 16 banques de clones réalisées dans différentes conditions d'amplification. La microflore bactérienne intestinal des termites serait composée majoritairement de spirochètes, de clostridies, de protéobactéries, de bactéries du groupe CFB (*Bacteroides/Flavobacterium*), d'actinobactéries et d'*Endomicrobia* (également nommé "Termite Groupe 1"). Plusieurs phyla minoritaires sont aussi détectés (*Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *Acidobacteria*, etc) et une population procaryotique particulière, celle des archéobactéries, majoritairement méthanogènes (*Methanobrevibacter*), est également présente.

III-4/ La microflore actinomycétale des termites

Premières découvertes.

Les actinomycètes ont été parmi les premiers organismes procaryotes à être cultivés à partir de l'intestin des termites (Hungate, 1946 ; Sebald et Prévost, 1962). Deux souches de *Micromonospora* (*M. propionici* et *M. acetoformici*) ont été isolées et leurs fortes capacités cellulolytiques caractérisées. La présence de bactéries filamenteuses -caractéristiques des morphotypes actinomycétaux- est confirmée par l'observation *in situ* en microscopie électronique (Figure I-10Figure I-11 ; Breznak & Pankratz 1977 ; Bignell 1979 ; Bignell et al. 1980 ; Brauman 1983). Qui permet de détecter clairement des agrégats bactériens filamentueux recouvrant plus ou moins densément l'épithélium intestinal du mésentéron et de la panse.

Cette microflore serait donc relativement abondante et intimement associée au tube digestif des termites, notamment au niveau des épines cuticulaires intestinales sur lesquelles semblent s'accrocher le mycélium actinomycétal (Bignell et al. 1980). Depuis de nombreuses souches de streptomycètes (Bignell et al. 1979) ainsi que des souches appartenant souvent à des groupes « rares » ont pu être isolées : *Actinomadura*, *Arthrobacter*, *Aureobacterium*, *Cellulosimicrobium*, *Cellulomonas*, *Geodermatophilus*, *Isoptericola*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Microbispora*, *Micrococcus*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus*, *Saccharopolyspora*, *Nocardia* (König et al. 2006). La plupart des actinomycètes cultivés montrent des potentialités enzymatiques intéressantes (cellulases, xylanases, uréases, enzymes dégradant les polymères aromatiques) (Pasti and Belli. 1985 ; Pasti et al. 1990 ; Kuhnigk et al. 1994 ; Maeda et al. 1995 ; Shäfer et al. 1996 ; Rouland & Lenoir-Labé 1998 ; Wenzel et al. 2002 ; Bakalidou et al. 2002). Pourtant, leur implication effective dans les processus digestifs des termites n'a jamais pu être démontrée. Au contraire et selon les approches moléculaires, la représentativité des actinomycètes dans la diversité de la microflore symbiotique serait plus faible que ce que laissait penser les observations en microscopie électronique (Tholen et al. 1997).

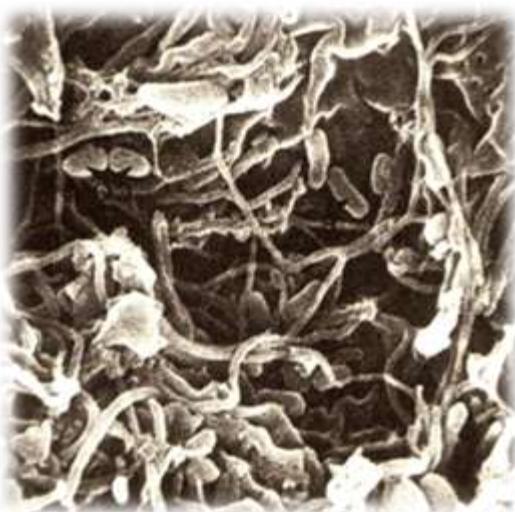


Figure I-10 | Photographie au microscope électronique à balayage de la panse de *Naustitermes arborum*, montant des filaments actinomycétaux (Brauman 1983)



Figure I-11 | Filaments (actino?)bactériens colonisant l'intestin moyen de *Cubitermes severus*. (D. Bignell et al. 1991)

Dernières avancées.

Ces dix dernières années, l'apport de la biologie moléculaire a permis de décrire précisément la diversité microbienne habitant le tube digestif de différentes espèces de termites mais, parmi les banques de clones réalisées, les séquences d'actinomycètes sont rares voire inexistantes et irrégulièrement décelées d'une étude à l'autre (Nakajima et al. 2006). C'est chez les termites humivores (*Cubitermes spp.*) que l'on retrouve le plus de phylotypes actinobactériens référencés (Fall et al. 2007) clairement différenciés de ceux de l'environnement proche du terme qu'ils s'agissent du sol ingéré ou des parois de la termitière. En 2005, Nakajima et coll. localisent *in situ* les propionibactéries spécifiques aux termites par un marquage fluorescent (FISH). Ces actinomycètes colonisent massivement les parois de la panse des ouvriers de *Reticulitermes speratus* ce qui tend à confirmer les observations faites au microscope quelques années auparavant (Brauman 1983 ; Bignell et al. 1980 ; Breznak & Pankratz 1977). Malgré ces dernières avancées, la représentativité réelle et le rôle de cette microflore particulière n'ont toujours pas été établis.

IV / Les Actinomycètes

IV-1/ Les actinomycètes : un embranchement à part

Définition

Les actinomycètes (ou *Actinobacteria*, Lynn Margulis) sont un groupe à part dans le monde bactérien qui a longtemps été classé parmi les champignons. Ce sont des bactéries Gram-positifs à taux élevé en bases GC (55%) pouvant former des hyphes à l'un de leur stade de développement (Stackebrandt et al. 1997). Le mot "actinomycètes" signifie en grec "champignons rayonnants", expression également utilisée en anglais (ray fungi), en allemand et en russe (Krassilnikov 1938). Ainsi ont-ils été désignés en référence soit à la morphologie des jeunes colonies dont les hyphes ramifiées rayonnent à partir du centre de la croissance, soit à la disposition radiée des hyphes épaissies en massues que l'on trouve dans les concrétions que produisent les formes pathogènes. Les formes les plus évoluées des actinomycètes rivalisent en complexité morphologique avec les moisissures (champignons imparfaits) mais en diffèrent radicalement puisque, comme toutes les autres bactéries, ce sont des procaryotes. Un corollaire de leur structure cytologique est le diamètre de leurs hyphes qui est de l'ordre de 0,5 mm, soit approximativement un dixième de celui de la plupart des hyphes fongiques (Williams & Wellington 1982).

Taxonomie et diversité.

Leur taxonomie a évolué avec le développement des techniques. En 1970, H. A. et M. P. Lechevalier proposent une classification des actinomycètes fondée sur des caractères morphologiques et chimiques qui permet de grouper les actinomycètes en genres faciles à caractériser. Les critères chimiques utilisés utilisent surtout la nature de leurs parois cellulaires et des lipides. Actuellement, la classification des actinomycètes repose sur la composition des constituants pariétaux, selon la présence/absence de l'acide DiAminoPimélique (DAP) et de sa forme isomérique (méso ou L). Les groupes représentant la forme méso sont différenciés entre eux par la présence de certains sucres après l'hydrolysat des bactéries. Plus récemment, le séquençage de l'ARNr 16S a permis de distinguer 7 groupes majeurs qui sont en accord avec les résultats obtenus avec les groupements chimiques (Embley & Stackebrandt 1994).

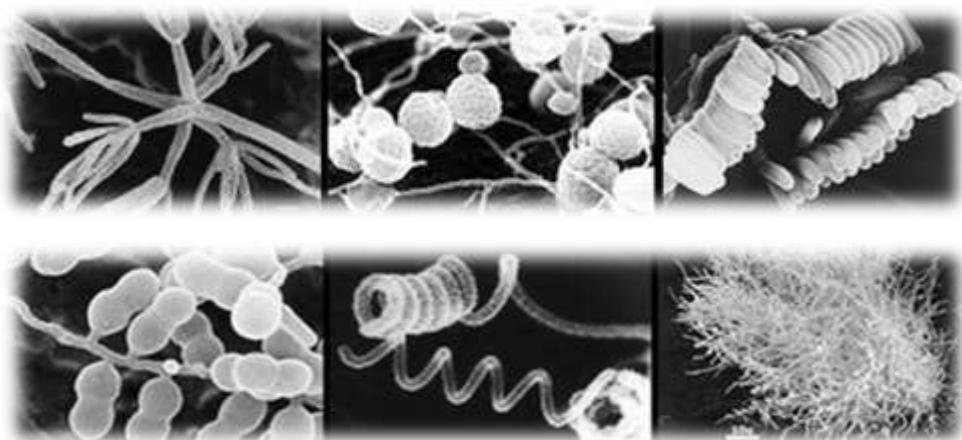


Figure I-12 | Photographies au microscope électronique des différentes espèces d'actinomycètes montrant la diversité des structures source : Mervyn Bibb

Ecologie des actinomycètes.

On trouve des actinomycètes presque partout dans la nature (Goodfellow & Williams 1983). Ils sont présents dans des sols polaires gelés en permanence comme dans des sols désertiques, dans le pétrole brut, les sols hautement contaminés avec des métaux lourds, les lacs extrêmement alcalins et les lacs salés. Par contre, ils semblent être absents des eaux minières très acides ($\text{pH} < 1$) et des sources thermales très chaudes d'origine volcanique. La fonction écologique des actinomycètes au sein des écosystèmes est la décomposition des substances organiques. Les actinomycètes, fort nombreux dans les sols, se joignent aux autres bactéries et aux champignons comme "nettoyeurs" de la nature et formateurs d'humus. Ils

prolifèrent surtout quand l'action des bactéries ordinaires touche à sa fin, on pourrait dire qu'ils terminent leur action.

IV-2/ Intérêts biotechnologiques

Les actinomycètes sont les producteurs d'antibiotiques les plus efficaces du monde vivant. Plus des deux tiers des quelques six mille antibiotiques isolés jusqu'ici sont produits par cet ordre de bactéries -actinomycine, streptomycine, néomycine, candicidine,...- (Cross 1982 ; Sanglier et al. 1993 ; Lazzarini et al. 2000). Les actinomycètes sont également de gros producteurs d'enzymes intervenant dans la décomposition des macromolécules végétales (Cross 1982 ; Sanglier et al. 1993). Certaines sont utilisées dans l'industrie alimentaire (isomérase du glucose) et dans celle des détergents (protéases). De même, certaines enzymes peuvent avoir des applications médicales (neuraminidases, estérases et oxydases des stérols ; Aisaka & Uwajima 1987) et être utilisées en biologie moléculaire (endonucléases de restriction). Non seulement les actinomycètes sont une riche source d'enzymes mais, inversement, ils produisent aussi de nombreux inhibiteurs d'enzymes (Imada 2005). Ainsi, beaucoup d'actinomycètes, producteurs d'antibiotiques, élaborent des enzymes inactivant les antibiotiques pour se protéger de leur action toxique. En plus des antibiotiques antimicrobiens, les actinomycètes sont la source de substances antitumorales -actinomycine, adriamycine, rebeccamycine- (Uyeda 2004), insecticides -nikkomycine-, miticides - tétranactine-, antihelminthiques -avermectines-, piscicides -antimycine A-, herbicides - phosphinothricines- et de substances ayant des activités biologiques les plus diverses (immunosuppressives, immunostimulantes) (Sanglier et al. 1993). C'est pourquoi, les grands groupes pharmaceutiques recherchent activement de nouvelles souches en milieu naturel.

V / Présentation du sujet d'étude

L'intestin des termites est en passe de devenir l'un des écosystèmes les mieux connus du monde vivant. Des moyens considérables sont actuellement mis en jeu par les équipes américaines, japonaises ou allemandes pour en connaître davantage sur la nature des relations symbiontes-hôte. Cependant, alors que la plupart des travaux récents adoptent une approche globale de l'ensemble de la communauté bactérienne, cette thèse propose d'aborder la symbiose digestive par un angle original en se focalisant sur la microflore actinomycétaire. Souvent évoquée mais rarement étudiée, cette microflore particulière reste très peu connue. Numériquement importants selon les observations microscopiques mais sporadiques dans les

études moléculaires, présentant de fortes capacités enzymatiques en culture mais jamais avérées *in situ*, les informations recueillies sur les actinomycètes sont souvent confuses. Il est donc important, dans un premier temps, d'identifier clairement cette composante de la microflore digestive des termites (Partie A).

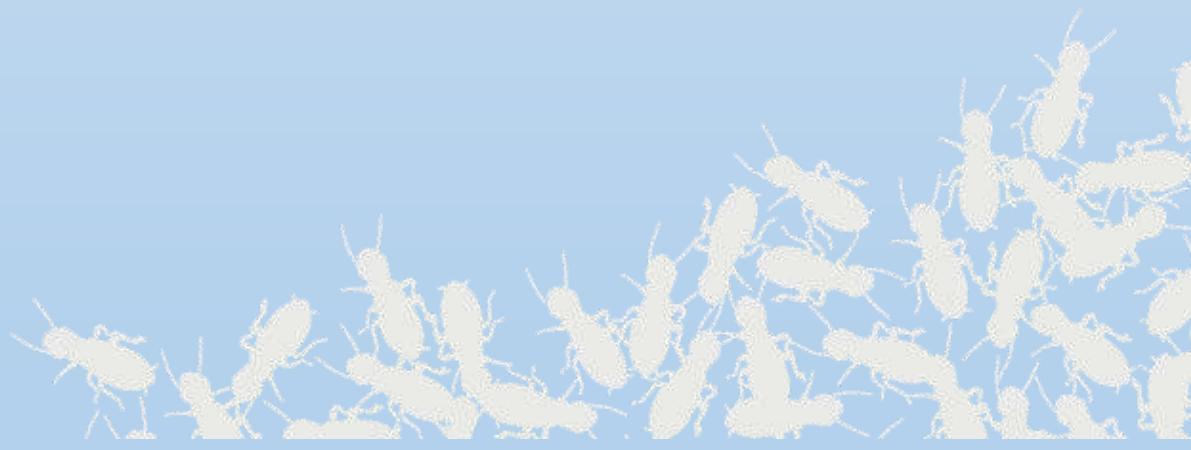
Contrairement aux autres formes bactériennes habitant le tube digestif des termites, les actinomycètes sont ubiquistes dans la nature, largement répandus dans le sol, dans l'humus ou dans les zones où la matière cellulosique est en décomposition. De ce fait, ils forment un modèle idéal pour examiner la nature de leur association avec les termites, permanents et spécifiques comme la plupart de la microflore digestive ou simplement transitoires voire semi-permanents comme le propose Bignell (2000) (Parties A-B).

Les populations actinomycétales pourraient être soit des formes opportunistes ou commensales, soit de vrais spécialistes mutualistes. Tout en discutant des modes de transmissions et des types d'associations entre symbiontes et hôte, il est alors intéressant de rechercher les patterns évolutifs entre la phylogénie des communautés actinomycétales et celle des termites (Partie A/C).

Enfin, les actinomycètes sont connus pour posséder de fortes capacités lignocellulolytiques qui pourraient être utiles pour la digestion des termites. L'identification de la microflore actinomycétale spécifique peut aussi permettre de discuter de son rôle dans la digestion. Tenter d'isoler et de cultiver les actinomycètes symbiontes doit permettre également de mieux appréhender leur rôle dans la symbiose, et d'envisager d'éventuelles applications de leurs propriétés en biotechnologie (Partie B-C).

La culture de souches spécifiques nécessite de développer de nouvelles stratégies d'isolement par des approches intégratives associant la microbiologie classique et la biologie moléculaire (Partie B-C).

MATERIELS ET METHODES



MATERIELS & METHODES

Ce chapitre “matériels et méthodes” donne un inventaire détaillé des différentes techniques utilisées pour l’étude des interactions biologiques entre les termites et les actinomycètes. Cependant, les techniques originales mises au point au cours de nos travaux de recherches sont détaillées dans les partie “résultats” A, B et C.

I/ Matériel biologique : Les *Nasutitermes*

Dans le cadre de nos investigations faites sur les relations entre termites et actinomycètes, nous avons choisi de restreindre nos expériences sur un seul genre de terme, celui des *Nasutitermes*. Comme décrit dans la partie introductory, ce genre se particularise par sa diversité - voire sa complexité - tant taxonomique qu’écologique. Il fait partie des *Termitidae*, sa symbiose digestive est donc uniquement bactérienne. Bien que majoritairement xyloophage, il est le seul genre à avoir un régime alimentaire très diversifié en fonction des espèces. Les *Nasutitermes* forment des colonies très populeuses concentrées à l’intérieur de nids ovoïdes “en carton” facilement transportables (Figure 0-1). Ils s’adaptent facilement à l’élevage dans des conditions tropicalisées et avec un apport régulier en bois tendre.



Figure 0-1 | Photographies de deux ouvriers et d'un soldat de *Nasutitermes costalis* (a) ainsi que d'un nid arboricole de la même espèce (b)

I-1/ Collecte et origines de colonies de termites.

Au total, 9 espèces de *Nasutitermes* ont été étudiées au cours de nos expériences. Elles proviennent d'Afrique (*N.sp1*, *N.sp2*, *N.sp3*, *N.sp4*, *N.sp5*), de la zone caribéenne (*N. costalis*, *N. ephratae* et *N. guayanae*) et de l'île Maurice (*N. voeltzkowi*) (Figure 0-2). Les espèces africaines nous sont parvenues grâce à la participation généreuse de collègues (Corinne Rouland au Congo, Hadrien Vanthomme -Centrafrique-, Essé Anani Kotoklo -Togo-, Dosso Kanvaly -Côte d'ivoire-) qui ont récolté les termites sur place puis nous les ont envoyés conservés dans de l'alcool à 70°. Les nids des 4 dernières espèces ont été récoltés par l'équipe de Dijon (université de Bourgogne, UMR CNRS 5548) suite à différentes missions (Christian Bordereau -Guadeloupe et île Maurice-, David Sillam-Dussès -Guyane-). Une autre colonie de *N. costalis* a également été récoltée en Guadeloupe par les soins de Gladys Loranger, puis directement transféré dans notre laboratoire (IRD Bondy, UMR 137). A Dijon, les termites ont été gardés en élevage dans les salles climatisées du laboratoire, à une température de 28°C ± 2° et une humidité relative de 80% ± 5%, nourris avec du bois plus ou moins dégradé de bouleau. Pour nos propres élevages, nous avons reproduits les mêmes conditions sur les fragments des colonies qui nous ont été restitués.

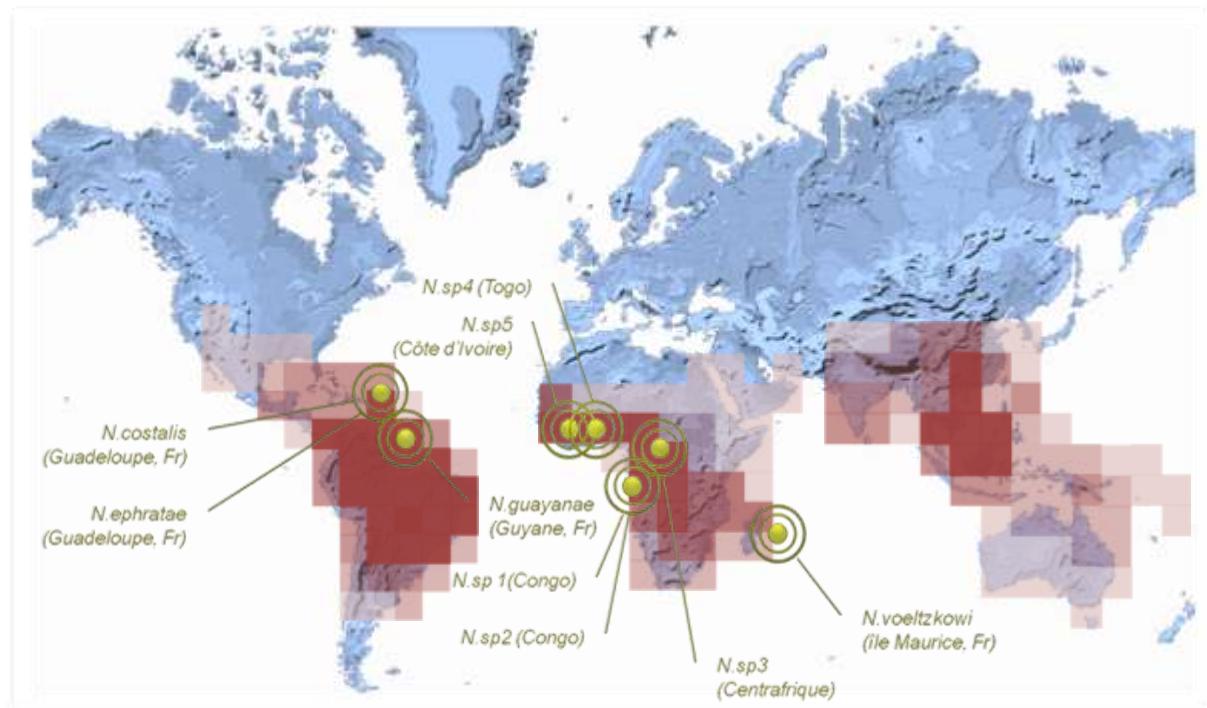


Figure 0-2 | Carte de répartitions des espèces de *Nasutitermes* utilisées dans cette étude
L'aire de répartition du genre est représenté par une mosaïque de carrés plus ou moins rouge en fonction de la richesse spécifique (Eggleton 2000)

I-2/ Dissection du tube digestif des termites.

Afin d'accéder au tube digestif des termites ouvriers, ces derniers ont été disséqués à l'aide de pinces fines stériles sous une loupe binoculaire. L'insecte est déposé dans une goutte d'eau salée à 0,6% de NaCl, sur une lame en verre stérile et sous une hotte à flux laminaire. La tête est ensuite coupée, puis chaque extrémité du corps décapité est enserrée à l'aide des pinces. En tirant délicatement de chaque côté, le tube digestif quasi-entier s'extirpe de l'abdomen par la partie postérieure. Après avoir étalé en longueur le tractus digestif sur la lame, la panse est isolée proprement du reste de l'intestin (intestin moyen et parties de l'intestin postérieur IP1, IP4 et IP5). C'est en effet la panse, où se situe la majorité de la microflore symbiotique, qui sera l'objet de toutes nos investigations. Une dizaine de pances sera alors broyé à l'aide d'un pilon dans un microtube de 1,5ml en conditions stériles. Ce broyat de tube digestif servira à la fois aux méthodes microbiologiques que moléculaires.

II / Techniques microbiologiques

II-1/ Le milieu de sélection des actinomycètes : Le milieu HV.

Les actinomycètes ne sont pas très compétitifs quand ils se développent sur l'agar avec les autres microbes du sol. Afin de réduire la croissance de ces bactéries "contaminantes", Hayakawa et Nonomura (1987) ont conçu un milieu d'isolement (milieu HV) à base d'acide humique comme seule source de carbone et d'azote, et compléter d'un cocktail de vitamines. Les acides humiques forment des polymères complexes et extrêmement divers et sont généralement résistants aux décompositions bactériennes (Khandelwal & Gaur 1980). Cependant, les actinomycètes ont montré des capacités à utiliser ces composés (Dari et al. 1995). Pour cette raison, le milieu HV a régulièrement démontré son efficacité pour isoler les actinomycètes, à en devenir un milieu de référence. Plusieurs ajustements y ont été ajoutés pour permettre la culture d'espèces rares tels que l'apport d'agents antifongiques (Nystatine) ou anti-bactéries Gram-négatives (acide nalidixique) ou le prétraitement des échantillons à inoculer (cf. Partie B). Le Tableau 0-1 suivant donne la composition du milieu HV.

	Ingrédients	(g.l ⁻¹)
Milieu (pH 7.2)	Acides humiques (en solution dans 10ml de NaOH à 0,2N)	1,0
	Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	0,83
	KCl	1,71
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,05
	FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,01
	CaCO ₃	0,02
<hr/>		
Agar		18,0
Vitamines (pH 7.2)	Thiamine / HCl	0,5 .10 ⁻³
	Riboflavine	0,5 .10 ⁻³
	Vitamine B6 pyridoxine / HCl	0,5 .10 ⁻³
	Méso-inositol	0,5 .10 ⁻³
	Ca-pantothenate	0,5 .10 ⁻³
	Acide nicotinique	0,5 .10 ⁻³
	Acide para-amino benzoïque	0,5 .10 ⁻³
	Biotine	0,25 .10 ⁻³

Tableau 0-1| Composition du milieu HV

II-2/ Préparation, ensemencement et énumération.

Le milieu HV est stérilisé en chaleur humide dans une autoclave à 120°C pendant 20 minutes. Une fois tiédi, on y ajoute la solution de vitamines en la filtrant sur une membrane Millipore à 0,22µm de porosité. Le milieu est ensuite réparti dans des boîtes de Pétri carrées de 12 cm de côté. Les boîtes sont ensemencées avec 1ml de broyat de tube digestif à l'aide de billes de verres stériles, à raison de 3 répétitions par facteur de dilution (10⁻¹ à 10⁻⁶). Les dilutions de l'inoculum sont réalisées avec une solution dispersante (1,2g/L de bactopeptone, 6g/L de pyrophosphate de sodium).

Après une période d'incubation à 30°C pendant 14 jours, le nombre de colonies et de morphotypes est estimé sous une loupe binoculaire pour les boîtes Pétri comptant entre 30 et 300 colonies. Le nombre de colonies par boîte est ramené en nombre d'actinomycètes par millilitre de tube digestif utilisé comme inoculum (A/mL). Les différents morphotypes observés sont repiquées sur milieu de culture riche (Bennett).

II-3/ Isolement et caractérisation des souches.

Le milieu de repiquage est un milieu riche glucosé, le milieu Bennett, dont la composition est donnée dans le tableau Tableau 0-2. Les actinomycètes présentent en général une bonne croissance sur ce milieu où la sporulation est rapide et la présence de pigments colorant le milieu notable.

Ce milieu est réparti dans des boîtes de Pétri de 55 mm de diamètre. Pour obtenir une culture pure, on réalise plusieurs repiquages successifs par étalement en stries transversales de l'échantillon transférée. Les colonies isolées sont comparées selon des critères macroscopiques. Les principaux caractères retenus pour cette comparaison sont la texture et la couleur de la colonie, la formation de spore (forme et couleur), la diffusion de pigments dans le milieu, la couleur de l'envers de la culture, et quand cela est caractéristique, l'odeur de cette culture.

Ingrédients		(g.l ⁻¹)
Milieu Bennett (pH 7,2)	Glucose	10,0
	Extrait de viande	1,0
	Extrait de levures	1,0
	N-Z amine A (produits de digestion enzymatique de caséine)	2,0
	Agar	15,0

Tableau 0-2| Composition du milieu Bennett

III/ Techniques moléculaires

III-1/Extraction d'ADN

A partir des souches pures (méthode CTAB)

L'extraction de l'ADN des souches pures a été effectuée selon une méthode d'extraction directe qui consiste en une lyse physique et chimique suivies des phases d'extraction au phénol et de précipitation au PEG (Poly Ethylène Glycol). Environ 200 à 250 mg de culture sont broyés dans des tubes Eppendorfs de 2 ml contenant 500 µl de tampon CTAB 2% (CTAB, NaCl 5M, EDTA 0,5M, Tris HCl pH 8) et des billes de zirconium dans un beadbeater (Retsch® MM 200, Germany) réglé à 50 Hz. Après centrifugation à 12000 g

pendant 4 min et à 4°C, un volume de Phénol Chloroforme Isoamyl (25:24:1) est ajouté au surnageant, puis le tout est homogénéisé lentement pendant 5 min.

Le mélange est à nouveau centrifugé (12000 g, 4 min, 4°C) et 600 µl de la phase aqueuse sont placés dans un 'Phase Lock Gel Tube' avec un volume de Chloroforme Isoamyl (24 :1), puis les tubes sont lentement homogénéisés avant d'être centrifugés à nouveau (12000 g, 4 min, 4°C). 500 µl de la phase aqueuse sont ensuite prélevés puis placés dans un Eppendorf de 1,5ml. La précipitation s'effectue avec 2 volumes de Poly Ethylène Glycol (PEG 30%, NaCl 1,6M). Après récupération de la phase supérieure, le culot contenant l'ADN est lavé dans 500 µl d'éthanol 70°C à froid, puis centrifugé à 12000 g pendant 4 min, à 4°C. Le culot est ensuite séché à température ambiante (pendant 5 min) puis suspendu dans 25 µl de tampon TE 1X.

A partir des tubes digestifs

L'ADN total des tubes digestifs a été extrait selon la méthode de Porteous et al. (1997) légèrement modifiée pour être adaptée à nos échantillons. Dix panses de termites sont placés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml contenant 1 ml de solution de lyse stérile (NaCl 0,25M ; EDTA 0,1M, pH 8), 80 µl de Guanidine isothiocyanate 5M, 90 µl de SDS 20% et des billes de zirconium stériles. Les suspensions ainsi obtenues sont homogénéisées à l'aide d'un beadbeater (Retsch® MM 200, Germany) réglé à 25Hz. Les tubes sont ensuite placés à 68°C pendant 1 heure puis refroidis dans un bain d'eau froide. L'ADN est récupéré dans 600 µl de surnageant après centrifugation à 13000 g (12057 rpm) pendant 15 min. 75 µl d'Acétate de potassium 5M et 250 µl de polyéthylène glycol (PEG) 40% sont ajoutés à l'ADN obtenu après la lyse cellulaire. La précipitation s'effectue à 4°C pendant 3 heures, elle est suivie d'une centrifugation à 13000 g pendant 15 min. Après la récupération de la phase supérieure, le culot est à nouveau suspendu dans 900 µl de CTAB 2% (1,4M NaCl ; 0,1M EDTA ; 2% CTAB) qui permet de complexer les acides nucléiques. 900 µl de chloroforme sont ajoutés pour la déprotéinisation après incubation pendant 15 min à 68°C. Le mélange est agité doucement puis centrifugé à 13000 g pendant 10 min à température ambiante. La phase aqueuse contenant l'ADN est récupérée. L'ADN est concentré par plusieurs phases de précipitation : dans 600 µl d'isopropanol à -20°C pendant 30 min puis dans 450 µl d'acétate d'ammonium à 2,5M et 1 ml d'éthanol 95° à -20°C pendant 1 à 3 heures. Après une dernière centrifugation, le culot est récupéré, lavé dans 1 ml d'éthanol 70° puis recentrifugé à 13000 g pendant 5 min. Le culot séché est remis en suspension dans 15µl du tampon TE 1X.

III-2/ Contrôle et purification de l'ADN extrait

La pureté de l'ADN extrait est vérifiée au spectrophotomètre à 230, 260 et 280 nm à l'aide d'un NanoDrop (ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer), les protéines absorbant à 280nm, les composés humiques et phénoliques à 230 nm et l'ADN à 260 nm. Ce dernier est purifié lorsque des composés humiques et d'autres contaminants ont été également co-extrats. La purification s'effectue à l'aide des kits Spin Column S-400 HR (Amersham).

III-3/ Amplification de l'ADN

La Polymerase Chain Reaction (PCR)

L'amplification d'ADN est effectuée avec de la *Taq Polymérase Ready-To-Go* (Amersham Pharmacia) dans 25 µl du milieu réactionnel contenant 0,25 µM de chaque primer et 50 ng d'ADN matrice. L'amplification est réalisée à l'aide d'un thermocycleur (Eppendorf) et les conditions (températures et nombre de cycles) dépendent des couples d'amorces utilisés. L'amplification est contrôlée en déposant 5 µl de produit PCR dans les puits d'un gel d'agarose à 1,5% suivi d'une migration à 100 V pendant 60 min. Le gel est ensuite coloré 15 min au BET (bromure d'éthidium), rincé dans de l'eau distillée pendant 15 min également puis photographié sous UV.

La Nested-P.C.R. (ou P.C.R. emboîtée)

Afin de cibler le phylum des actinobactéries, nous avons utilisé la Nested PCR. La Nested-PCR (ou PCR emboîtée) consiste en une succession de deux amplifications mettant en jeu deux couples d'amorces. La première amplification est réalisée avec des amorces, dites externes, spécifiques aux séquences ciblées. Puis l'amplicon obtenu sert de matrice à un second couple d'amorces. Celles-ci s'hybrident à un plus petit fragment d'ADN inclus dans la séquence amplifiée lors de la première étape (Figure 0-3).

Cette technique était initialement utilisée pour réduire le risque de contamination (le produit final devait interagir avec deux couples d'amorces, donc deux niveaux de spécificité). Actuellement, elle est surtout utilisée pour augmenter le rapport de sensibilité et de spécificité par rapport à la PCR classique et de minimiser les effets d'inhibition de la première amplification. Elle permet ainsi d'amplifier l'ADN des séquences rares ou faiblement représentées dans un échantillon, ce qui est le cas des actinomycètes du tube digestif des termites.

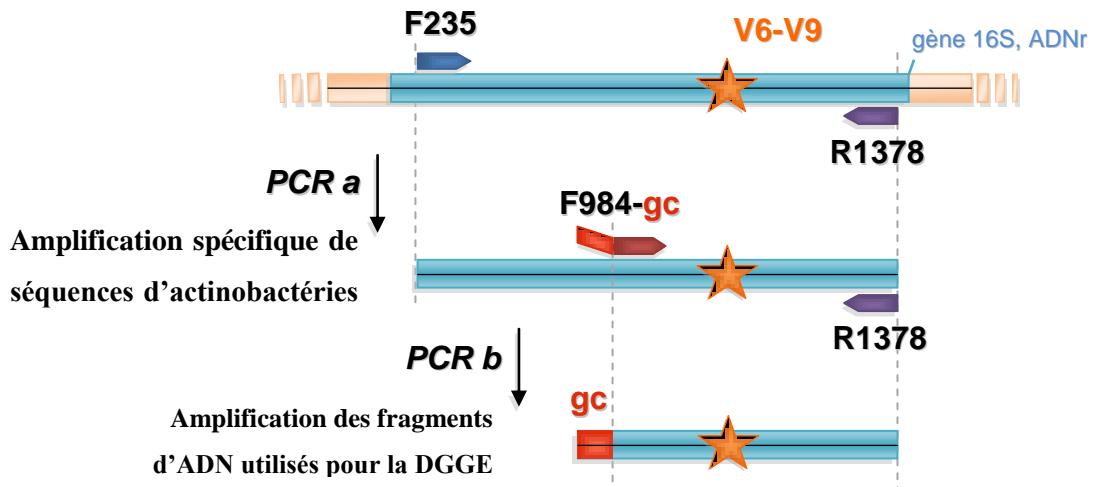


Figure 0-3 | Schéma des étapes de la Nested PCR spécifique aux actinomycètes
(Heuer et al. 1997)

Oligo.	Séquence (5' → 3')	Position (E. coli)	Cible ADNr 16s
F235	CGCGGCCTATCAGCTTGTG	215-235	Actinobacteria (99,7%)
F984-gc	gc.-AACGCGAAGAACCTTAC	968-984	Bacteria
R1378	CGGTGTGTACAAGGCCGGAACG	1378-1401	Bacteria
gc.	5'-CGCCCCGGGGCGCGCCCCGGCGGGCGGGGGCACGGGGGG'3'		

Tableau 0-3 | Amorces utilisées pour l'amplification par Nested-PCR spécifique actinomycètes

Le couple d'amorces utilisé pour la première amplification est composé de l'oligonucléotide sens F235 (nommé aussi S-C-Act-235-a-S-20; Stach et al. 2003) et l'oligonucléotide anti-sens R1378 (Heuer et al. 1997) (Tableau 0-3). Ils encadrent une région relativement longue (~1100 pb) du gène codant l'ARNr 16S. L'amorce sens F235 est spécifique et ne s'hybride qu'avec des séquences d'actinobactéries ; l'amorce anti-sens, quant à elle, s'accroche à une région plus conservée du gène présente chez la majorité des bactéries. La première amplification comprend 10 cycles (Tableau 0-4).

Le second couple d'amorces n'est pas spécifique. Il permet de préparer l'échantillon pour l'analyse par électrophorèse en gradient de gel dénaturant (DGGE). Ainsi, l'oligonucléotide sens F984 est associé à un prolongement riche en bases G et C afin que les produits PCR ne se dénaturent pas totalement lors de la migration en DGGE. L'oligonucléotide anti-sens est le même que lors de la première amplification, i.e. R1378. La seconde PCR prend pour matrice le produit de la première (séquences d'actinobactéries majoritairement) et l'amplifie au cours de 30 cycles (Tableau 0-4). La période d'elongation est aussi augmentée afin d'éviter tout polymorphisme de longueur dans les amplicons.

Etapes PCR	PCR A (F235-R1378)			PCR A (F984gc-R1378)		
	T°C	Durée (min)	Cycles	T°C	Durée (min)	Cycles
Dénaturation initial	94	5		94	5	
Dénaturation	94	0,75		94	0,75	
Hybridation	68	0,75	10 x	60	0,75	30 x
Elongation	72	1,5		72	1	
Elongation finale	72	30		72	30	

Tableau 0-4| Conditions d'amplification pour la Nested PCR spécifique actinomycètes

III-4/ Analyse des structures communautaires des populations d'actinomycètes.

La D.G.G.E. (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ou Electrophorèse en Gradient de Gel Dénaturant

La DGGE est une technique d'électrophorèse permettant la séparation de molécules d'acides nucléiques de même taille. Par cette technique, les produits PCR migrent dans un gel d'acrylamide où ils sont soumis à des conditions de plus en plus dénaturantes (gradient d'urée et de formamide). La mobilité électrophorétique des molécules d'ADN en hélice double-brin est alors affectée par la séparation partielle de leurs deux brins. Lorsque la température de fusion (Tm: melting temperature) de chaque fragment d'ADN est atteinte, la migration de la molécule dénaturée est fortement ralentie à tel point qu'elle est quasiment stoppée. Afin

d'éviter une dénaturation complète du fragment d'ADN, celui-ci est prolongé en 3' par une région riche en bases G et C (GC Clamp) ajoutée lors de la PCR (Figure 0-4).

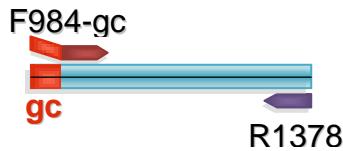


Figure 0-4 | Fragment d'ADNr16S amplifié par le couple d'amorces F984gc/R1378 et prolongé par le GC-clamp pour la migration en DGGE

Si le gradient augmente de façon linéaire, la dénaturation de l'ADN ne se fait pas de façon progressive tout au long de la molécule, mais de domaine en domaine, qui s'ouvre plus ou moins rapidement, en fonction de leur composition en bases AT et GC. La stabilité de chacun des domaines dépend de la structure primaire de la molécule. Deux molécules dont les séquences ne différeront que d'une paire de base pourront donc ne pas s'ouvrir au même moment et migreront alors différemment à travers un gradient précis.

La DGGE est principalement utilisée pour la caractérisation des communautés microbiennes. Dans ce cas, le produit PCR est constitué d'un mélange de différentes séquences relatives aux différents représentants de la communauté. Selon leur polymorphisme, chaque séquence particulière possède une température de fusion spécifique et présente donc un front de migration différent des autres constituants du mélange. On obtient ainsi un profil de migration de l'ensemble de la communauté où chaque bande (ou empreinte génétique) correspond en théorie à un représentant de cette communauté (Figure 0-5).

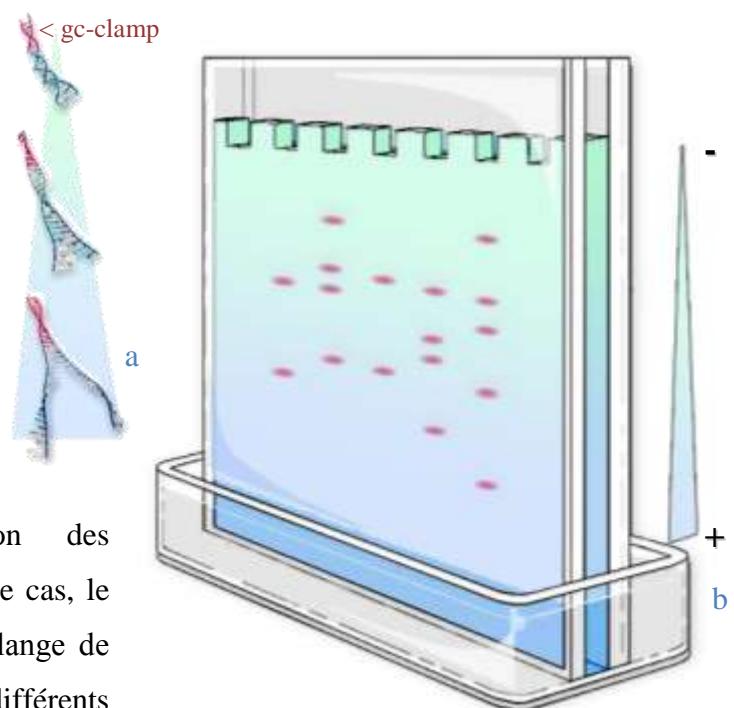


Figure 0-5 | Schéma de la DGGE

- (a) Ouverture du double brin d'ADN à travers le gradient de dénatrant et retenu par le gc-clamp.
- (b) schéma de DGGE montrant la séparation des fragments d'ADN d'une communauté microbienne à travers le gradient de dénatrant. les bandes migrant au même niveau correspondent théoriquement des espèces identiques

Protocole expérimental

Après amplification, les produits de la Nested PCR sont séparés sur un gel d’acrylamide à 8% (acrylamide bis-acrylamide 37,5 :1) contenant un gradient linéaire de dénaturants chimiques (50-60%) constitué par de l’urée et du formamide désionisé (100% de dénaturant correspond à une concentration de 7M d’uree et de 40% de formamide). La migration est réalisée dans une cuve d’électrophorèse DcodeTM Universal Mutation Detection System (BioRad) contenant un tampon TAE 0,5X (40 mmol/l de Tris-acetate, 1 mmol/l de EDTA pH 8). Elle s’effectue d’abord à 20 Volts pendant 10 min puis à 75 Volts pendant 14 heures, la température étant réglée à 60°C. Le gel est ensuite maintenu pendant 20 minutes dans du BET, rince pendant 15 minutes dans de l’eau milliQ, puis photographie sous UV à l’aide du Transilluminator (GelDoc 2000, BioRad Inc, Italy). Les profils DGGE sont ensuite comparés statistiquement ou génétiquement en découpant, séquençant et analysant les bandes d’intérêt (cf. plus loin).

Comparaison statistique des profils DGGE.

Les profils DGGE sont analysés via le logiciel Quantity One (BioRad) afin de regrouper les structures de communautés les plus proches. Les résultats sont donnés sous la forme d’un dendrogramme UPGMA. La ressemblance des profils DGGE a également été vérifiée par des tests statistiques de “dissimilitude” basés sur le calcul de distances de Jaccard pour 1000 répétitions via le logiciel R. Pour cette analyse, les gels DGGE sont au préalable codés en des matrices de présence-absence. Chaque ligne correspond à un front de migration d’au moins une bande et chaque colonne à un échantillon déposé dans le gel.

III-5/ Identification et analyse des produits d’amplification d’ADN.

Séquençage des bandes DGGE et des isolats.

Les séquences 16S des bandes DGGE ainsi que celles des souches isolées ont été séquencées afin de déterminer leur position taxonomique. Le séquençage a été effectué par Gérome Express (Laboratoire de Grenoble). Les bandes des profils DGGE sont sélectionnées puis découpées soigneusement avec du matériel stérilisé. Les fragments de gel sont disposés dans un Eppendorf de 1,5 ml contenant 40 µl d’eau milliQ à 4°C pendant 24 heures afin d’éluer l’ADN d’intérêt. Chaque bande est ensuite réamplifiée selon la deuxième étape de la Nested PCR. Les produits d’amplification sont passés à nouveau en DGGE pour vérifier leur pureté (profil à une seule bande). Cette dernière étape est répétée jusqu’à ce que la pureté

des isolats soit effective. Une fois réalisé, le fragment d'ADN correspondant à la bande excisée est envoyé à séquencer.

Identification des séquences nucléotidiques

Les séquences obtenues sont comparées à celles déjà répertoriées dans la banque de gènes du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) à l'aide de l'option 'BLAST search'. Les pourcentages de similarité sont ensuite déterminés entre les séquences isolées au cours de cette étude et les séquences les plus proches répertoriées dans GenBank ou RDPII (Ribosomal Data Project). L'avantage de ce dernier est qu'il peut distinguer les plus proches cultivés et non-cultivés (Cole et al. 2007). Les séquences ne sont considérées comme similaires que lorsqu'elles ont un pourcentage de similarité au moins égal à 97% (Clayton et al. 1995 ; Wang et al. 1997).

Analyses phylogénétiques

L'ensemble des séquences (issues de nos expériences ou des banques de données) est aligné à l'aide du programme ClustalW (Thompson et al. 1994) via l'interface de BioEdit (Hall 1999). Cet alignement de séquences est corrigé manuellement, notamment quand à la longueur des séquences étudiées. L'algorithme de construction phylogénétique choisi est celui de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987) proposé par le logiciel MEGA 4 (Tamura et al. 2007). L'analyse des séquences est réalisée deux par deux selon le modèle du maximum de vraisemblance. Tous les gaps issus de l'alignement ont été traités comme des caractères (délétion). Enfin, la robustesse des nœuds a pu être testée par un calcul de bootstrap basé sur 1000 répétitions.

La même analyse phylogénétique réalisée sous PAUP (Swofford 1993) a également permis une seconde analyse avec la méthode UniFrac (Lozupone et al. 2005). Cette méthode permet de comparer des assemblages de séquences (banques de clones, communautés microbiennes) tout en corrélant l'origine géographique des échantillons à la différentiation génétique observée entre les séquences. Pour l'étude des séquences issues des bandes DGGE, le programme UniFrac donne donc une analyse plus détaillée qu'une simple comparaison de profils, en prenant en compte les interactions phylogénétiques. Le résultat est présenté sous la forme d'un dendrogramme UPGMA.

RÉSULTATS





Partie A

Caractérisation et comparaison des communautés actinomycétales associées spécifiquement à la panse de plusieurs espèces de *Nasutitermes* spp.

A-I/ Introduction

A-I-1/ Sur la spécificité de la microflore bactérienne digestive chez les termites

Au cours de ces cinq dernières années, un nombre considérable de publications sont parues pour décrire la diversité bactérienne inhérente au tube digestif des termites. Ces vastes études basées sur l'analyse de l'ADNr 16S ont permis d'identifier les constituants de la microflore procaryotique qui représente pas moins de 21 phyla bactériens (Ohkuma et al. 2006). Or, la majorité des phylotypes obtenus serait associée spécifiquement au tube digestif des termites puisqu'ils forment des groupes monophylétiques souvent éloignés génétiquement des espèces bactériennes connues (Hongoh et al. 2005, Shinzato et al. 2005). La question de la spécificité des populations bactériennes a été plusieurs fois vérifiée à différentes échelles, de la caste (Hongoh et al. 2006) au groupe d'espèces (Schmitt-Wagner et al. 2003; Hongoh et al. 2005), en passant par la colonie (Minkley et al. 2006) et même selon les micro-habitats intestinaux (Yang et al. 2005). La stabilité de la microflore intestinale serait, en effet, due surtout aux multiples structures du tube digestif permettant la fixation des symbiontes (membrane péritrophique, épines cuticulaires, renflements entériques, surface ciliées des protistes, etc) (Brune 2006).

Pourtant, le maintien d'un tel degré de stabilité de la microflore digestive n'est pas, *a priori*, évident. L'intestin est un milieu en constante agitation avec le flux permanent d'un bol alimentaire compact contre lequel les communautés bactériennes doivent toujours lutter pour ne pas être emportées. Mais ce n'est pas là la seule contrainte puisque la composition même des aliments aurait une influence sur les structures communautaires dans le tube digestif des termites (Tanaka et al. 2006 ; Miyata et al. 2007). Enfin, l'apport régulier de populations bactériennes allochtones lors de l'ingestion et du transit de la nourriture pourrait également

contrarier la spécificité de la microflore digestive. Mais, peu d'informations existent sur leur devenir dans l'intestin des termites.

A-I-2/ Les actinomycètes : un modèle particulier pour la question de la spécificité.

La composante actinomycétale de la microflore digestive est particulièrement concernée par les questions de la spécificité et de la nature des associations micro-organismes / terme. En effet, les actinomycètes sont connus pour être ubiquistes dans la nature, et sont aussi bien présents dans le sol que dans les zones humifères voire sur le bois en décomposition. Partageant le même substrat, les termites sont souvent amenés à ingérer les actinomycètes de l'environnement. Cet ordre de bactéries a d'ailleurs été signalé à plusieurs reprises dans le tube digestif des termites aussi bien lors d'études par microscopie électronique (Breznak & Pankratz 1977; Bignell 1979; Brauman 1983), par culture microbiologique (cf. Partie B ; König et al. 2006; Kurtböke & French 2007) ou via des approches moléculaires comme le clonage-séquençage (Ohkuma et al. 2006 ; Hongoh et al. 2006) ou la fluorescence *in situ* (Nakajima et al. 2005).

La question de la spécificité des populations actinomycétales chez les termites se pose également du fait que leur détection par les techniques de clonage est très sporadique d'une étude à l'autre. Ces conclusions inégales pourraient suggérer que la majorité des actinomycètes découverts dans le tube digestif des termites ne forment pas une microflore fixée seraient plutôt occasionnels dans le tube digestif. Cette hypothèse irait alors à l'encontre des affirmations récentes sur la stabilité de la microflore digestive et son origine endogène (Hongoh et al. 2005 ; Schmitt-Wagner et al. 2003)

Le grand écart qui existe entre les résultats de la biologie moléculaire et ceux de la microbiologie classique, illustre surtout notre méconnaissance de la diversité actinomycétale inhérente à l'intestin des termites. Avant de pouvoir réellement conclure sur le thème de la spécificité, il serait d'abord nécessaire de caractériser la véritable structure des communautés actinobactériennes présentes dans le tube digestif des isoptères. Or, les études globales sur l'ensemble de la microflore procaryotique pourraient avoir sous-estimé cette part minoritaire que forment les actinomycètes. Eclipsée face à la proportion surnuméraire des formes bactériennes dominantes, leurs séquences ont peut-être été ignorées à cause de biais liés à la PCR ou à l'analyse des banques de clones. De récentes études montrent d'ailleurs que la détection des actinomycètes de l'environnement est souvent tronquée par l'utilisation d'amorces universelles (Wintzingerode et al., 1997 ; Farris & Olson 2007).

A-I-3/ Sujet et objectifs de l'étude.

Malgré les efforts fournis ces dernières années, la vision de la diversité, de la présence ou du rôle des communautés actinobactériennes dans le tube digestif des termites reste finalement très confuse. Contrairement aux études globales, nous proposons ici de focaliser les investigations sur cette microflore particulière et minoritaire. La méthode utilisée se base sur l'utilisation d'amorces spécifiques aux actinomycètes et à leur amplification améliorée par une PCR emboîtée (Nested-PCR). Elle est complétée par une analyse électrophorétique sur gel à gradient dénaturant (DGGE-séquençage) qui permet de s'affranchir des biais de la culture et de contourner la construction laborieuse de banques de clones. L'objectif est ainsi d'obtenir une vision directe et complète des structures communautaires actinobactériennes présentes dans le tube digestif des termites. L'étude se décompose en trois temps:

- Evaluer l'influence de la nourriture consommée - et notamment de l'ingestion d'actinomycètes exogènes - sur la structure des populations actinobactériennes intestinales de 3 espèces de *Nasutitermes*. (A-II)

- Analyser la stabilité des communautés actinobactériennes au niveau intra-spécifique entre deux colonies de *Nasutitermes costalis* de provenances différentes, ainsi qu'au niveau interspécifique entre 9 espèces de *Nasutitermes spp.* (A-III)

- Identifier taxonomiquement les populations actinobactériennes associées à la panse des termites xylophages de 4 espèces de *Nasutitermes*, afin de discuter de la nature de leur relation avec l'hôte voire de leur potentiel rôle dans la digestion. (A-IV)

A-II/ Influence du facteur alimentaire sur la microflore actinobactérienne associée à la panse des termites du genre *Nasutitermes*

A-II-1/ Objectifs et protocole expérimental

Dans cette partie, nous cherchons à définir s'il existe des communautés actinobactériennes associées spécifiquement aux termites. En réalité, cela revient à définir l'origine exogène ou endogène des actinomycètes présents dans l'intestin de ces termites. Cette question a été abordée par des expériences de détection et d'élimination de la microflore exogène en transit dans l'intestin. Plusieurs sous-populations de 2 espèces de termites, *N. costalis* et *N. ephratae*, ont ainsi été soumises à différents traitements alimentaires afin de comparer les changements de leurs communautés actinomycétales entre-elles ainsi qu'avec le bois consommé.

Deux espèces de termites ont été étudiées, *N. costalis* et *N. ephratae*, tous les deux originaires de Guadeloupe et élevées depuis plusieurs années en conditions contrôlées au laboratoire de Dijon. Cinquante ouvriers de chaque colonie ont été placés dans des boîtes de pétri stériles. Ils ont été nourris selon différentes contraintes alimentaires :

- avec des fragments végétaux constituant leur alimentation naturelle (**C control**),
- avec ces mêmes fragments végétaux (bois de hêtre) mais stérilisés (**F sterilized food**).
- sans alimentation (**S starvation**).

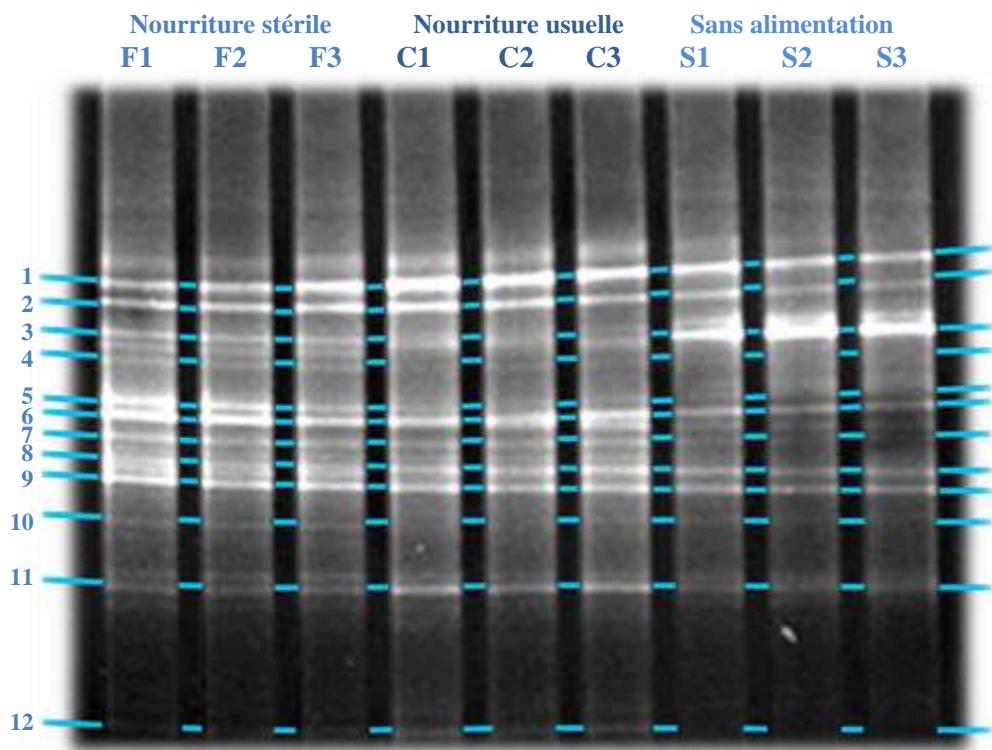
Trois boîtes d'élevage ont été réalisées pour chaque type d'essais. Le dispositif a été maintenu à 28°C, pour une humidité de 80% et à l'obscurité pendant 7 jours. La mortalité a été contrôlée tous les jours et les termites morts retirés. La panse de 10 individus choisis au hasard est prélevée et leur communauté actinomycète analysée par la méthode de nested PCR DGGE (cf. 'mat. et meth.').

Par ailleurs, trois échantillons de bois (W1, W2, W3) consommés par les termites sont prélevés pour les mêmes analyses.

A-II-2/ Résultats

Bien que la migration se soit faite à travers un gradient serré (54%-58%) et que les fragments amplifiés aient une taille d'environ 600pb, les profils DGGE ont montré une bonne résolution ainsi qu'un nombre de bandes relativement élevé (Figure A-1 a et b). De 12 à 14 bandes ont pu être décelé pour chacune des deux espèces de termites étudiées. Les répétitions montrent par ailleurs des profils quasiment identiques pour chaque colonie (à l'exception du jeûne chez *N. costalis*), ce qui assure globalement la reproductibilité de la méthode employée. Les profils DGGE présentent également des structures semblables entre les traitements alimentaires en partageant plusieurs empreintes communes. Chez *N. ephratae* (Figure A-1 a), les bandes atteignant les fronts de migration 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10 et 12 sont présentent pour tous les traitements (75%), seules les bandes de la ligne 4 ne se retrouve que dans un seul traitement (F). Chez *N. costalis* (Figure A-1 b), on trouve la même correspondance avec 71,4% des bandes communes aux traitements alimentaires (lignes 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11 et 12). Les tests de dissimilarité (test de Jacquard cf. 'mat. et meth.') ne montrent pas différences significatives entre les traitements ($\Delta_{Ncos}=0,134$ et $\Delta_{Neph}=0,063$).

(a) *Nasutitermes ephratae*



(b) *Nasutitermes costalis*

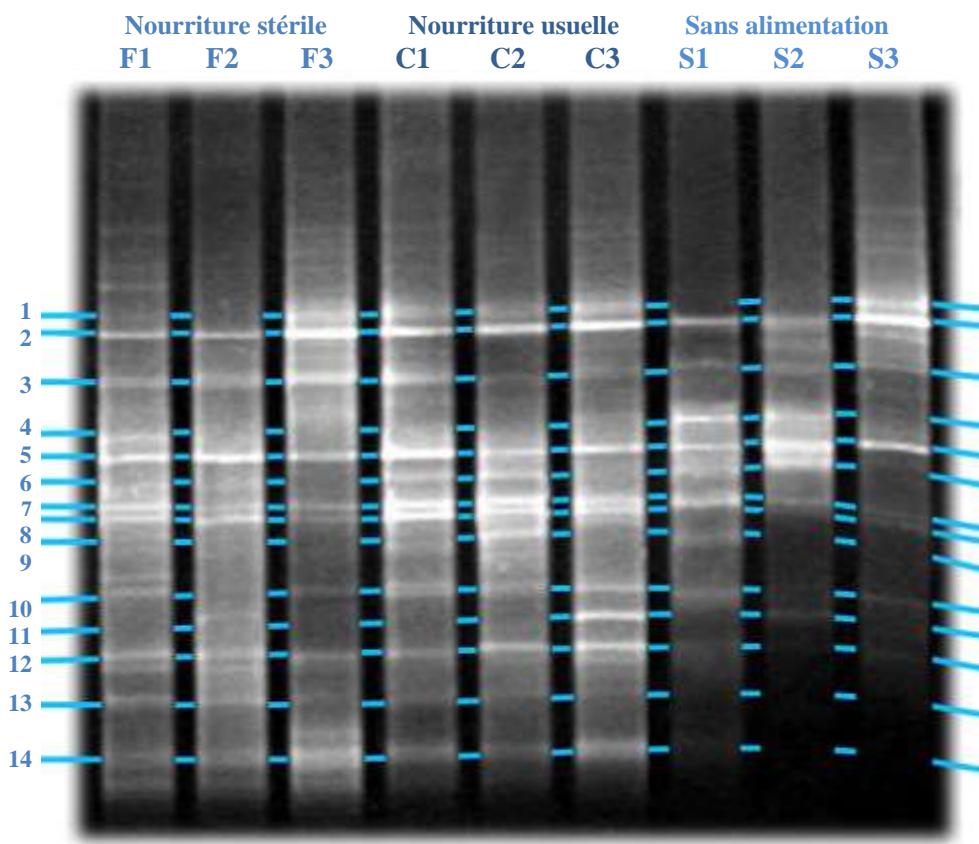


Figure A-1 a, b | Comparaison de l'effet des traitements alimentaires sur les communautés actinobactériennes de la panse des ouvriers de *N. ephratae* (a) et *N. costalis* (b) par la technique de nested PCR – DGGE.

C=nourriture usuelle, F=nourriture stérilisée, S=jeûne.

Les lignes bleues en arrière plan représentent les fronts de migration correspondant à 56 au moins une bande des profils DGGE. Ces lignes sont numérotées dans le sens de la migration.

Ainsi, que les ouvriers de termites soient nourris avec du bois stérilisé ou pas, les communautés actinomycétales gardent des structures quasi-similaires (en moyenne 84,5% de bandes en commun entre C et F). En revanche, lorsque les termites sont maintenus à jeun, leur microflore intestinale semble plus perturbée (particulièrement pour la colonie de *N. costalis*). avec une perte plus ou moins importante de diversité, une variation dans l'intensité des bandes et une reproductibilité des résultats qui disparaît. Pour cette dernière raison, il est difficile de conclure sur l'effet du jeûne, si ce n'est qu'il modifie les structures communautaires. Dans les autres traitements (nourriture usuelle et stérilisée), les structures révélées par les profils DGGE restent stables et ne sont pas perturbés par les populations bactériennes exogènes issues du bois ingéré.

Cette observation est d'ailleurs confirmée par la comparaison entre les profils DGGE de la nourriture et de la panse du terme (Figure A-2). La différence des structures entre les deux environnements est évidente. Le bois consommé présente, en effet, un grand nombre de bandes à faible intensité et difficilement discernables ainsi qu'une bande plus intense ('Wood') qui se démarque clairement du profil. Or, parmi les bandes les mieux identifiables, aucune ne migre au même niveau que les bandes retrouvées dans les profils du tube digestif des termites.

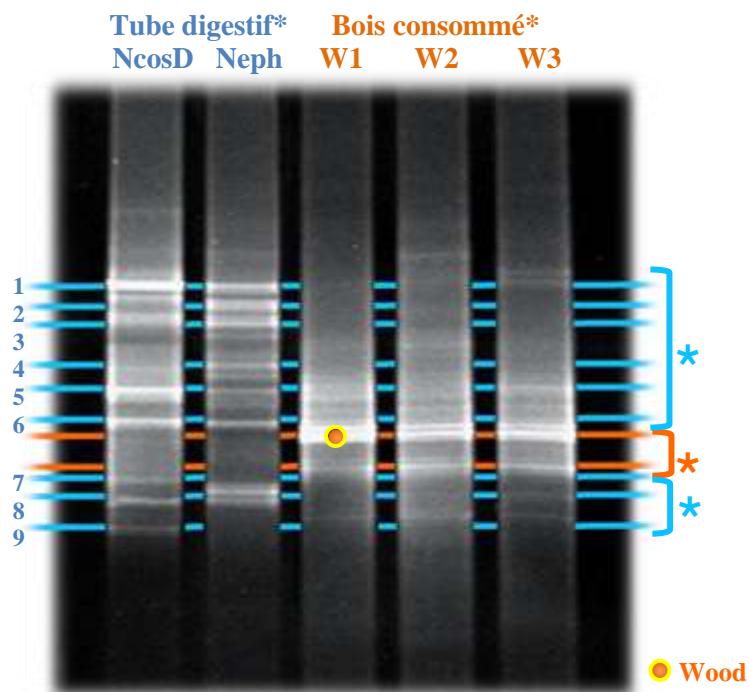


Figure A-2 | Comparaison par DGGE des communautés actinobactériennes de la panse des termites *N. costalis* (NcosD) et *N. ephratae* (Neph) avec celle de leur nourriture (bois, W).

Les lignes numérotées représentent les fronts de migration correspondant à au moins une bande des profils DGGE. En bleu sont représentées les lignes relatives au tube digestif des termites, en orange celles relatives au bois consommé.

La bande majeure du profil DGGE du bois est marquée par un point orange, noté 'Wood'.

A-III/ Comparaison de la structure des communautés actinomycétales à l'échelle intraspécifique et interspécifique.

A-III-1/ Comparaison entre une colonie autochtone et une colonie d'élevage de *N. costalis*.

Afin d'analyser les variations intraspécifiques ainsi que l'influence du maintien des termites en élevage, 2 colonies de l'espèce guadeloupéenne *Nasutitermes Costalis* (Holmgren) ont été comparées. L'une (NcosG) a été collectée directement en Guadeloupe, l'autre (NcosD) a été maintenue en élevage à l'université de Dijon depuis plus de 3 ans (cf. 'mat. et meth.'). Trente ouvriers de chaque colonie ont été prélevés aléatoirement pour composer 3 répétitions comparables (3x10 ind.). Les profils DGGE de ces échantillons sont représentés dans la figure Figure A-3.

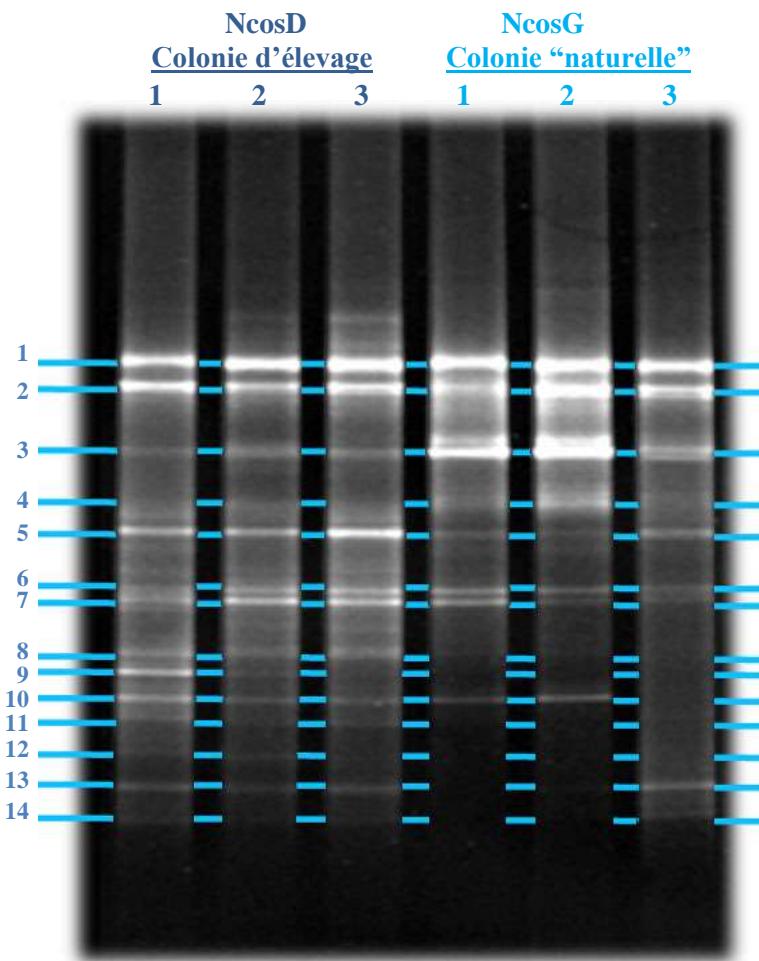


Figure A-3 | Comparaison des structures de communautés actinobactériennes entre deux colonies de *N. costalis* d'origine différente, par nested PCR DGGE.

NcosD est une colonie d'élevage de Dijon et NcosG provient directement de Guadeloupe
Les lignes numérotées représentent les fronts de migration correspondant à au moins une bande DGGE.

La colonie maintenue en élevage présente au maximum 14 bandes clairement discernables alors que la colonie guadeloupéenne n'en présente que 11. La similarité des bandes co-migrantes a été confirmée par l'analyse de leur séquence d'ADNr 16S (Id>97,5%) (ref. Genbank : de EU89690 à EU896704). Le pourcentage de bandes communes est de 71,4%. La comparaison des profils indique que la variation entre les deux colonies est principalement due aux différences d'intensité de certaines bandes et, dans une moindre mesure, à la perte de bandes minoritaires. Ainsi, les bandes de la ligne 3 sont plus intenses chez la colonie guadeloupéenne, et à l'inverse les bandes de la ligne 5 sont plus intenses pour la colonie d'élevage. Dans les échantillons de la colonie "naturelle" (NcosG), les bandes 8 à 14 ont souvent disparu mais le test de dissimilarité de Jaccard ($\Delta_{Neph}=0,098$) indique qu'il n'y a pas de différences significatives entre les profils de deux colonies.

A-III-2/ Comparaison à l'échelle interspécifique entre plusieurs espèces de *Nasutitermes spp.*

Comparaison des profils DGGE de 9 espèces de Nasutitermes spp.

Compte tenu des résultats des analyses précédentes montrant que la microflore actinomycétale présente dans le tube digestif des termites ne dépend que peu des conditions environnementales, une comparaison interspécifique a été réalisée. Notre étude a porté sur 9 espèces de *Nasutitermes*, 5 originaires d'Afrique (*N.sp1* à *N.sp5*), 3 de la zone caribéenne (*N. costalis*, *N. ephratae* et *N. guayanae*) et une de l'île Maurice (*N. voeltzkowi*) dans l'océan indien (cf. 'mat. et meth.').

La figure Figure A-4 montre le profil DGGE obtenu avec un gradient de dénaturants de 52% à 58%. De 8 à 11 bandes ont pu être décelées selon les espèces de termites étudiées. Contrairement aux analyses précédentes, la divergence des profils est plus importante. En effet, aucune bande n'est commune à tous les échantillons : certaines sont présentes dans la plupart des 9 profils (lignes 2, 9, 10 et 12). Certaines bandes se retrouvent dans les échantillons qui ont des origines géographiques voisines: les bandes de la ligne 1 et dans une moindre mesure celles des lignes 15, 16, 18, 19, sont clairement africaines ; les bandes de la ligne 17 sont, elles, caribéennes.

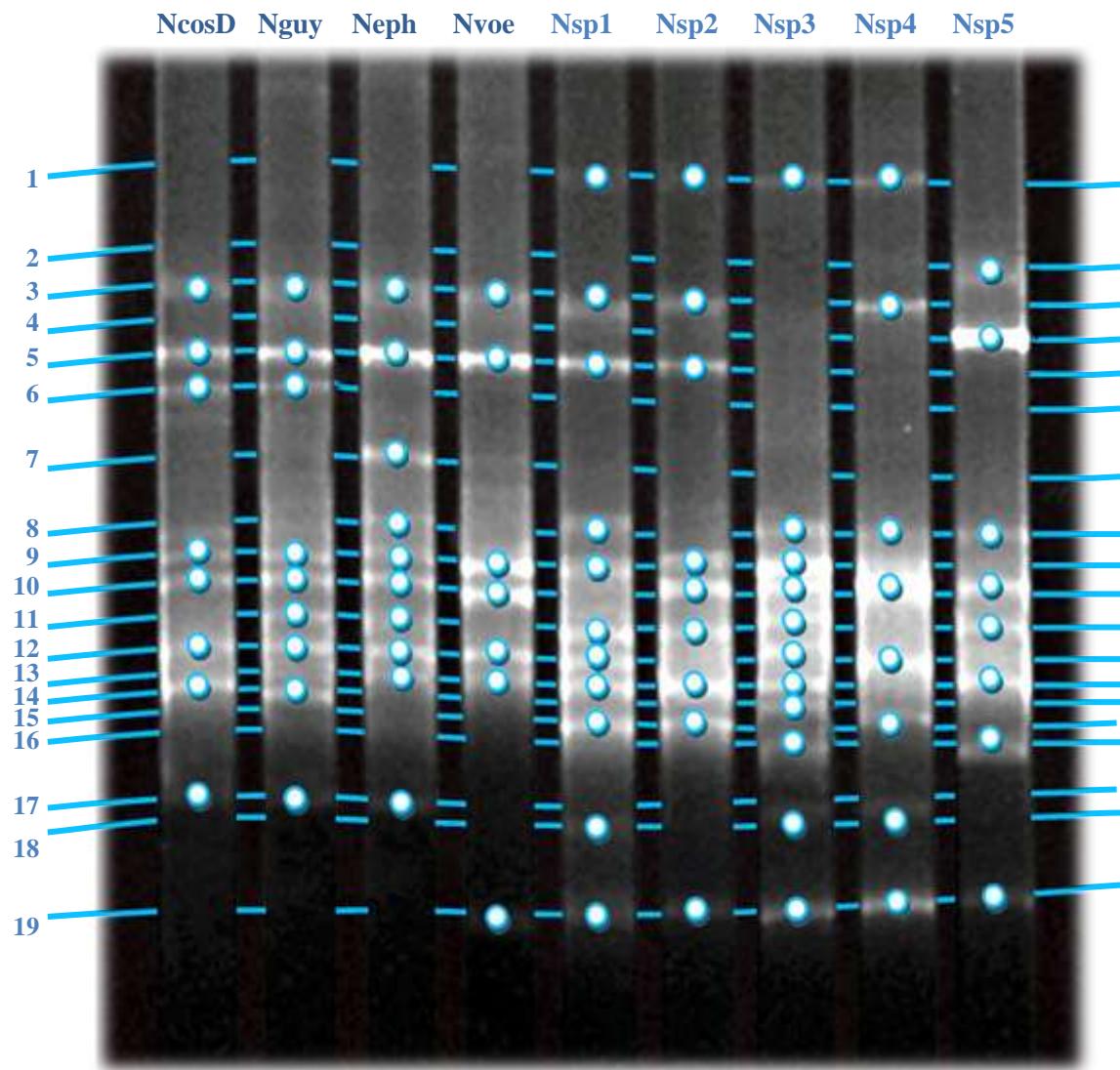


Figure A-4 | Comparaison par DGGE des structures de communautés actinobactériennes de 9 espèces de *Nasutitermes*.

Ncos=N. *costalis*, Nguy=*Nguyanae*, Neph=*N.ephrae*, Nvoe=*N.voeltzkowi*

Les lignes numérotées représentent les fronts de migration correspondant à au moins une bande DGGE.
les bandes de chaque profil a été marqué d'un point blanc pour faciliter la lecture du gel.

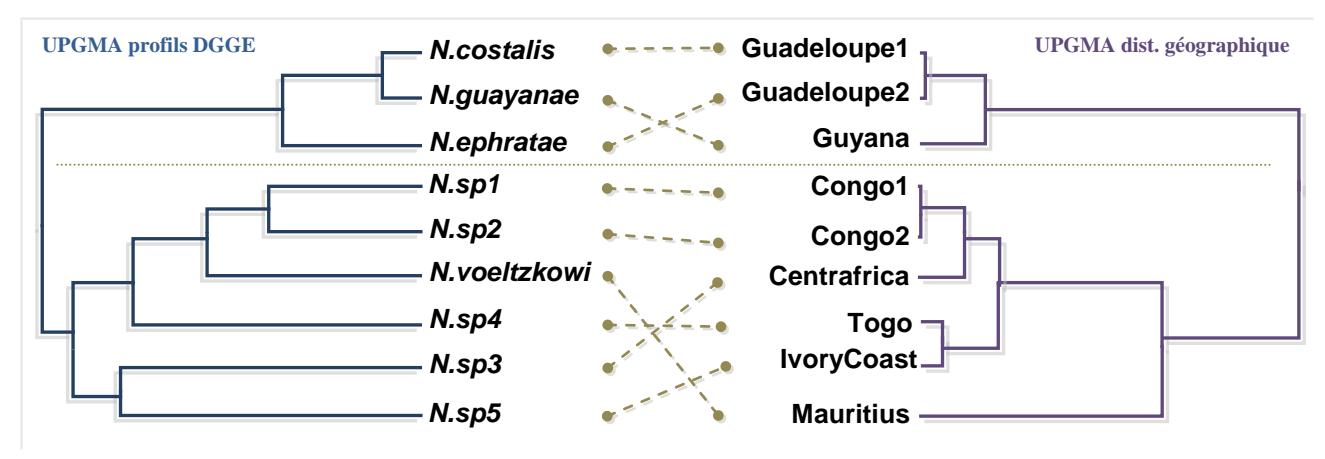


Figure A-5 | Relations entre les regroupements UPGMA basés d'une part sur la similarité des profils DGGE des 9 espèces de *Nasutitermes* et d'autre part sur leur origines géographiques.

Afin de visualiser plus clairement les variations des structures communautaires au niveau interspécifique, les similarités entre les profils obtenus pour chaque espèce ont été analysées par regroupement mathématique selon la méthode UPGMA. Le dendrogramme résultant de ce calcul a été comparé à celui traitant de la distance géographique entre les espèces étudiées (Figure A-5). Bien que les *Nasutitermes* caribéens se distinguent nettement des autres espèces, à l'intérieur de ce groupe comme pour le reste des espèces, il n'existe pas de congruence évidente entre les profils DGGE et l'éloignement géographique. Au contraire, on observe un mélange des profils entre les espèces africaines et mauricienne. Il n'y a donc pas de corrélation nette entre l'environnement géographique et les communautés actinobactériennes du tube digestif des termites.

Comparaison des communautés actinomycétales par la méthode UniFrac.

La comparaison a été affinée par l'étude des séquences d'ADN 16s issues des bandes DGGE des 3 espèces caribéennes et de l'espèce mauricienne. Les bandes DGGE ont été découpées afin de les isoler, les purifier et les séquencer. Le détail des résultats de séquençage est détaillé plus tard (Tableau A-1). Chaque communauté actinobactérienne composée de plusieurs séquences a ensuite été traitée comme une seule entité comparable par la méthode UniFrac (Lozupone & Knight 2005). Cette méthode permet en effet de regrouper et de comparer des communautés microbiennes entre elles tout en prenant en considération le degré des interactions phylogénétiques entre les séquences.

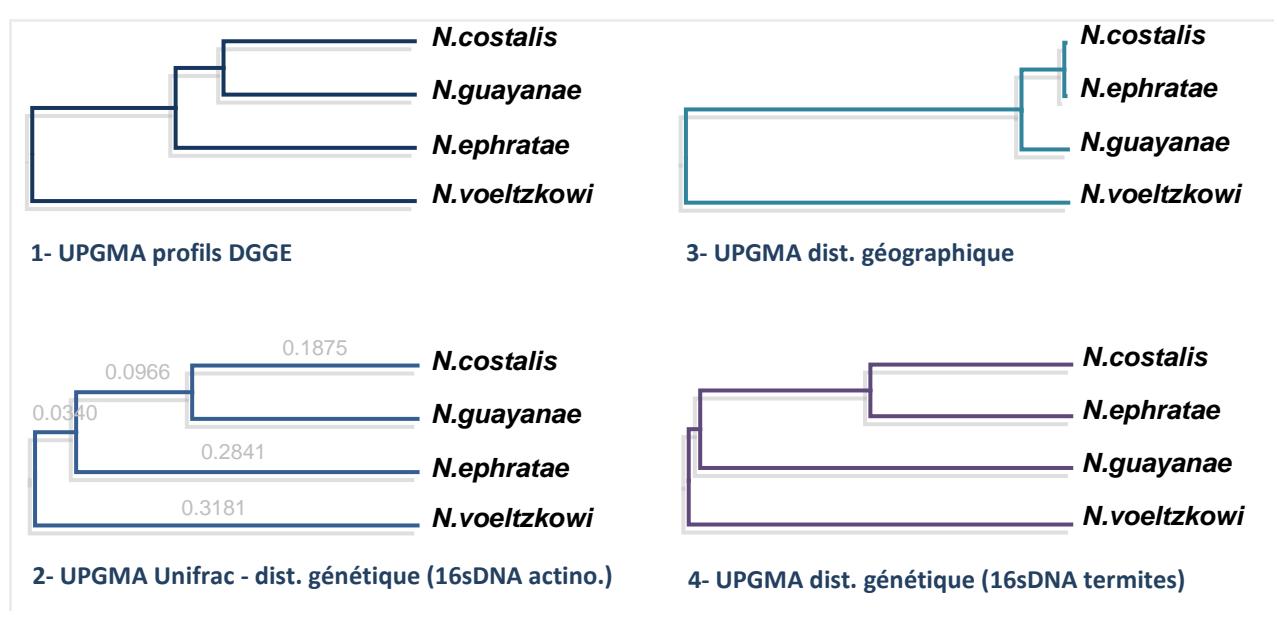


Figure A-6 | Dendrogrammes UPGMA basés sur différentes données : sur la similarité des profils DGGE (1), sur l'affiliation phylogénétique des composants de la communautés actinobactériennes selon le calcul UniFrac (2), sur l'origine géographique des colonies étudiées (3) et sur la phylogénie des espèces de *Nasutitermes* (4).

Le regroupement obtenu (Figure A-6-2) est en accord avec celui basé sur les profils DGGE (Figure A-6-1). En revanche, il est différent de celui basé sur la distance géographique des échantillons. (Figure A-6-3). En effet, l'espèce *N. costalis* a une microflore actinomycétale plus proche de l'espèce guyanaise *N. guyanae* que de sa voisine guadeloupéenne *N. ephratae*. La comparaison avec la phylogénie de ces espèces hôtes - également basée sur le gène codant la sous-unité 16S de l'ARNr des termites (Figure A-6-4)- aboutit au même résultat, c'est-à-dire une non-congruence des dendrogrammes UPGMA.

La constitution de la communauté actinobactérienne de la panse des termites ne peut donc être associée ni à un facteur géographique, ni même à l'histoire évolutive des hôtes. Entre une origine exogène liée à l'environnement local et une origine endogène dépendante du terme, la réponse peut être modulée par le genre d'actinomycètes concerné. En effet, au niveau des profils DGGE étudiés, la plupart des bandes se maintiennent alors que d'autres disparaissent avec le changement d'alimentation, de colonie ou encore d'espèce de terme. On peut considérer que les bandes qui restent stables dans les différents traitements sont associées au tube digestif des termites, une étude de leur affiliation phylogénétique doit donc permettre de préciser les relations hôte/actinomycètes.

A-IV/ Identification des bandes selon leur affiliation phylogénétique.

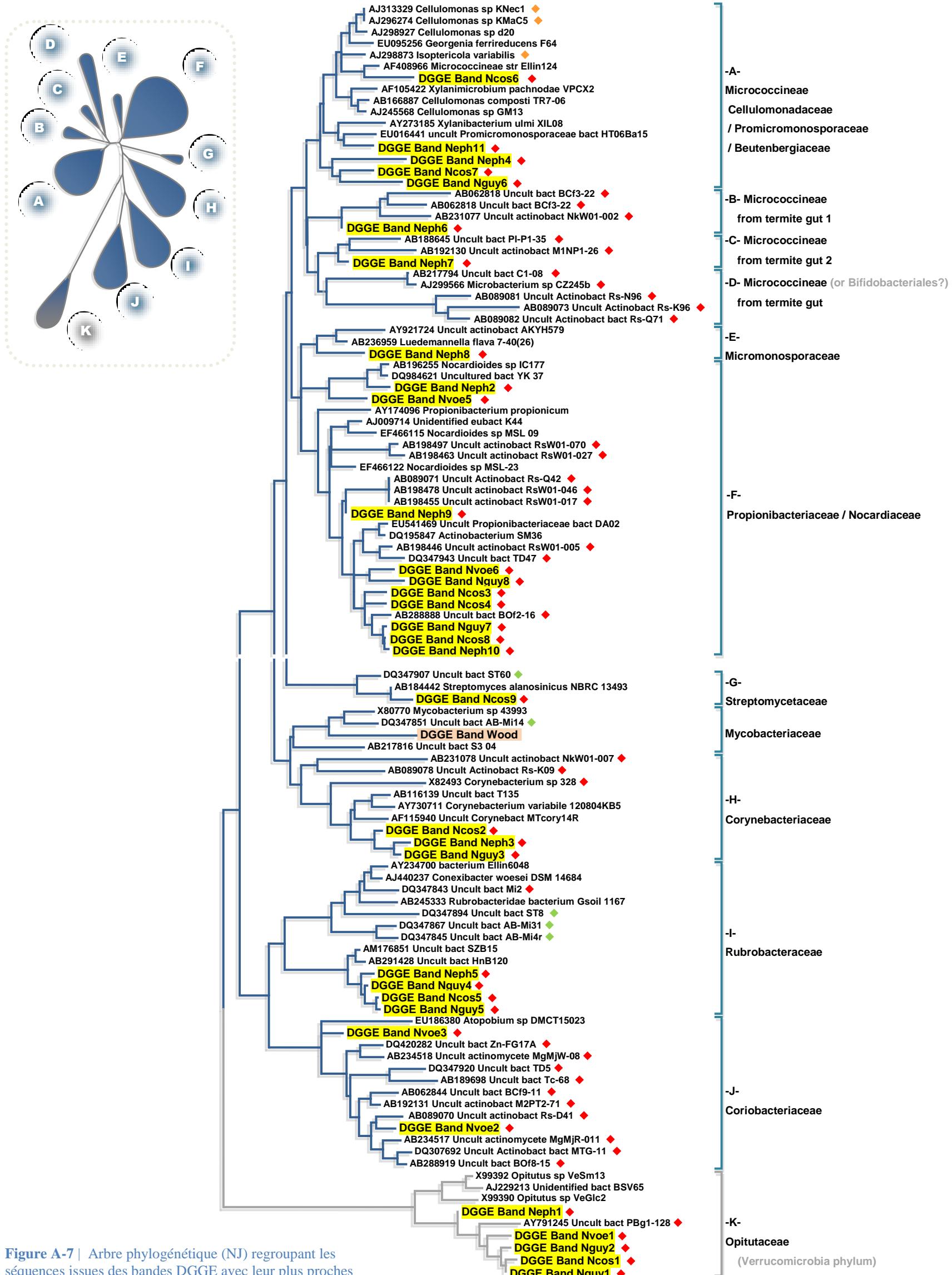
Les bandes des profils DGGE des 3 espèces caribéennes et de l'espèce mauricienne ont été découpées, purifiées et séquencées. L'analyse des séquences d'ADN de ces bandes (Tableau A-1) montrent que la quasi-totalité de celles-ci est affiliée au phylum des *Actinobacteria*. Les séquences des premières bandes (Ncos1, Nguy1-2 et Nvoe1) appartiennent à la famille des *Opitutaceae*, du phylum des *Verrucomicrobia*. Elles ont été accrochées de façon inattendue par le couple d'amorces conçues pourtant pour l'amplification spécifique du gène d'ADNr 16S des actinobactéries. Les autres séquences s'apparentent principalement à l'ordre des *Actinomycetales* et dans une moindre mesure aux ordres des *Rubrobacteriales* (4 séquences) et des *Coriobacteriales* (2 séquences). On trouve une majorité de *Propionibacterineae* (11 séquences), puis de *Micrococcineae* (*Cellulomonadaceae*/*Promicromonosporaceae/Beutenbergiaceae*) (6 séquences) et de *Corynebacteriaceae* (3 séquences). En revanche, il est intéressant de noter qu'une seule séquence de *Streptomycetaceae* a été détectée.

Band code	BLAST Closest relatives		Accession	% Id		
	Taxonomical affiliation					
<i>Verrucomicrobia</i> phylum						
<i>Opitutaceae</i>						
Neph -1	Uncultured bacterium	PBg1-128	AY791245	0,920		
Nvoe -1	Uncultured bacterium	PBg1-128	AY791245	0,946		
Nguy -1	Uncultured bacterium	PBg1-128	AY791245	0,946		
Nguy -2	Uncultured bacterium	PBg1-128	AY791245	0,950		
Ncos -1	Uncultured bacterium	PBg1-128	AY791245	0,947		
<i>Actinobacteria</i> phylum						
<i>Corynebacteriaceae</i>						
Nguy -3	<i>Corynebacterium</i> variabile	str.120804KB5	AY730711	0,951		
Neph -3	<i>Corynebacterium</i> variabile	str.120804KB5	AY730711	0,940		
Ncos -2	Uncultured <i>Corynebacterium</i>	MTcory14R	AF115940	0,926		
<i>Micrococcineae / Cellulomonadaceae</i>						
Ncos -6	Micrococcineae strain	Ellin124	AF408966	0,949		
Ncos -7	<i>Cellulomonas</i> <i>composti</i>	str. TR7-06	AB166887	0,976		
Neph -4	<i>Cellulomonas</i> sp.	str.d20	AJ298927	0,936		
Neph -6	<i>Cellulomonas</i> sp.	str.d20	AJ298927	0,958		
Neph -7	<i>Cellulomonas</i> sp.	str. GM13	AJ245568	0,938		
<i>Micrococcineae / Promicromonosporaceae</i>						
Neph -11	Uncultured bacterium	HT06Ba15	EU016441	0,945		
<i>Micrococcineae / Beutenbergiaceae</i>						
Nguy -6	<i>Georgenia</i> <i>ferrireducens</i>	str. F64	EU095256	0,932		
<i>Propionibacteriaceae / Nocardiaceae</i>						
Ncos -3	Uncultured bacterium	BOf2-16*	AB288888	0,960		
Ncos -4	Uncultured bacterium	BOf2-16*	AB288888	0,967		
Ncos -8	Uncultured bacterium	BOf2-16*	AB288888	0,973		
Neph -2	Uncultured bacterium	YK 37	DQ984621	0,952		
Neph -9	Uncultured bacterium	BOf2-16*	AB288888	0,979		
Neph -10	Uncultured bacterium	BOf2-16*	AB288888	0,976		
Nvoe -5	<i>Propionibacterium</i> <i>propionicum</i>		AY174096	0,944		
Nvoe -6	Unidentified actinobacterium	str.SM36	DQ195847	0,964		
Nguy -7	Uncultured bacterium	BOf2-16*	AB288888	0,972		
Nguy -8	Uncultured bacterium	BOf2-16*	AB288888	0,929		
Nvoe -4	<i>Nocardioides</i> sp.	MSL 23	EF466122	0,945		
<i>Micromonosporaceae</i>						
Neph -8	Uncultured actinobacterium	AKYH579	AY921724	0,941		
<i>Streptomycetaceae</i>						
Ncos -9	<i>Streptomyces</i> <i>alanosinicus</i>	str. NBRC 13493	AB184442	0,984		
<i>Unclassified Coriobacterinae</i>						
Nvoe -2	Uncultured actinomycete	MgMjW-08 *	AB234518	0,988		
Nvoe -3	Uncultured actinomycete	Rs-D41*	AB192230	0,968		
<i>Unclassified Rubrobacterinae</i>						
Neph -5	Uncultured bacterium	SZB15	AM176851	0,975		
Nguy -4	Uncultured bacterium	SZB15	AM176851	0,969		
Nguy -5	Uncultured bacterium	HnB120	AB291428	0,983		
Ncos -5	Uncultured bacterium	SZB15	AM176851	0,981		

Tableau A-1 | Affiliation phylogénétique des séquences d'ADNr 16S relatives aux bandes DGGE des profils de 4 espèces de *Nasutitermes*.

Les séquences sont regroupées selon leur embranchement taxonomique.

Ncos=*N. costalis*, Nguy=*N guyanae*, Neph=*N. ephratae*, Nvoe=*N. voeltzkowi*



De nombreux ribotypes découverts par cette étude se regroupent phylogénétiquement avec des clones précédemment trouvés chez les termites (Neph1, Nvoe1, Nguy1, Nguy2, Ncos1, Ncos3, Ncos4, Ncos8, Neph9, Neph10, Nvoe6, Nguy7, Nguy8, Neph6, Neph7, Nvoe2, Nvoe3 ; Figure A-7). Ils appartiennent aux familles des *Propionibacteriaceae*, des *Coriobacteriaceae*, des *Micrococcinae* (autres que *Cellulomonadaceae*) et des *Opitutaceae* (pour les *Verrucomicrobia*). Cependant il est difficile d'inclure avec certitude nos séquences dans ces familles. En effet, les séquences paraissent assez éloignées génétiquement des genres constituants ces familles (Idmoy<95 % avec les autres genres connus) et pourraient appartenir en réalité à des groupements actinobactériens encore non définis. Par ailleurs, à l'exception notable de la bande Ncos9 qui correspond par identité à une souche connue de *Streptomyces alanosinicus* et à moindre mesure les bandes relatives aux *Cellulomonadaceae* (Ncos7), la majorité des séquences détectées par notre étude ne correspondent pas à des bactéries identifiées et isolées en culture (Id<95%). Il s'agit donc, pour la plupart des actinomycètes révélés par cette étude, de formes inconnues et toujours non-cultivées.

A-V/ Discussion globale.

A-V-1/ Sur la question de la spécificité de la microflore actinomycétale résolue par la technique de nested PCR - DGGE

Les profils de migration obtenus par la méthode de nested PCR-DGGE associée au séquençage des bandes excisées nous donnent une représentation directe de la structure des communautés actinomycétales présentes dans le tube digestif des ouvriers de *Nasutitermes spp.*. La méthode a permis d'analyser les modifications de ces structures communautaires à plusieurs échelles, de l'intérieur d'une colonie soumise à différents traitement alimentaire jusqu'au genre à travers plusieurs espèces africaines et caribéennes.

Le premier objectif était de vérifier si la présence des actinomycètes dans la panse est temporaire ou permanente, puis si elle est d'origine exogène liée au bois ingéré ou réellement liée au terme. D'après la comparaison des différents profils DGGE, nos résultats étayent largement l'idée que l'intestin de *N. costalis* est composé de communautés actinomycétales stables et caractéristiques au terme. En effet, quelque soit le traitement alimentaire imposé et l'espèce de terme étudiée, les communautés actinomycétales gardent un profil similaire (Figure A-1). Plus encore, leurs structures sont nettement différentes de celles du bois consommé. La communauté actinobactérienne révélée à partir de la panse des ouvriers de

Nasutitermes ne serait donc pas une microflore de passage, mais bien une microflore associée spécifiquement au tube digestif. Les actinomycètes s'incluraient donc parmi les 12 phyla bactériens incluant des symbiontes de termites (Hongoh et al. 2006)

Afin de confirmer ces premiers résultats et de voir s'ils se généralisent au delà de la simple colonie, il a paru important de préciser l'influence que pouvait apporter le maintien en élevage sur les communautés bactériennes symbiotiques. Deux colonies d'origine différente de *Nasutitermes costalis*, l'une provenant du laboratoire de l'université de Dijon (NcosD) et l'autre de la Guadeloupe (NcosG) ont été comparées. Les profils DGGE ne présentent pas de différence significative, quelle que soit la colonie analysée, les communautés actinomycétales majeures se maintiennent au niveau de l'espèce. Ce résultat est en accord avec les dernières publications (Hongoh et al. 2005 ; Schmitt-Wagner et al. 2003) qui affirment que l'ensemble de la microflore bactérienne intestinale est associé spécifiquement au terme.

A-V-2/ Sur la variation des structures des communautés actinobactériennes à l'échelle interspécifique

L'environnement immédiat -et notamment la nourriture ingérée- n'ayant pas d'influence sur la structure des communautés actinobactériennes, les investigations ont pu être orienté sur les variations communautaires à l'échelle interspécifique. Neuf espèces ont été étudiées ; chacune montre un patron de migration distinct, sensiblement différent de celui des autres espèces bien que certaines bandes soient communes à plusieurs profils (Figure A-4). Cette différence interspécifique n'est cependant pas corrélée aux distances géographiques entre les espèces de *Nasutitermes* que l'on considère les espèces africaines ou caribéennes. Le regroupement entre les communautés actinomycétales des différents termites, calculé sur une base phylogénétique par le programme UniFrac, ne correspond en effet ni à l'éloignement géographique, ni à la phylogénie des espèces de *Nasutitermes*. L'hypothèse d'une évolution conjointe entre les termites et leur microflore actinomycétale ne serait pas vérifiée, de même que l'idée d'un recrutement direct via l'environnement proche. En revanche, on peut supposer que les communautés actinomycétales se structurent au niveau de l'espèce selon des facteurs écologiques tels que la spécialisation d'une espèce pour un type particulier de nourriture (Brune 2006). La proportion de certaines populations actinomycétales pourrait alors être surexprimée par rapport à d'autres.

A-V-3/ Diversité des actinobactéries peuplant le tube digestif des *Nasutitermes* spp.

Le nombre relativement élevé de bandes visibles sur les profils, entre 8 et 14 bandes, indique que la diversité en actinomycètes dans la panse des termites du genre *Nasutitermes* est plus importante que prévue. En se focalisant sur cette microflore minoritaire, nos investigations révèlent en effet une richesse spécifique jusqu'alors insoupçonnée et négligée par les études globales sur la diversité bactérienne. Celles-ci ont certainement sous-estimée la part des actinomycètes à cause de biais liés à la PCR ou par l'utilisation d'amorces universelles ciblant mal cette classe de bactéries (Farris & Olson 2007). L'analyse des séquences découvertes dans notre étude permet d'identifier clairement 9 familles d'actinobactéries (*Propionibacteriaceae*, *Cellulomonadaceae*, *Promicromono-sporaceae*, *Beutenbergiaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Streptomycetaceae*, *Micromono-sporaceae*, *Coriobacteriaceae* et *Rubrobacteriaceae*), plus une famille de *Verrucomicrobia* (*Opitutaceae*) qui n'était pourtant pas ciblée par les amorces utilisées. La majorité des séquences de propionibactéries (Ncos3, Ncos4, Ncos8, Nguy7, Nguy8, Nvoe6, Neph9 et Neph10) ainsi que les coriobactéries trouvées chez *N. voeltzkowi* (Nvoe2 et Nvoe3) ou les *Micrococcineae* (Neph6 et Neph7), sont génétiquement proches de séquences déjà décelées chez d'autres termites par les techniques de clonage-séquençage. Les séquences appartenant aux autres familles identifiées dans notre étude se rapprochent d'avantage de clones ou d'isolats environnementaux (Tableau A-1).

A-V-4/ Sur la pertinence des séquences d'actinobactéries découvertes.

Les actinomycètes spécifiques aux termites

La comparaison les séquences obtenues par notre étude avec celles déjà référencées comme provenant de l'intestin des termites apporte également une vision complémentaire sur les plans évolutif et fonctionnel. Au-delà des investigations expérimentales, la monophylétie des séquences actinomycétales issues de l'intestin des termites est certainement l'un des meilleurs moyens de détecter les formes réellement symbiotiques. Or, sur ce point, seules les séquences de propionibactéries, de coriobactéries voire de *Micrococcineae* trouvées chez *N. ephratae* sont incluses dans un groupe monophylétique (contenant exclusivement des clones isolés chez les termites) et pourraient donc être considérés comme associées spécifiquement à l'intestin des termites. Pour preuve supplémentaire, les propionibactéries ont déjà été localisées par la méthode FISH de fluorescence *in situ* comme recouvrant la paroi de la panse du terme xylophage *Reticulitermes speratus* (Nakajima et al. 2005). Leur action

dans le tube digestif reste en revanche inconnue mais, selon leur position, ils pourraient jouer un rôle de spécialistes en tant que décomposeurs des composés aromatiques du bois. En effet, la rupture des noyaux aromatiques nécessite de l'oxygène qui, dans la panse, est accessible uniquement en périphérie via l'épithelium (Brune & Friedrich 2000). Or, certaines espèces de *Propionibacterium* et de *Nocardioides* ont déjà été signalées comme capables de dégrader ce genre de composés (Benz et al. 1998 ; Saito et al. 2000). Contrairement aux propionibactéries, peu d'éléments nous permettent de statuer sur la nature des relations avec les coriobactéries. Néanmoins, au regard de leur récurrence dans le tube digestif de nombreux termites (Figure A-7), il est probable qu'ils soient réellement des symbiontes.

Le cas des autres actinomycètes

Pour les autres actinomycètes détectés dans cette étude, la discussion est beaucoup plus ouverte. Les séquences relatives aux *Micrococcineae* (Ncos6, Ncos7, Neph4, Neph11, Nguy6), *Corynebacteriaceae* (Ncos2, Neph3, Nguy3) et *Streptomycetaceae* (Ncos9) sont dispersés phylogénétiquement avec des espèces environnementales (cf. Partie B). Ces actinomycètes ne seraient alors sans doute pas dans une relation étroite avec les termites. Par contre, des souches relatives aux familles *Cellulomonadaceae/Promicromono-sporaceae*, *Corynebacteriaceae* et *Streptomycetaceae* ont déjà été isolées en culture à partir du tube digestif d'autres espèces de termites ou de leur environnement proche (König et al. 2006).

Les souches les plus fréquemment cultivés sont les streptomycètes et quelques espèces de *Micrococcineae*. Toutefois, s'ils sont souvent représentés en culture, leur abondance dans le tube digestif n'est pas pour autant établi. Dans l'analyse comparant les deux colonies de *N. costalis* (cf. Figure A-3), les bandes correspondant aux séquences de *Streptomycetaceae* (lignes 14) ou de *Cellulomonadaceae* (lignes 8, 9, 11, 12) ne sont pas présentes dans tous les profils DGGE de la colonie guadeloupéenne (NcosG). Ces familles ne seraient alors que de passage dans la panse et auraient une origine exogène en relation avec le bois ingéré. Cette hypothèse avait initialement été exclue car les bandes DGGE des échantillons de bois n'étaient pas représentés dans les profils de tube digestif (cf. Figure A-2). Cependant, le profil du bois consommé montre une très grande diversité avec de nombreuses bandes de faible intensité. Certaines de ces souches minoritaires pourraient trouver dans la panse un milieu apte à leur développement et s'y maintenir sans entretenir de relations mutualistes avec le terme. Ils pourraient être :

- (i) soit volontairement retenues sur les structures d'accrochage mises à disposition par l'hôte telles que les épines cuticulaires, les microvillosités, etc. Cette hypothèse a été

formulée par D. Bignell suite à l'observation de filaments de type actinobactérien accrochées aux structures secondaires de la panse de *Procubitermes aburiensis* (Bignell et al. 1979).

- (ii) soit par simple opportunisme, en profitant d'un environnement favorable offrant un flux constant de nourriture. Le terme pourrait y trouver un intérêt pour son métabolisme digestif. Les actinomycètes sont en effet connus pour leur capacité de dégradation des molécules végétales complexes (cellulose, hémicellulose, tanins...) et ils pourraient agir soit en synergie avec les enzymes digestives propres aux termites, soit en complément en intervenant dans la digestion de certaines hémicelluloses. Ainsi, les travaux de Miyata *et al.* (2007) montrent que les termites *Nasutitermes takasagoensis* nourris exclusivement avec du xylane voient augmenter significativement leur population d'actinomycètes. Ces observations suggèrent qu'une partie au moins de la microflore n'est ni transitoire ni réellement permanente, mais peut être semi-permanente.

La présence et le rôle de *Rubrobacteriaceae* restent non expliqués. Les séquences découvertes chez 3 des 9 espèces de *Nasutitermes* sont proches de clones environnementaux mais plutôt éloignées des isolats connus tel que des *Conexibacter spp.*

A-VI/ Conclusion, limites et perspectives

En conclusion, bien que relativement peu abondant dans le tube digestif des termites, le peuplement actinobactérien en serait néanmoins une composante spécifique et potentiellement utile dans la digestion des matériaux du bois. Toutes les séquences analysées comme associées au terme sont relatives à de nouvelles espèces. Leur acquisition semble être plutôt liée au terme, même si l'origine exogène à partir de la nourriture ne peut être totalement exclue pour une partie des souches. Cette microflore pourrait même avoir co-évolué avec leur hôte puisque certaines souches issues de l'intestin des termites forment des groupes monophylétiques.

Néanmoins, les formes de coriobactériales ou de micrococcinés répandues chez divers termites sous forme de groupes monophylétiques ne sont pas apparues chez toutes nos espèces étudiées. La raison pourrait être d'ordre technique puisque les amorces PCR utilisées ne cibleraient pas toutes les actinobactéries. L'alignement des oligonucléotides avec les séquences 16S référencées dans Genbank montre en effet le manque d'identité pour la région amorcée.



Partie B

Etude de différents paramètres visant à l'isolement par la culture des actinomycètes associés spécifiquement au tube digestif du terme *Nasutitermes voeltzkowi*.

B-I/ Introduction

Dans la première partie, l'analyse des communautés actinobactériennes du tube digestif des termites par les méthodes moléculaires -et en particulier le séquençage de leur ADNr 16S- a permis de définir précisément leur diversité taxonomique. Pourtant de nombreuses interrogations persistent sur leur rôle en association avec leur hôte. L'idée serait alors d'isoler ces actinomycètes spécifiques aux termites pour en étudier les capacités enzymatiques. C'est ici l'objectif de cette deuxième partie réalisée en parallèle avec la première. Mais c'est aussi l'occasion de confronter deux approches distinctes, les approches microbiologique et moléculaire, qui historiquement ont permis d'éclairer différemment notre compréhension des mécanismes de coopération inhérents au système digestif des termites.

B-I-1/ L'apport des "cultivables" du tube digestif des termites.

Dans le domaine de l'écologie microbienne, le tube digestif des termites est parmi les écosystèmes les plus étudiés du monde vivant. Pourtant, et malgré des efforts continus pour isoler les procaryotes symbiontes, le nombre de bactéries cultivées est bien inférieur à celui des séquences d'ADNr16S obtenues par les analyses moléculaires (Brune 2006). Comparé au nombre de bactéries observables directement dans l'intestin du terme par microscopie électronique, on remarque que 90% échappent à la culture sur boîte (Schultz & Breznak 1978 ; Tholen et al. 1997). Néanmoins, l'isolement de souches issues du tube digestif des termites a amené dans de nombreux cas à la découverte de nouvelles bactéries uniques en leur genre et présentant des propriétés métaboliques particulièrement intéressantes (König et al. 2006 ; Breznak 2000). La majorité des isolats appartiennent soit au phylum des firmicutes avec une forte représentation des bacilles (staphylocoques, entérocoques, *Clostridia spp.*), soit au phylum des protéobactéries (dont les *Pseudomonas spp.*, les *Enterobacter spp.* ou les *Citrobacter spp.*), soit encore au phylum des actinobactéries (voir B-I-2).

En voulant étudier les potentialités digestives de la microflore intestinale des termites, plusieurs chercheurs ont réussi à isoler des bactéries capables de dégrader le bois. Qu'elles aient la capacité de digérer la cellulose, l'hémicellulose (xylane, galactose, arabinose, etc), la lignine ou les composés aromatiques, on a trouvé des isolats pour tous les stades de décomposition du bois. En se basant sur le type de bactéries isolées, König *et al.* (2006) différencient ainsi trois étapes dans la dégradation de la matière lignocellulosique : la phase hydrolytique (pouvant être assurée par une grande partie des isolats), la phase d'oxydation/fermentation (avec notamment des protéobactéries) et la phase comprenant la méthanogenèse (par les *Methanobrevibacter*), l'homoacétogenèse (par les *Acetonema*, *Clostridium* et *Sporomedusa*) et la réduction du sulfate (par les *Desulfovibrio*). De même, des études microbiologiques ont permis l'isolement de bactéries pouvant intervenir dans les voies d'économie de l'azote avec des espèces fixatrices d'azote (relatives aux genres *Enterobacter*, *Desulfovibrio* ou *Rhizobium/Sino-rhizobium*) (Breznak 2000) ou des espèces recyclant l'acide urique (*Streptococcus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Bacteroides termitidis*) (Potrikus & Breznak 1981). Toutes ces découvertes - la liste n'étant pas exhaustive - ont permis de mieux comprendre les rôles majeurs de la microflore digestive du terme. Pourtant, notre connaissance des processus métaboliques dépendant des symbiontes reste souvent incomplète et discutée (Tholen & Brune 2000). L'activité avancée pour certains isolats semble en effet très spéculative et rien ne prouve qu'elles jouent un rôle dans l'intestin du terme. Il apparaît nécessaire de renouveler les efforts pour cultiver les bactéries numériquement et/ou fonctionnellement importantes dans l'intestin du terme (Brune 2006).

B-I-2/ Le cas particulier des actinomycètes cultivés à partir du tube digestif des termites.

Le phylum des actinobactéries est un exemple intéressant du biais induit par les limites des techniques de culture car il présente une tendance inverse par rapport aux autres phyla. En effet, bien que faiblement représentés dans la diversité microbienne totale du terme, les actinomycètes sont parmi les plus nombreux parmi les isolats. Les souches les plus fréquentes sont des *Streptomyces spp.*, puis viennent les représentants des genres *Cellulomonas*, *Micromonospora* ou *Rhodococcus/Nocardia* qui ont également été retrouvés chez plusieurs espèces de termites, inférieurs et supérieurs. Plusieurs de ces actinomycètes ont montré des potentialités enzymatiques intéressantes (cellulases, xylanases, uréase, etc) pouvant être liées aux différents processus digestifs du terme (Pasti & Belli. 1985 ; Pasti *et al.* 1990 ; Kuhnigk *et al.* 1994 ; Maeda *et al.* 1995 ; Shäfer *et al.* 1996 ; Lenoir-labé & Rouland 1998 ; Wenzel *et al.* 2002 ; Bakalidou *et al.* 2002).

Isolats	Termites	Références
Phylum Actinobacteria		
<i>Actinomadura sp.</i>	<i>Coptotermes lacteus</i>	Kurtbböke and French 2007
<i>Arthrobacter sp.</i>	<i>Nasutitermes nigricipes</i>	Kuhnigk et al. 1994
<i>Aureobacterium sp.</i>	<i>Reticulitermes hesperatus</i>	
<i>Cellulomonas cellulans</i>	<i>Reticulitermes santonensis</i>	
<i>Cellulomonas sp.</i>	<i>Nasutitermes nigricipes</i>	Kuhnigk et al. 1994
	<i>Reticulitermes santonensis</i>	
	<i>Zootermopsis augusticollis</i>	Kuhnigk 1996
	<i>Nasutitermes nigricipes</i>	
	<i>Neotermes castaneus</i>	Kuhnigk 1996 ;
	<i>Schedorhinotermes intermedius</i>	Wenzel et al. 2002
	<i>Heterotermes indicola</i>	
	<i>Mastotermes darwiniensis</i>	
	<i>Zootermopsis augusticollis</i>	
<i>Geodermatophilus sp.</i>	<i>Coptotermes lacteus</i>	Kurtbböke and French 2007
<i>Isoptericola variabilis</i>	<i>Mastotermes darwiniensis</i>	Bakalidou et al. 2002
<i>Kocuria varians</i>	<i>Zootermopsis augusticollis</i>	Wenzel et al. 2002
<i>Microbacterium sp.</i>	<i>Zootermopsis augusticollis</i>	Wenzel et al. 2002
<i>Microbispora sp.</i>	<i>Coptotermes lacteus</i>	Kurtbböke and French 2007
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Reticulitermes santonensis</i>	Kuhnigk 1996
<i>Micromonospora sp.</i>	<i>Coptotermes lacteus</i>	Kurtbböke and French 2007
<i>Micromonospora acetoformici</i>	<i>Reticulitermes lucifugus</i>	Sebald and Prévot 1962
<i>Micromonospora propionici</i>	<i>Amiatermes minimus</i>	Hungate 1946
<i>Nocardia sp.</i>	<i>Reticulitermes santonensis</i>	Kuhnigk and König 1997 ; Shäfer et al. 1996
<i>Pseudonocardia sp.</i>	<i>Coptotermes lacteus</i>	Kurtbböke and French 2007
<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Zootermopsis augusticollis</i>	Kuhnigk 1996
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	<i>Reticulitermes speratus</i>	Chung et al. 1994
<i>Rhodococcus sp.</i>	<i>Coptotermes lacteus</i>	Kurtbböke and French 2007
<i>Saccharopolyspora</i>	<i>Coptotermes lacteus</i>	Kurtbböke and French 2007
<i>Streptomyces spp.</i>	<i>Nasutitermes nigricipes</i>	Kurtbböke and French 2007 ; Bignell et al. 1980 ;
	<i>Coptotermes lacteus</i>	Kuhnigk and König 1997 ; Mannesmann and Piechowski 1989 ;
	<i>Cubitermes severus</i>	Shäfer et al. 1996 ;
	<i>Heterotermes indicola</i>	Watanabe et al. 2003 ;
	<i>Mastotermes darwiniensis</i>	Labé-Lenoir and Rouland 1998 ;
	<i>Procubitermes aburiensis</i>	Pasti et al. 1990 ; Pasti and Belli 1985.
	<i>Reticulitermes speratus</i>	
	<i>Nasutitermes lujae</i>	

Tableau B-1 | Tableau récapitulatif des actinobactéries isolées en culture à partir du tube digestif des termites.

Tableau copié à partir de König et al. 2006 et complété d'après nos propres recherches bibliographiques.

Cependant, la question est de savoir si la diversité des cultivables correspond réellement à celle de la microflore digestive du terme, si les enzymes produites par les isolats le sont également dans l'intestin du terme. La littérature nous montre que les biais à la culture sont nombreux (Brennan 2000 ; Rappe & Giovannoni 2003 ; Zengler et al. 2002). D'après nos propres investigations (cf. Partie A), la communauté actinomycétale présente dans la panse des termites ne correspond pas à celle représentée en culture malgré le nombre d'isolats actinobactériens. Il serait donc intéressant de comparer les résultats obtenus en microbiologie avec ceux obtenus en biologie moléculaire. C'est d'ailleurs ce que proposent de récentes publications (Stevenson et al. 2004 ; Hayashi et al. 2007), c'est ce que nous proposons *in fine* dans notre étude.

B-II/ Analyse de l'influence de différents facteurs expérimentaux sur la culture des actinomycètes issus du tube digestif des termites

B-II-1/ Objectif de l'étude.

Cette étude a pour objectif final de cultiver des actinomycètes symbiontes du tube digestif des termites ouvriers de l'espèce *Nasutitermes voelzkowi*. Aussi, les expériences se sont-elles orientées vers la recherche d'une stratégie d'isolement la plus efficace possible. Une approche a été tentée dernièrement basée sur l'utilisation de bactériophages, sans pour autant obtenir de nouveaux isolats spécifiques au terme (Kurtböke & French 2007). Ici, nous proposons de faire varier plusieurs paramètres et d'évaluer leur influence sur l'isolement des actinomycètes spécifiques. Plusieurs pistes ont ainsi été testées à différentes étapes de la culture microbiologique. Depuis plusieurs années, la littérature témoigne de nouvelles stratégies innovantes, développées pour accéder à la culture des microorganismes "incultivables" (Stevenson et al. 2004 ; Fröhlich & König 2000 ; Zengler et al. 2002 ; Kaeberling et al. 2002 ; Sait et al. 2002 ; Breznak 2002 ; Joseph et al. 2003 ; Davis et al. 2005). Nous nous sommes inspirés de ces dernières avancées et des techniques généralement utilisées pour accéder à la microflore digestive des termites.

B-II-2/ Méthodologie détaillée.

Différents paramètres étudiés

Le milieu HV complété d'une solution d'antibiotiques et de vitamines (cf. 'mat. et meth.' pour la composition du milieu ; Hayakawa & Nonomura 1987) est un milieu sélectif pour la croissance des actinomycètes ; il nous sert de milieu de base. Il nous permettra en outre de comparer l'influence des 6 différents paramètres testées, de façon individuelle ou combinée. Ces paramètres sont les suivant :

- L'effet de la nutrition des termites avant leur dissection sera étudié. En soumettant les termites à différents régimes alimentaires (jeûne, alimentation stérile), la microflore digestive est modifiée, voire amoindrie, mais conserve une communauté particulière constituée essentiellement de bactéries symbiotiques. Ces traitements servent principalement à éliminer la microflore de passage dont on sait qu'elle peut contenir un nombre important de contaminants (Lenoir-Labé 1994).

- Dans le même objectif, il est possible d'intervenir sur l'inoculum pour diminuer la microflore indésirable (Bulina et al. 1997 ; Li et al. 2003). Les milieux sont ainsiensemencés

avec un broyat de tube digestif entier ou vidé de son contenu éliminant théoriquement les bactéries d'origine exogène du tractus digestif.

- Plus classiquement, les sources de carbone et de composés aromatiques (Kuhnigk et al. 1994 ; Wilson & Bouwer 1997 ; Harazano et al. 2003), sont utilisées comme facteur limitant pour la sélection de bactéries plus ou moins spécialistes dans leurs dégradations. Ici, et sachant que les termites dégradent les composés dérivés du bois, nous avons testé des milieux à base d'acides humiques (composés aromatiques) ou de xylane comme seules sources de carbone.

- Pour certains échantillons, l'ajout d'inhibiteurs sélectifs dans les milieux de culture a été testé dans le but de diminuer la croissance de bactéries contaminantes. Si tous les milieux utilisés contiennent un mélange d'antibiotiques -antifongique (nystatine) et antibactérien Gram-négatif (acide nalidixique)-, un anti-streptomycètes, la rubomycine, a également été associé pour favoriser la croissance d'actinomycètes rares (Zakharova et al. 2003).

- Les conditions de croissance bactérienne interviennent également de manière importante dans la sélectivité du milieu. Il est possible de faire varier les conditions de pH, les taux de O₂ et de CO₂ (Wenzel et al. 2002 ; Davis et al. 2005 ; Sait et al. 2006). Le plus souvent, l'ajustement de ces paramètres s'effectue en fonction de celui du milieu naturel pour permettre une croissance de colonies rares. Les conditions de la panse ont ainsi été mimées pour certains milieux en augmentant le pH du milieu à des valeurs plus basiques de 8,6.

- Enfin, le temps d'incubation est souvent une bonne solution pour l'isolement de souches rares (Davis et al. 2005). Il peut, dans certains cas, être prolongé jusqu'à plusieurs mois. Dans cette étude, nous nous sommes restreints à étendre l'incubation à un seul mois, soit deux fois plus que le temps généralement utilisé.

Analyse des cultures.

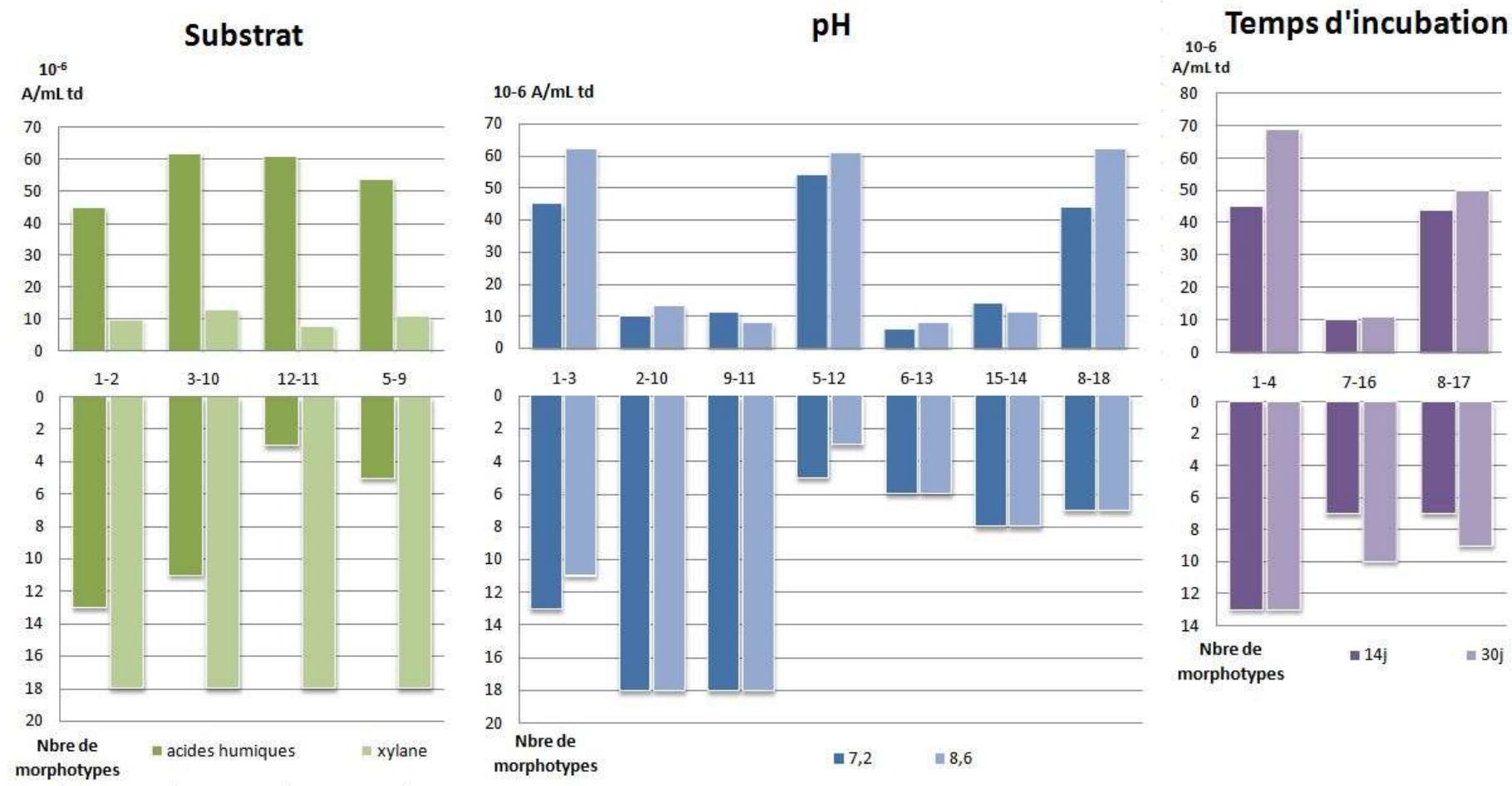
La préparation et l'ensemencement des milieux avec le broyat des panses de termites de l'espèce *Nasutitermes voeltzkowi*, ainsi que les conditions de culture sont détaillées dans la partie "matériels et méthodes". Les cultures sur boîtes de Pétri sont analysées selon la numération totale (ramenée en nombres de colonies d'actinomycètes par boîte de culture et par millilitre de tube digestif utilisé comme inoculum) et la diversité en morphotypes (cf. 'mat. et meth.').

Source de carbone	pH	Facteurs testés				#	Numération totale A/mL TD	Nombre de morphotypes
		Temps d'incubation	Inoculum	Antibiotiques	Prétraitements sur les termites			
Ac. humiques	7,2	14 jours	Panses pleines	Cocktail	Sans traitement	1	24750	45.10 ⁺⁶
Xylane	7,2	14 jours	Panses pleines	Cocktail	Sans traitement	2	5750	10.10 ⁺⁶
Ac. humiques	8,6	14 jours	Panses pleines	Cocktail	Sans traitement	3	34250	62.10 ⁺⁶
Ac. humiques	7,2	30 jours	Panses pleines	Cocktail	Sans traitement	4	38500	69.10 ⁺⁶
Ac. humiques	7,2	14 jours	Panses vidées	Cocktail	Sans traitement	5	30250	54.10 ⁺⁶
Ac. humiques	7,2	14 jours	Panses pleines	+ Rubomycine	Sans traitement	6	3100	6.10 ⁺⁶
Ac. humiques	7,2	14 jours	Panses pleines	Cocktail	Jeûne	7	5500	10.10 ⁺⁶
Ac. humiques	7,2	14 jours	Panses pleines	Cocktail	Nourriture stérile	8	24500	44.10 ⁺⁶
Xylane	7,2	14 jours	Panses vidées	Cocktail	Sans traitement	9	6000	11.10 ⁺⁶
Xylane	8,6	14 jours	Panses pleines	Cocktail	Sans traitement	10	7175	13.10 ⁺⁶
Xylane	8,6	14 jours	Panses vidées	Cocktail	Sans traitement	11	4200	8.10 ⁺⁶
Ac. humiques	8,6	14 jours	Panses vidées	Cocktail	Sans traitement	12	34000	61.10 ⁺⁶
Ac. humiques	8,6	14 jours	Panses pleines	+ Rubomycine	Sans traitement	13	4175	8.10 ⁺⁶
Ac. humiques	8,6	14 jours	Panses vidées	+ Rubomycine	Sans traitement	14	6125	11.10 ⁺⁶
Ac. humiques	7,2	14 jours	Panses vidées	+ Rubomycine	Sans traitement	15	7700	14.10 ⁺⁶
Ac. humiques	7,2	30 jours	Panses pleines	Cocktail	Jeûne	16	6000	11.10 ⁺⁶
Ac. humiques	7,2	30 jours	Panses pleines	Cocktail	Nourriture stérile	17	28000	50.10 ⁺⁶
Ac. humiques	8,6	14 jours	Panses pleines	Cocktail	Nourriture stérile	18	33750	62.10 ⁺⁶

Tableau B-2 | Numération totale et nombre de morphotypes observés pour les différents milieux d'isolement analysés.

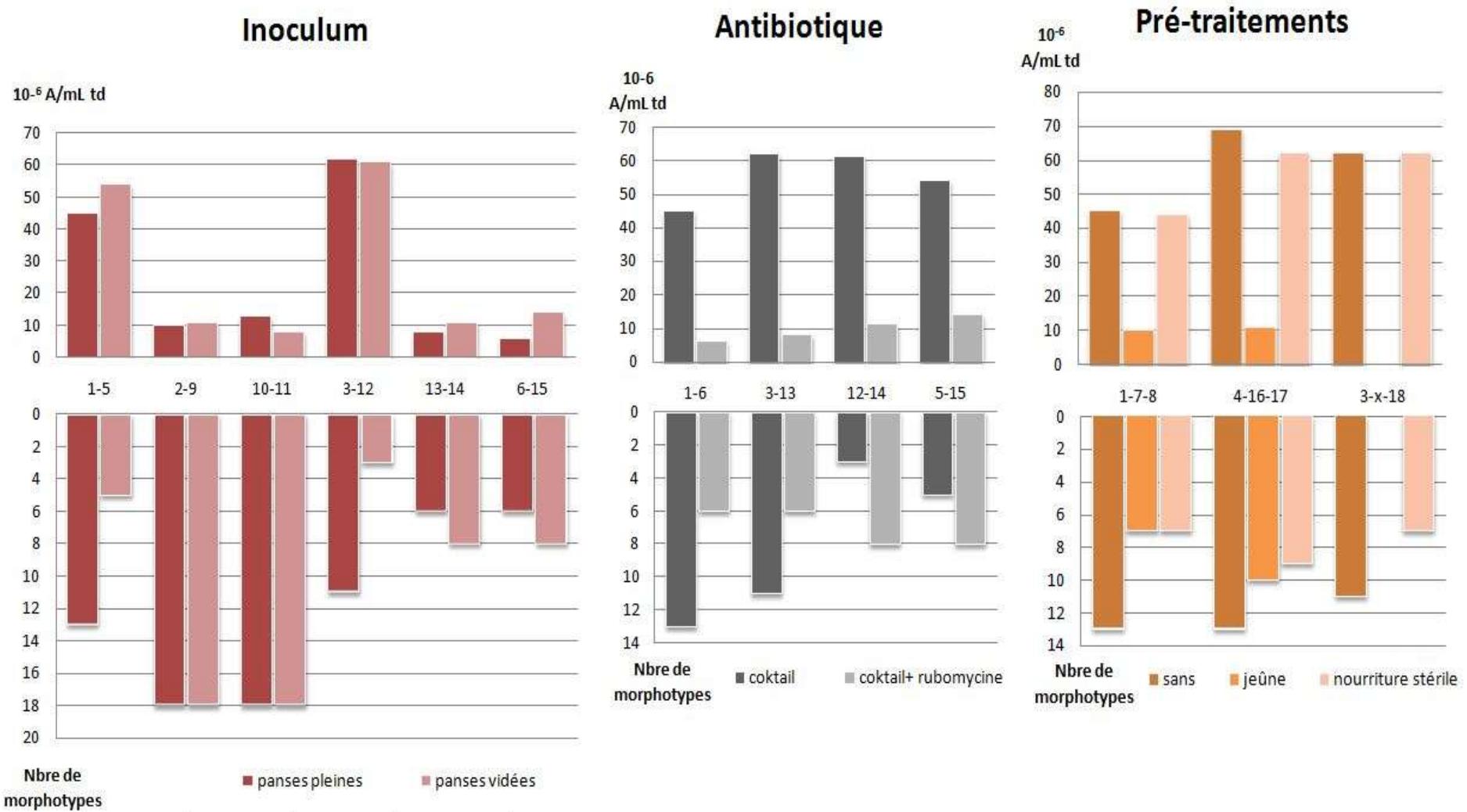
Le tableau montre les différentes combinaisons testées à partir des 6 paramètres étudiés.

Chaque milieu porte un numéro de 1 à 18. Le milieu 1 correspond au milieu HV (milieu de référence).



Figures B-1 | Analyse de l'influence des paramètres testés sur la numération totale et la diversité morphotypique

Les graphiques montrent des comparaisons deux à deux entre les milieux ne faisant varier que le paramètre étudié.

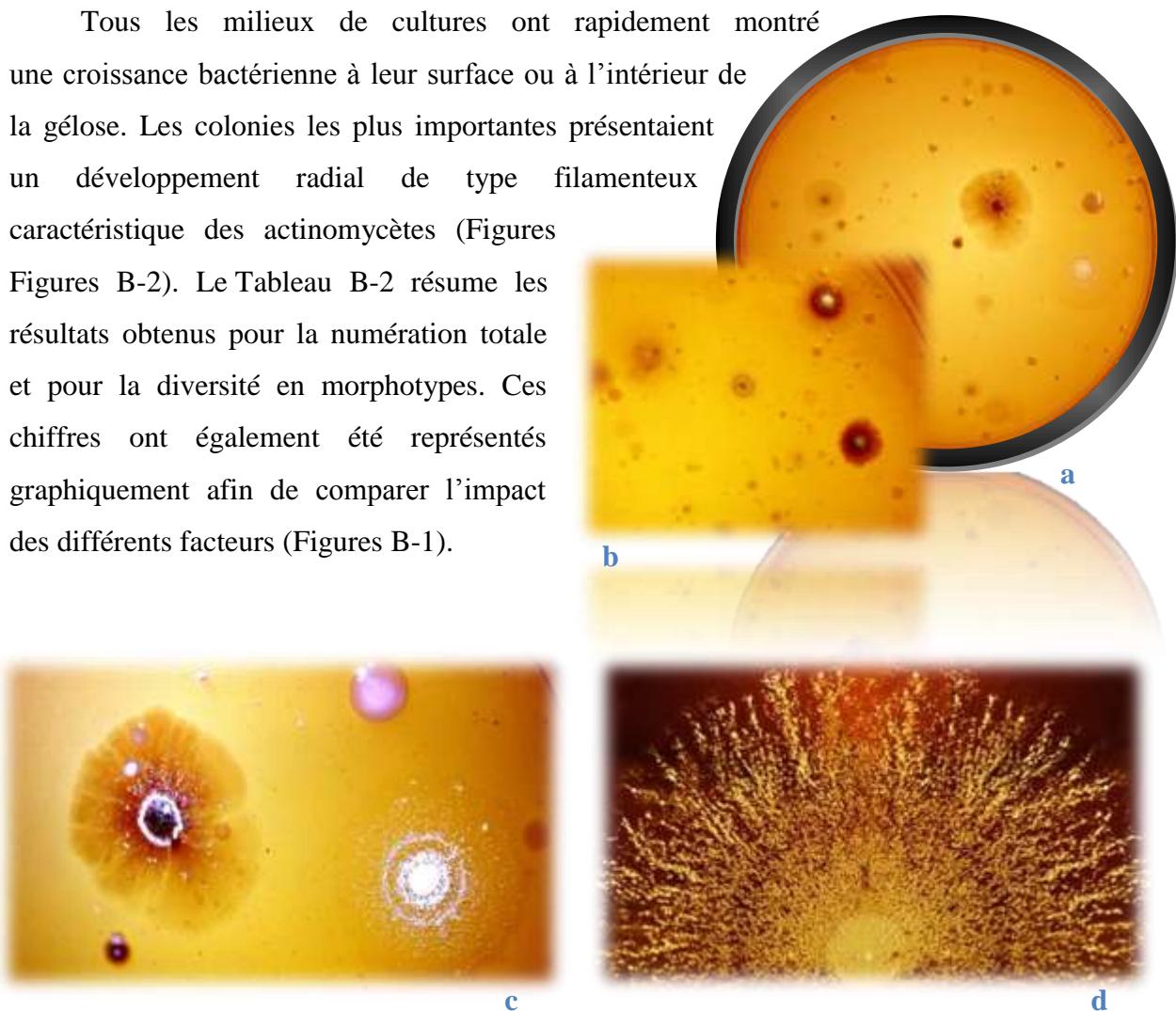


Figures B-1 (suite) | Analyse de l'influence des paramètres testés sur la numération totale et la diversité morphotypique

Les graphiques montrent des comparaisons deux à deux entre les milieux ne faisant varier que le paramètre étudié.

B-II-3/ Croissance actinobactérienne sur les milieux de sélection.

Tous les milieux de cultures ont rapidement montré une croissance bactérienne à leur surface ou à l'intérieur de la gélose. Les colonies les plus importantes présentaient un développement radial de type filamentueux caractéristique des actinomycètes (Figures Figures B-2). Le Tableau B-2 résume les résultats obtenus pour la numération totale et pour la diversité en morphotypes. Ces chiffres ont également été représentés graphiquement afin de comparer l'impact des différents facteurs (Figures B-1).



Figures B-2 a, b, c, d| Exemples de morphotypes d'actinomycètes observés sur les milieux d'isolement.

B-II-4/ Résultats des énumérations bactériennes en fonction des facteurs testés.

(cf. Figures B-1)

- Influence de l'alimentation

Il n'existe pas de différences significatives entre la densité d'actinomycètes cultivés à partir des tubes digestifs d'animaux nourris avec du bois qu'il soit stérile ou non. Par contre, le jeûne des insectes entraîne une très forte réduction de la quantité d'actinomycètes cultivables. En ce qui concerne la diversité, le plus grand nombre de morphotypes différents est rencontré dans les tubes digestifs des animaux témoins (± 12), la diversité spécifique des animaux à jeûn ou élevés sur du bois stérile étant équivalente (de 7 à 9 morphotypes).

- Influence de l'inoculum

Il n'existe aucune différence quantitative significative entre les populations d'actinomycètes provenant des différents types d'inoculum (panses pleines ou vidées). En ce qui concerne la diversité, celle-ci est plus élevée dans les milieux HV - acides humiques inoculés avec des panses pleines.

- Influence de la composition du milieu

+ Source de carbone

L'étude quantitative des résultats confirme que le milieu HV contenant de l'acide humique comme seule source de carbone est le milieu qui permet la croissance d'actinomycètes la plus importante. Le milieu devient plus contraignant en utilisant du xylane comme seule source de carbone. A l'inverse, l'utilisation du xylane augmente de façon significative le nombre de morphotypes isolés : de 2 à 13 dans les milieux contenant de l'acide humique, 18 dans ceux avec xylane.

+ Antibiotique

L'ajout de la rubomycine dans le milieu de sélection diminue la densité des actinomycètes d'un facteur 6. Ceci confirme l'action forte de cet antibiotique sur la croissance des streptomycètes qui constituent souvent la majeure partie des souches cultivées sur milieu HV. Son action sur la diversité des souches d'actinomycètes est par contre clairement liée au pH puisque la rubomycine diminue le nombre de morphotypes dans les milieux à pH neutre (7,2) alors qu'elle les augmente dans les milieux à pH basique.

+ pH

Un pH légèrement basique (8,6) augmente la densité des colonies d'actinomycètes. Par contre, en l'absence d'autres facteurs (rubomycine, cf ci-dessus), le pH n'influe pas sur la diversité morphotypique des populations actinomycétales du tube digestif de *N. voelztkowi*.

- Influence du temps d'incubation

Lorsque la durée de la culture passe de 2 à 4 semaines, on observe une légère augmentation du nombre et de la diversité des colonies isolées mais celle-ci reste peu sensible.

B-II-5/ Conclusion partielle sur l'influence des différents facteurs testés

En conclusion, la densité d'actinomycètes dans nos cultures peut être augmentée en allongeant le temps d'incubation ou en utilisant un pH basique (8,6). Ces conditions alcalines se trouvent être plus proches de celles détectées dans le tube digestif des *Nasutitermes* (Brune et al. 1995). L'ensemencement par un tube digestif entier ou partiellement nettoyé n'a par contre aucune influence. Enfin, les termites mis à jeun semblent contenir moins de microorganismes par rapport aux termites élevés normalement ou en condition stérile. Cette perte en actinomycètes était envisageable vu la maigreure des tubes digestifs disséqués. Il est possible que ces conditions contraignantes aient non seulement bouleversé l'équilibre bactérien mais aussi contribué à éliminer une partie de cette microflore. La densité en actinomycètes n'a par contre été que peu touchée par l'ingestion d'aliment stérile, suggérant ainsi qu'une partie des actinomycètes sélectionnés par ces milieux, ne font pas partie de la microflore de passage.

Cependant, une forte numération n'est pas forcément l'indice d'une forte diversité. Or l'intérêt de notre travail est plus d'isoler un maximum de souches différentes spécifiques du tube digestif de *Nasutitermes voelzkowi*. C'est pourquoi, nous avons également estimé la diversité morphotypique actinomycétale de nos cultures. Tout d'abord il apparaît qu'il n'existe pas de corrélation entre la densité et la diversité actinomycétales de nos différentes cultures ($R = 0,102$; $n = 18$). Ainsi, si le remplacement de l'acide humique par du xylane diminue la densité d'actinomycètes, c'est l'inverse qui se produit quant à la diversité. Les termites non-alimentés ou nourris avec du bois stérile présentent une forte diminution de leur diversité actinomycétale par rapport aux termites nourris normalement. Les autres facteurs (pH, rubomycine, inoculum...) testés n'ont montré que peu d'influence sur la diversité.

B-III/ Identification des Actinobactéries Non-Streptomycètes (NSA)

B-III-1/ Méthodologie

“Criblage” des isolats

Le repiquage des colonies provenant du milieu sélectif est une étape cruciale pour l'isolement d'une souche pure et indispensable pour sa détermination morphologique et taxonomique. C'est aussi une étape coûteuse en temps et en argent, surtout lorsqu'il s'agit de traiter plusieurs milieux d'isolement comme dans notre cas. Nous avons donc procédé à

plusieurs étapes de “criblage” afin de limiter le nombre de colonies à analyser sans pour autant perdre en diversité.

D’après les résultats obtenus précédemment par les dénombrements, quatre milieux en plus du milieu HV (milieu **1**) ont été choisis pour effectuer les étapes de repiquage sur un milieu riche (Bennett):

- le milieu **2** avec du xylane comme unique source de carbone,
- le milieu **5** inoculé par un broyat de panses de termite vidées de leur contenant;
- le milieu **6** caractérisé par l’ajout de rubomycine ;
- le milieu **7** inoculé par un broyat de panses de termites ayant subi un jeûne.

Dans un deuxième temps, il s’agissait de discriminer les actinomycètes des autres bactéries. Certaines des souches isolées peuvent être des contaminations fongiques ou bactériennes Gram-négatif. Leur caractérisation se fait normalement visuellement sur des critères morphologiques et de croissance. Cependant, certaines colonies ont un développement proche de celui des actinomycètes, qui, eux mêmes, peuvent présenter des morphotypes très variés. Afin de distinguer les souches actinobactériennes, nous avons donc utilisé les techniques de biologie moléculaire. Cette étape permet de faire un tri rapide des actinomycètes par rapport aux autres micro-organismes par une amplification d’ADN spécifique (couple d’amorces F235-R1378 cf. ‘mat. et meth.’). Les bactéries ne pouvant être amplifiées ne sont pas considérées comme des actinomycètes. Une vérification est également réalisée en utilisant le couple d’amorces généralistes pour les bactéries F984gc-R1378 afin de s’assurer que la non-amplification avec les amorces spécifiques ne vienne pas de l’extrait d’ADN ou des conditions de PCR.

Enfin, la troisième étape consiste à repérer rapidement les souches de streptomycètes. On sait que, dans les cultures visant à cultiver les actinomycètes, les isolats sont à plus de 90% des *Streptomyces* (Williams & Wellington 1982). Ce genre est particulièrement réputé pour son développement très rapide sur les géloses empêchant la croissance des autres micro-organismes. C’est pourquoi de plus en plus de chercheurs se sont intéressés plus favorablement aux autres genres d’actinomycètes rares, encore appelés les NSA (Non-Streptomyctete Actinomycetes) (El-Tarabily & Sivasithamparam 2006). De plus, pour notre étude, nous savons que les *Streptomyces* n’appartiennent pas à la microflore spécifique du terme. L’idée est donc de distinguer rapidement les souches de streptomycètes par rapport aux autres souches potentiellement intéressantes. Pour cela, nous avons exploité une partie de la méthode développée pour l’identification rapide des souches d’actinomycètes par Andrew

E. Cook et Paul R. Meyer (2003). Il s'agit de l'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA restriction Analysis) appliqué aux seuls streptomycètes.

L'ARDRA : principe et protocole expérimental.

Comme l'indique l'acronyme, la technique ARDRA se base sur la caractérisation des profils électrophorétiques produits après la digestion des amplificats d'ADNr 16s par un jeu d'enzymes de restriction. Elle permet une identification rapide au niveau du genre. Elle a ainsi servi pour notre étude à détecter les souches de streptomycètes et par conséquent les 'Non-*Streptomyces*-Actinobacteria' (NSA). Seule l'utilisation de trois enzymes de restriction - Sau3AI (ou Bsp143I), AsnI (ou VspI) et KpnI- est nécessaire et suffisant pour détecter les *Streptomyces*. Leur profil se caractérise par la présence simultanée de deux fragments d'environ 400 pb et 600 pb pour la digestion par Sau3AI, un fragment entier, non digéré par AsnI, et deux fragments d'environ 900 pb et 200 pb pour la digestion par KpnI. Tout autre profil caractérise une souche NSA.

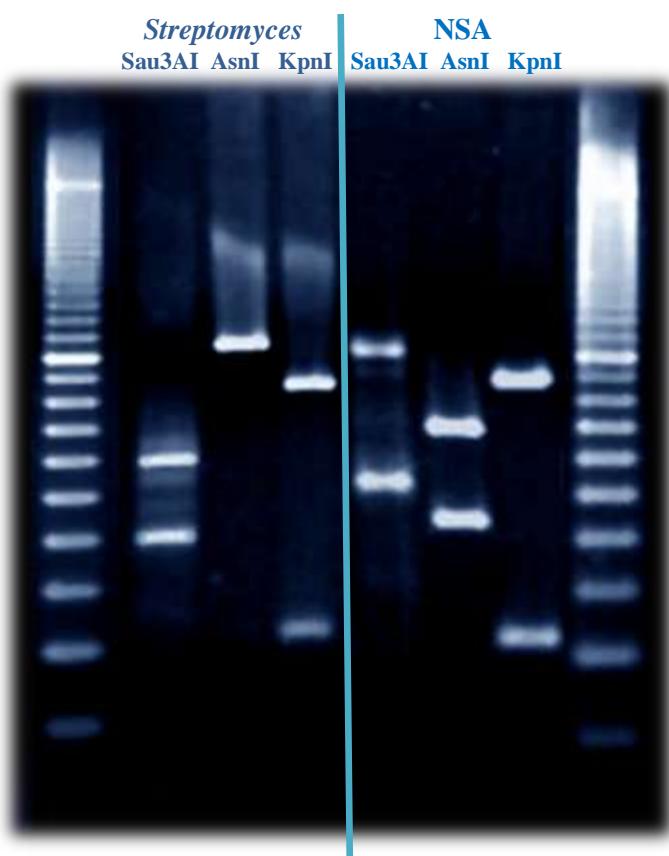


Figure B-3 | Profils ARDRA d'une souche de streptomycète et d'un NSA
Sau3AI, AsnI et KpnI correspondent aux enzymes de restriction utilisées sur les échantillons PCR .

Identification et analyse génétique des isolats NSA

L'identification taxonomique des souches isolées, et notamment la détermination des NSA, peut ensuite s'accomplir par une amplification puis un séquençage du gène codant l'ARN 16S. Les oligonucléotides utilisés dans ce cas sont le couple d'amorces F235-R1378 qui encadre un fragment nucléotidique long de plus de mille paires de bases. En amont, la technique d'extraction d'ADN sur les cultures bactériennes pures se base sur une lyse cellulaire par agitation au 'beat-beating' dans un tampon CTAB puis sur une extraction au phénol chloroforme (cf. 'mat. et meth.'). Elle est réalisée à partir de 200 à 250 mg de mycélium gratté et prélevé sur la gélose.

Finalement, une fois les séquences d'ADNr 16S obtenues pour les souches pures, il est possible de les comparer aux séquences obtenues directement à partir du tube digestif des termites via la DGGE. L'alignement et le calcul du pourcentage de similarité entre les séquences s'effectuent à l'aide du logiciel BioEdit et du programme Clustal W (cf. 'mat. et meth.'). Au delà de 97% de similarité entre deux séquences, on admet que l'espèce isolée est identique à celle trouvée à partir du tube digestif (Lilburn et al. 1999).

B-III-2/ Différenciation morphologique des isolats

Suite à plusieurs repiquages, le nombre de morphotypes isolés est légèrement supérieur à celui observé sur les milieux de sélection. Certaines colonies estimées semblables sur le milieu sélectif appartenaient en fait à des types bactériens différents. On compte 19 isolats provenant des milieux 1 ou 2, 14 lorsque les pances de termites sont vidées avant l'ensemencement (m5), 11 lorsque les termites n'ont pas été nourris (m6) et seulement 9 souches pour le milieu contenant de la rubomycine (m7). Tous milieux confondus, on constate que la diversité en morphotypes est relativement élevée. Si certaines souches se ressemblent morphologiquement (cf. Figures B-4, planches sur les deux prochaines pages), la plupart des isolats présentent des formes de développement et/ou des colorations différentes qui ne permettent pas de les regrouper selon leur simple apparence.





Figures B-4 | Photographies des différents souches isolées à partir des 5 milieux de sélection m1, m2, m5, m6 et m7 (double pages précédentes)



Milieu 1 (HV)				
-	M1hv001	M1hv002	M1hv003	M1hv004
M1hv005	M1hv006	M1hv007	M1hv008	M1hv009
M1hv010	M1hv011	M1hv012	M1hv013	M1hv014
M1hv015	M1hv016	M1hv017	M1hv018	M1hv019

Milieu 2 (Xyl)				
-	M2xyl01	M2xyl02	M2xyl03	M2xyl04
M2xyl05	M2xyl06	M2xyl07	M2xyl08	M2xyl09
M2xyl10	M2xyl11	M2xyl12	M2xyl13	M2xyl14
M2xyl15	M2xyl16	M2xyl17	M2xyl18	M2xyl19

Tableau B-3 | Codes des souches isolées à partir des milieux de sélection m1 et m2

Ce tableau fait référence à la première planche des pages précédentes



Milieu 5 (IPv)				
-	M5ipv01	M5ipv02	M5ipv03	M5ipv04
M5ipv05	M5ipv06	M5ipv07	M5ipv08	M5ipv09
M5ipv10	M5ipv11	M5ipv12	M5ipv13	M5ipv14

Milieu 6 (Rub)				
-	M6rub01	M6rub02	M6rub03	M6rub04
M6rub05	M6rub06	M6rub07	M6rub07	

Milieu 7 (Jeû)				
-	M7jeu01	M7jeu02	M7jeu03	M7jeu04
M7jeu05	M7jeu06	M7jeu07	M7jeu08	M7jeu09
M7jeu10	M7jeu11			

Tableau B-3 (suite) | Codes des souches isolées à partir des milieux de sélection m5, m6 et m7

Ce tableau fait référence à la deuxième planche des pages précédentes

Les isolats surlignés en jaune correspondent à des souches NSA, les isolats dont le code est grisé ne seraient pas des actinomycètes.



Figure B-5 | Identification rapide des souches de streptomycètes et des souches NSA par ARDRA

Cette planche montre les profils ARDRA d'un échantillon de souches analysées. En rouge sont représentés les souches NSA.

B-III-3/ Détection des souches de NSA par l'ARDRA

La méthode ARDRA nous permet d'identifier rapidement les souches de *Streptomyces* par la lecture du profil de digestion du gène 16S (Figure B-5). Quel que soit le milieu utilisé, ces actinomycètes sont largement majoritaires parmi les isolats. Il n'y a d'ailleurs pas de différences observables entre le nombre de NSA cultivés sur les différents milieux. Parmi les 71 souches analysées, 50 sont des streptomycètes et seulement 9 figurent comme des NSA, les 12 restantes n'appartiennent pas au phylum des actinobactéries ou n'ont pu être amplifiées par PCR. Dans ce cas, il est probable que ces souches n'appartiennent pas aux 98% d'actinomycètes qui sont détectables par le couple d'amorces utilisé pour la PCR.

Neuf isolats ont finalement été identifiés comme n'appartenant pas au genre *Streptomyces*. Il s'agit des souches :

- M2xyl02, M2xyl08 et M2xyl15 isolés sur le milieu 2 contenant du xylane comme seule source de carbone,
- M6rub01 et M6rub02 isolés sur le milieu contenant de la rubomycine
- M1hv09, M1hv019 et M1hv014 isolés sur milieu HV
- M5ipv10 isolé sur un milieu HV ensemencé avec une panse vidée de son contenu

Les colonies M2xyl15 et M6rub02 ont des morphologies relativement semblables, M2xyl02 semble être une forme voisine plus avancée dans son développement.

B-III-4/ Identification taxonomique des souches NSA

Plusieurs souches présentant un profil de type “*Streptomyces*”, des souches présentant des profils originaux (M2xyl06 ; M2xyl19 ; M6rub03) et toutes les souches NSA ont été analysées par séquençage d'une partie de leur gène d'ADN16S. Sur les streptomycètes, certains ou présumés, les comparaisons de séquences indiquent qu'ils appartiennent bien au genre *Streptomyces* et qu'ils présentent de forte similarité avec des souches déjà répertoriées dans Genbank (>98%).

Parmi les souches NSA, 4 sont associés au *Mycobacterium fortuitum*. et proviennent des milieux 2 ou 6 [M2xyl02 ; M2xyl15 ; M6rub01 ; M6rub02]. On trouve également des isolats génétiquement proches d'un *Corynebacterium* [M1hv019] et d'un *Curtobacterium* [M1hv014] dans le milieu 1 (HV). Enfin, trois isolats appartiennent à des genres “rares” : M2xyl08 correspond à *Rhodococcus erythropolis*, l'autre souche [M5ipv10] est génétiquement identique à *Saccharothrix texensis* (souche AS4.1186) et M1hv09 a une similarité de 98,7% avec *Actinoplanes* (cf. tableau B-4)

	Strain	pb	Taxonomical Identity	Accession	Identity
N.S.A.	M2xyl02	844	<i>Mycobacterium conceptionense</i> S14 (<i>M. fortuitum</i> group)	AM884289	100%
	M2xyl15	850	<i>Mycobacterium conceptionense</i> S14 (<i>M. fortuitum</i> group)	AM884289	99,9%
	M6rub02	881	<i>Mycobacterium conceptionense</i> S14 (<i>M. fortuitum</i> group)	AM884289	99,9%
	M6rub01	663	<i>Mycobacterium</i> sp. NMR17-5 (<i>M. fortuitum</i> group)	AB286061	99,7%
	M1hv019	329	<i>Corynebacterium</i> sp. 1720 '1 ex sheep'	Y13427	85,7%
	M1hv014	800	<i>Curtobacterium</i> sp. DCY26	EF587758	97,9%
	M1hv09	780	<i>Actinoplanes</i> sp. IFO 14428	AB047511	98,7%
	M5ipv10	781	<i>Saccharothrix texensis</i> AS4.1186	AF350247	100%
	M2xyl08	859	<i>Rhodococcus erythropolis</i> LBS	EU479709	99,9%
	M1hv003	808	<i>Streptomyces</i> sp. AcH 505	DQ231567	100%
<i>Streptomyces</i> spp.	M1hv008	714	<i>Streptomyces</i> sp. 39-1	EU413908	99,9%
	M1hv018	800	<i>Streptomyces</i> sp. 24-A	EU413894	98,5%
	M2xyl06	806	<i>Streptomyces sahachiroi</i> NBRC 13928	AB184548	99,8%
	M2xyl19	798	<i>Streptomyces</i> sp. SD 511	EU544231	98,6%
	M5ipv12	741	<i>Streptomyces lavenduligriseus</i> NRRL B-3173T	DQ442515	98,7%
	M5ipv13	772	<i>Streptomyces costarinacus</i> NBRC 100773	AB249939	100%
	M7jeu02	781	<i>Streptomyces pulveraceus</i> B143	EU240417	99,9%
	M7jeu04	770	<i>Streptomyces somaliensis</i> DSM 40738	AY999731	98,4%
	M7jeu05	795	<i>Streptomyces</i> sp. KS12	AB373968	99,1%

Tableau B-4 | Identification taxonomique des souches isolées.

B-III-5/ Comparaison des souches isolées avec celles obtenues à partir des profils DGGE

Un arbre phylogénétique (figure B-6) a été tracé selon la méthode de Neighbor-Joining (Saitou 1987) afin de comparer les souches d'actinomycètes du tube digestif de *Nasutitermes voeltzkowi*, qu'elles soient isolées par la méthode de nested PCR-DGGE (cf. partie A) et ou sur milieu de culture.

La première constatation est qu'il n'existe aucune redondance entre les deux approches, moléculaire et microbiologique. Les souches cultivables isolées (en jaune) sont toujours différentes des souches détectées par les techniques de biologie moléculaire (en bleu). Par ailleurs, seules les différentes souches cultivées de *Streptomyces* et celle de *Rhodococcus* appartiennent à des groupes déjà décrits dans le tube digestif des termites. Toutes les autres souches isolées dans cette étude sont nouvelles, ne s'apparentant à aucun isolat identifié chez les termites.

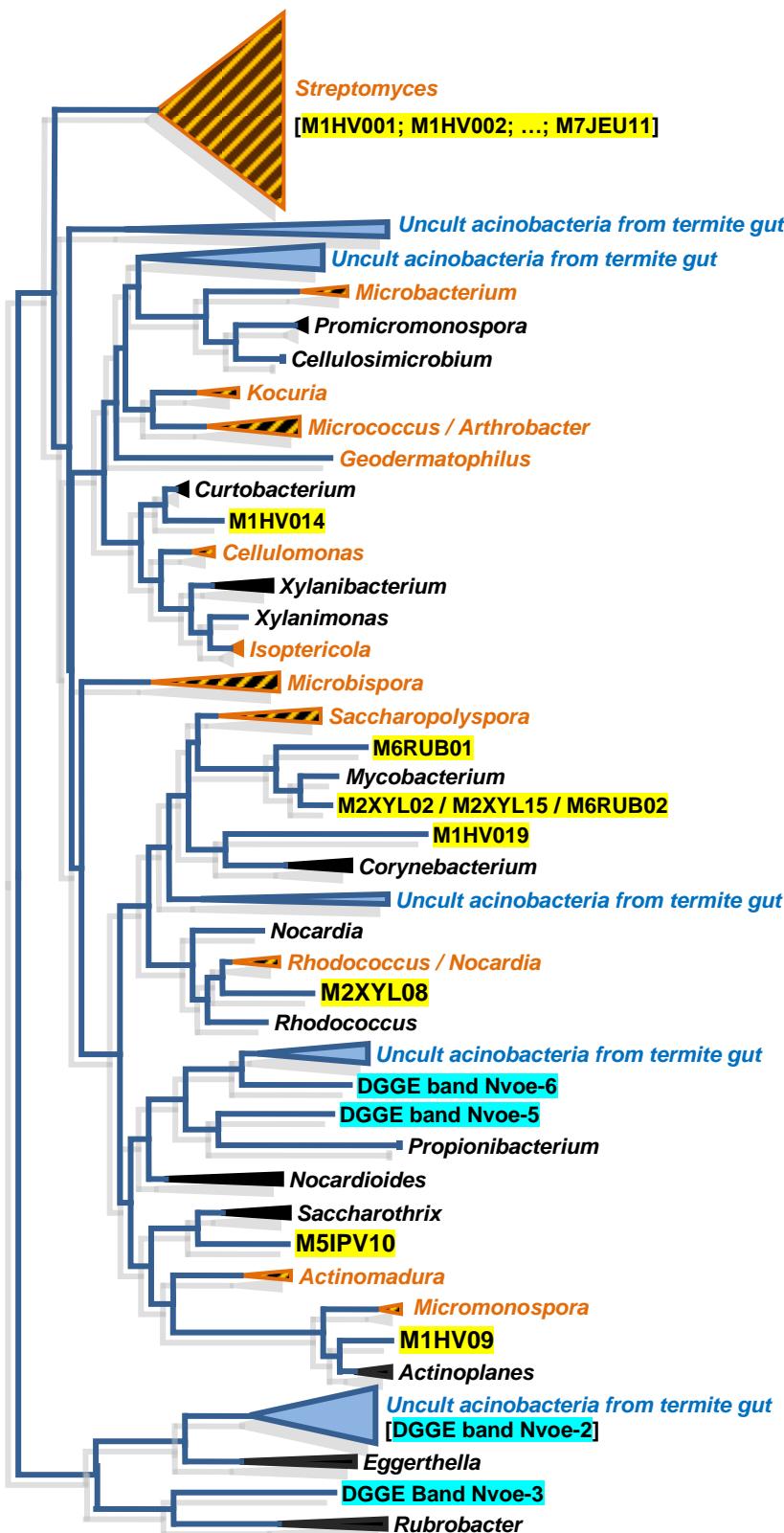


Figure B-6 | Arbre phylogénétique (NJ) comparant les séquences des souches isolées avec celles obtenues par DGGE pour la même espèce (*N. voeltzowi*). Sont également incluses dans cet arbre des représentants des genres antibactériens (en noir) génétiquement proches de nos souches, ainsi que des séquences d'actinomycètes cultivés (en orange) ou non-cultivées (en bleu) provenant de l'intestin de termites.

B-IV/ Discussion et conclusion

B-IV-1/ Diversité des actinomycètes cultivés

En étudiant la sélectivité de plusieurs milieux de culture, notre étude a finalement permis l'isolement de nombreuses souches d'actinomycètes (59 au total). Si la large majorité des isolats est constituée de diverses formes de streptomycètes (84,8%), 6 autres genres d'actinobactéries (NSA) - *Actinoplanes*, *Corynebacterium*, *Curtobacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* et *Saccharothrix* - ont également été isolés à partir de la panse des ouvriers de *Nasutitermes voeltzkowi*. Différentes études ont, de la même manière, montré une prédominance des souches de *Streptomyces spp.* dans les cultures visant à isoler les actinomycètes intestinaux des termites (Watanabe et al. 2003, Kurtbböke and French 2007 ; Labé-Lenoir and Rouland 1998 ; Pasti et al. 1990). Ces actinomycètes à croissance rapide ont été trouvés chez plusieurs espèces d'isoptères et ont souvent montré des propriétés intéressantes en termes enzymatiques. En revanche, c'est la première fois que sont cultivés les autres genres d'actinomycètes détectés ici, à l'exception notable de la souche M2xyl08 correspondant à un *Rhodococcus erythropolis*. Cette espèce d'actinomycète a en effet déjà été trouvée sous les formes TA421 et TA431 chez le terme *Reticulitermes speratus* (Chung et al. 1994). Ces souches ont été particulièrement étudiées pour leurs capacités à dégrader des composés polluants de la famille des polychlorobiphényles (PCB) (Chung et al. 1994 ; Maeda et al. 1995 ; Kosono et al. 1998 ; Taguchi et al. 2007).

De façon plus générale, le tube digestif des termites a souvent permis l'isolement de souches rares (NSA) (Kuhnigh et al. 1994 ; Wenzel et al. 2002 ; Kurtböke & French 2007) et/ou d'intérêt biotechnologique (Maeda et al. 1995 ; König et al. 2006). Les investigations sur la microflore intestinale des termites ont longtemps été orientées plus vers la recherche de bactéries ligno-cellulolytiques (Pasti et al. 1990 ; Kuhnigh et al. 1994 ; Schäfer et al. 1996 ; Wenzel et al. 2002), que sur la caractérisation globale de la diversité microbienne symbiotique (Kurtböke & French 2007). La nouveauté des actinomycètes non streptomycètes isolés au cours de notre étude présentent donc un intérêt certain. En effet, outre *Rhodococcus erythropolis* dont les propriétés dépolluantes ont déjà été démontrées (Chung et al. 1994), des espèces telluriques du genre *Actinoplanes* et *Saccharothrix* sont également connues pour leurs capacités de décomposition de la matière organique (Vobis 1992 ; Bjørnvad et al. 2001) et surtout leur capacité à produire des antibiotiques.

B-IV-2/ Influence des facteurs

Pour isoler ces actinomycètes rares à partir du tube digestif des termites, nous avons comparé la sélectivité de 6 facteurs liés au milieu ou aux conditions de culture. Pourtant, aucune corrélation n'a pu être montrée entre les facteurs testés et l'isolement des souches NSA. La prédominance des *Streptomyces* dans tous les milieux testés pourrait être liée au milieu de base -le milieu HV- qui est conçu pour l'isolement exclusif des actinomycètes mais préférentiellement des streptomycètes (Hayakawa & Nonomura 1987). La proportion de NSA augmente uniquement dans le milieu M6 où un antibiotique anti-streptomycète -la rubomycine- a été ajouté (M1 : 15,8% ; M2 : 15,8% ; M5 : 7,1% ; M6 : 25% ; M7 : 0%), mais cette augmentation s'explique davantage par à une diminution du nombre de streptomycètes que par une augmentation du nombre de NSA. L'utilisation d'inhibiteurs de croissance resterait néanmoins une méthode efficace pour l'isolement de bactéries rares. Ainsi, en choisissant une approche basée sur l'action de phages spécifiques pour empêcher la croissance des bactéries dominantes en culture, Kurtböke et ses collègues (2007) ont également isolé des souches appartenant à 7 genres d'actinomycètes autres que les streptomycètes.

Plus généralement, 4 des facteurs testés -l'ajout d'antibiotique, le remplacement de la source de carbone, la panse vidée comme inoculum et le prétraitement alimentaire imposé aux termites avant leur dissection- montrent des changements quant au nombre ou à la diversité des morphotypes visibles sur le milieu d'isolement.

- Le milieu modifié composé de xylane a un effet sélectif prononcé sur les colonies actinomycétales puisqu'elles s'y développent en faible nombre mais avec une variété plus grande. La modification du substrat carboné permettrait ainsi l'isolement de bactéries spécialistes - xylanolytiques en l'occurrence -, comme il a souvent été développé dans des études sur la microflore intestinale des termites (Hayashi et al. 2007).

- Les changements de régime alimentaire imposé aux termites entraînent une baisse de la diversité des morphotypes qui pourrait être due à une diminution de la microflore de passage. Les résultats sur les animaux à jeûn sont cependant en contradiction avec les analyses moléculaires réalisées précédemment (Partie A) concluant sur la stabilité des communautés actinomycétales. Mais ils confirment les résultats obtenus par F. Lenoir-labé qui avaient réalisé des expériences similaires sur le segment mixte de *Nasutitermes lujae*

(Lenoir-Labé 1994). Il est donc probable que les colonies poussant dans les boîtes de Pétri soient pour la plupart issues de la microflore de passage.

- Enfin, l'ensemencement de pânes préalablement vidées diminue la diversité des morphotypes cultivés, sauf si cette modification de l'inoculum est associée à un changement de substrat ou à un traitement à la rubomycine. Ainsi, en augmentant la sélectivité du milieu, ces deux facteurs annulent la réduction de diversité due à l'inoculum. Que les pânes ensemencées soient pleines ou vidées, la diversité morphotypique reste semblable pour les milieux contenant du xylane ou de la rubomycine.

Concernant le pH du milieu et le temps d'incubation, nos expériences n'ont pas mis en évidence d'impact sur la diversité des actinomycètes cultivés à partir du tube digestif des termites. Il est cependant possible que ces facteurs n'aient pas été totalement exploités :

- Le temps d'incubation doublé à 30 jours pourrait être encore plus long sachant que certaines colonies à développement lent ne peuvent apparaître qu'au bout de plusieurs mois (Davis et al. 2005).

- Le pH de 8,6 pourrait se rapprocher encore plus des valeurs d'acidité très élevées (± 10) que l'on trouve dans certaines parties de l'intestin des *Nasutitermes* (Brune et al. 1995).

B-IV-3/ La vérité sur les actinomycètes cultivés à partir des tubes digestifs de termites

L'incapacité à isoler des communautés actinobactériennes connues par la biologie moléculaire interroge alors sur l'origine réelle des bactéries isolées. Plusieurs chercheurs ont en effet spéculé sur le rôle digestif des (actino-)bactéries isolées chez les termites (Rouland & Lenoir-Labé 1998 ; Breznak 2000 ; Slaytor 2000 ; König et al. 2006). Or, il est probable que ces isolats ne forment pas une part significante de la microflore actinomycétale, ni ne partagent une relation mutualiste avec l'hôte. Dans notre étude, les facteurs testés ont été inspirés des méthodes déjà publiées et ayant permis de cultiver des actinomycètes à partir du tube digestif de termites. Bien que ces méthodes ne soient pas totalement comparables, nos résultats jettent néanmoins le doute sur les actinobactéries isolées chez les termites et présentées comme habitant le tube digestif de ces insectes.

Il est cependant intéressant de noter que la plupart des souches cultivables isolées sont des bactéries communément trouvées dans le sol (*Actinoplanes*, *Streptomyces*, *Saccharothrix*) voire sur des échantillons cliniques (*Curtobacterium*, *Mycobacterium*) (Ventura et al. 2007). Des souches de *Corynebacterium*, de *Streptomyces* ou de *Rhodococcus* ont cependant déjà été

isolées à partir de tractus digestif de mammifères (Xu & Gordon 2003 ; Deng et al. 2007), d'insectes (König & Varma 2006) voire même de termites (tableau B-1). Mais, ces genres actinobactériens n'ont jamais pu être décelés par les différentes investigations basées sur le séquençage de l'ADNr 16s. Ces souches ne seraient pas réellement inféodées à la panse des termites mais seraient plutôt ubiquistes. Des analyses moléculaires effectuées sur le bois consommé par ces termites montre bien que cette nourriture contient majoritairement une espèce de *Mycobacterium* (partie A) proche de celles isolées par la culture. Dans la même optique, Kurtböke et ses collègues, en tentant d'empêcher la croissance des bactéries contaminantes à partir du tube digestif de *Coptotermes lacteus*, ont isolé des souches caractéristiques des communautés actinomycétales du sol (2007) mais toujours éloignées génétiquement de espèces découvertes par la voie moléculaire.

Dans la littérature, on trouve un nombre important d'actinomycètes "spécialistes" capables de dégrader des composés dérivés du bois (Ventura et al. 2007) et appartenant principalement aux familles *Cellulomonadaceae/Promicomonosporaceae*, *Micrococcaceae* ou *Nocardiaceae*. C'est également le cas de notre souche de *Saccharothrix texensis* qui aurait la capacité de produire des cellulases proche de celles utilisées par le terme lui-même (Bjørnvad et al. 2001). Rejoignant l'hypothèse déjà formulé dans la partie A, ces isolats pourraient jouer un rôle digestif pour leur hôte. Leur présence dans l'intestin des termites, confirmée par les analyses de séquençage (Partie A), amène à spéculer sur leur relation avec les termites : soit ils forment une part inactive (spores) de la microflore de passage dans le bol alimentaire, soit ils profitent de l'environnement intestinal pour s'y développer et agir en commensale voire en association mutualiste retenu par les structures cuticulaires présents dans le tractus digestif de l'insecte (Bignell 2000). Pour étayer cette hypothèse des analyses de dénombrement et de détection in situ (FISH) sont indispensables (Moriya et al. 2007)

B-IV-4/ Conclusion, limites et perspectives

En résumé de notre étude, 6 paramètres intervenant à différentes étapes de la culture microbiologique ont été évalués afin d'isoler des actinomycètes spécifiques au tube digestif des termites *Nasutitermes voeltzkowi*. Sept genres d'actinobactéries, dont 5 jamais décrits dans le tube digestif des termites, ont ainsi pu être cultivés. Cependant, la comparaison entre la diversité actinomycétale obtenue en culture et celle donnée par la PCR-DGGE montre que les colonies qui se sont développées sur la gélose ne sont pas représentatives de la

communauté actinomycétale du tube digestif. Ce travail microbiologique n'a donc pas permis encore de préciser le rôle des actinomycètes dans le tube digestif de *Nasutitermes spp.*

Les biais liés à la culture peuvent être multiples, en partant de la favorisation des bactéries "contaminantes" à croissance rapide jusqu'au manque de ressemblance avec le biotope d'origine. Dans le cas des symbiontes intestinaux des termites, l'environnement est très contraignant et certainement difficile à imiter. On peut aussi supposer que la relation de mutualisme avec l'hôte (voire avec les autres bactéries) est un facteur important pour le développement de ces symbiontes (échange de nutriments, voire de facteurs de croissance), ce qui manquerait inévitablement sur les milieux de culture. Dans le choix initial de notre stratégie de culture, l'objectif était également d'analyser des milieux faisant intervenir plusieurs facteurs ensemble (milieux 9 à 18). Malheureusement, cette partie de l'étude n'a pu être complétée suite à des disconvenues techniques (et logistiques). Faire varier plusieurs facteurs simultanément permettrait de s'approcher d'avantage de l'environnement naturel. Il serait aussi intéressant de multiplier les efforts avec des milieux de sélection autre que le milieu HV qui, semble-t-il, favorise surtout le développement des streptomycètes. Les récentes avancées en microbiologie préconisent d'utiliser des géloses à faible concentration en nutriments et pourraient être une autre voie à explorer (Janssen et al. 2002).



Partie C

Etude microbiologique et phylogénétique d'un nouveau genre de *Propionibacteriaceae* (Actinomycetales) associé spécifiquement au tube digestif des termites.

C-I/ Introduction

Dans la première partie (partie A), nous avons identifié une partie de la microflore intestinale des termites jusqu'alors mal connue en se focalisant sur l'empreinte génétique des actinomycètes associés spécifiquement. Réalisé en parallèle dans la partie B, l'isolement microbiologique de ces actinomycètes a, en revanche, montré ses limites malgré une approche multifactorielle visant à adapter le milieu et les conditions de culture. Fort des résultats obtenus en biologie moléculaire, il nous a paru intéressant de resserrer à nouveau les investigations sur un groupe d'actinomycètes dont la spécificité envers les termites a été établie et à chercher à les isoler en culture. Cibler un genre précis de micro-organismes permettrait en effet d'orienter le choix d'un milieu de culture adapté à l'isolement spécifique des bactéries d'intérêt.

Parmi les actinomycètes découverts dans la panse des ouvriers de *Nasutitermes*, les formes relatives à la famille des *Propionibacteriaceae* paraissent les plus intéressantes, et ce pour plusieurs raisons :

- Premièrement, ce sont les seuls actinomycètes à être identifiés chez toutes les espèces de *Nasutitermes* étudiées (Partie A). Plus encore, ces formes ont été découvertes chez d'autres espèces (Nakajima et al. 2005 ; Miyata et al. 2007 ; Fall et al. 2007 ; Shinzato et al. 2007) et localisées par fluorescence (FISH) comme tapissant les parois de la panse de *Reticulitermes speratus* (Nakajima et al. 2005). Mais si ces actinomycètes semblent appartenir à la microflore fixée, on ne connaît encore rien de leur activité dans le tube digestif.

- Deuxièmement, des méthodes et des milieux de culture de propionibactéries ont déjà été mis au point dans le milieu médical ou industriel (Kishishita et al. 1980 ; Stackebrandt & Schaal 2006). Il est donc envisageable d'appliquer ces méthodes pour isoler les espèces spécifiquement associées au tube digestif des termites.

C-I-1/ Présentation générale des propionibactéries.

Généralités (position taxonomique, distribution, écologie...).

Sous le terme de propionibactéries ou bactéries propioniques, on inclut principalement les actinomycètes du genre *Propionibacterium* (Orla-Jensen 1909) et par extension la famille



Propionibacteriaceae (Delwiche 1957, revu par Rainey, Ward-Rainey & Stackebrandt 1997). Si le genre *Propionibacterium* est plutôt bien représenté avec une dizaine d'espèces largement décrites et étudiées, les autres membres de la famille sont au contraire moins connus et parfois réduits à une seule espèce ou une seule souche (Stackebrandt & Schaal 2006).

Plus généralement, les *Propionibacteriaceae* sont des bactéries Gram-positives, non sporulantes, non mobiles et catalase positive. La composition en base G et

C de leur génome est comprise entre 53 et 73% (Stackebrandt & Schaal 2006). Elles peuvent être aérobies comme anaérobies facultatives. Elles peuvent afficher différentes morphologies, habituellement pléomorphes présentant des formes allongées, cocoïdales et parfois même branchues (Vorobjeva 1999). Comme leur nom l'indique, les propionibactéries sont surtout connus pour former de l'acide propionique comme principal produit de leur fermentation (ainsi que d'autres acides organiques variés tels que l'acide acétique, l'acide succinique, l'acide formique, etc).

Les propionibactéries sont présents dans des milieux aussi diverses que les produits laitiers, la surface de l'épiderme humain, le tractus intestinal des humains et des animaux, le sol, l'eau, les silos agricoles ou encore les roches de l'Antarctique. Ces bactéries sont rarement pathogènes. Cependant certaines espèces peuvent infecter le sang et provoquer des infections ou des maladies de peau telle que l'acné (*acnes vulgaris*) causé par *Propionibacterium acnes* (Figure C-1). Les formes les plus intéressantes se distinguent par leur activité probiotique. Outre la production de vitamine B12 et l'inhibition de la microflore indésirable dans les aliments fermentés par la libération d'acides organiques et des bactériocines, les propionibactéries des produits laitiers ont montré qu'elles pouvaient aussi moduler favorablement la flore intestinale des animaux (Perez-Chaia et al. 1999) et des humains (Bougle et al. 1999), principalement par le renforcement de la population

autochtone. Chez les bovins, elles provoquent une meilleure exploitation de la nourriture ingérée (herbes, foin) (Mantere-Alhonan 1995). Fait intéressant, ces propionibactéries sont capables de s'adapter efficacement aux stress digestifs (Jan *et al.* 2001; Leverrier *et al.* 2003), et de rester en vie dans le tractus digestif humain (Jan *et al.* 2001) en adhérant aux cellules épithéliales de l'intestin et du mucus intestinal (Figure C-2 ; Zarate *et al.* 2002; Ouwehand *et al.* 2002).



Figure C-2 | Interaction entre des cellules du colon humain en culture (Caco-2) et bactéries propioniques laitières (*Propionibacterium freudenreichii*) observée au microscope électronique à balayage. (Photo INRA, Zarate *et al.* 2002)

C-I-2/ Les propionibactéries associées à la panse des termites.

L'existence de populations de *Propionibacteriaceae* dans la panse des termites n'a été découvert que tardivement. Jamais isolés en culture, c'est l'analyse de banques de clones qui a permis de mettre en évidence la présence de ses bactéries dans le tube digestif des termites. Les séquences trouvées ne représentent qu'une faible part de la diversité totale de la communauté symbiotique. Leur association avec les termites est donc assez discutée. Nakajima et ses collaborateurs (2006) relativisent ainsi l'importance des propionibactéries dans la microflore digestive symbiotique des termites. Pourtant, deux éléments tendent à montrer que ces actinomycètes prennent une place non négligeable dans le système digestif des termites. La première démonstration est faite par notre étude sur plusieurs espèces de *Nasutitermes* qui montre la constante présence de cette microflore (partie A). La deuxième constatation est que ses propionibactéries ont été détectés chez plusieurs genres de termites plus ou moins éloignés phylogénétiquement (Nakajima *et al.* 2005 ; Miyata *et al.* 2007 ; Fall *et al.* 2007 ; Shinzato *et al.* 2007).

Ce sont pourtant les travaux du même Nakajima en 2005 qui illustre le mieux toute la particularité de cette microflore intestinale. En effet, par des techniques de FISH (fluorescent *in situ* hybridation), l'équipe japonaise confirme la présence de ces mêmes propionibactéries dans le tube digestif du terme *Reticulitermes speratus* et montre que ces dernières recouvrent

densément les parois de la panse (Figure C-3). Cette localisation *in situ* rappelle les observations effectuées plusieurs années auparavant par microscopie électronique (Figure C-4 ; Breznak *et al.* 1977, Bignell 1979, Brauman 1983). Ces observations avaient conduit à la description de bactéries coccoidales tapissant l'épithélium de la panse de différents termites. Au regard des nouvelles données, il se pourrait que ces populations microbiennes correspondent aux propionibactéries caractérisées par les techniques moléculaires.

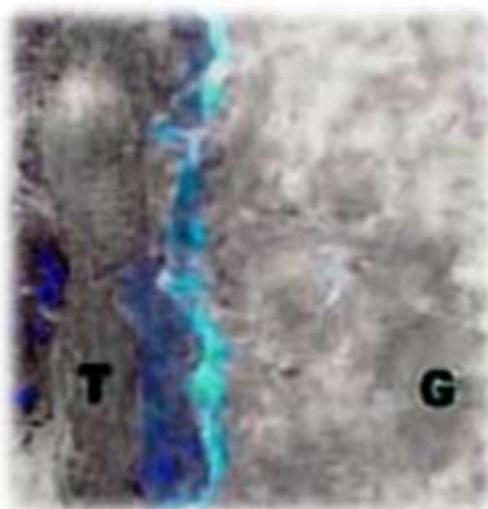


Figure C-3 | Localisation par fluorescence (FISH) des propionibactéries (en bleu) (clone Rs-W017) sur les parois de la panse du terme *Retculitermes speratus*. G : lumière intestinale, T : tégument de la panse. (Nakajima *et al.* 2005)

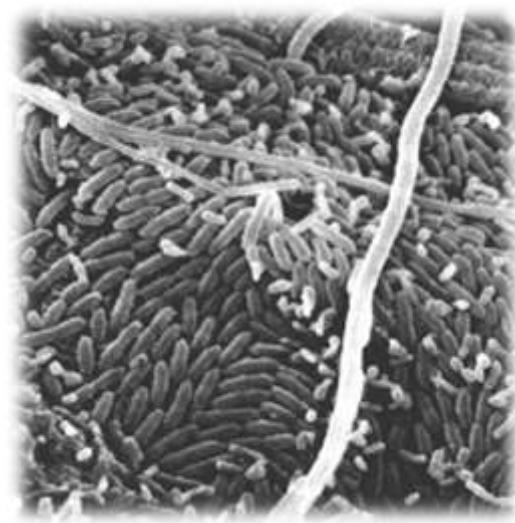


Figure C-4 | Photographie au microscope électronique à balayage des bactéries tapissant la panse du terme *Retculitermes flavipes* (photographie de J.A.Breznak, Brune 2006)

C-II/ Approche méthodologique

C-II-1/ Sujet et objectif de l'étude.

En se focalisant sur la microflore actinomycétale de plusieurs espèces de *Nasutitermes*, nous avons montré que les propionibactéries se retrouvent dans chaque terme. Leur localisation par FISH sur les parois de la panse suggère par ailleurs qu'elles occupent un rôle particulier pour leur hôte. Pourtant, leur activité dans le tube digestif des termites reste inconnue. Par ailleurs, les propionibactéries n'ont jamais pu être isolées en culture. Or, aujourd'hui encore, l'étude des souches cultivables est le meilleur moyen d'étudier leur potentialités enzymatiques et par conséquence leur rôle fonctionnel dans leur environnement naturel. Nous nous proposons donc de concentrer les tentatives de cultures microbiologiques sur cette microflore particulière que forment les propionibactéries. Une technique permet cette approche, il s'agit de la PW-PCR (Stevenson *et al.* 2004). Alors que la plupart des études microbiologiques cherchent à isoler le maximum de bactéries issues du tube digestif des

termites pour en connaître la diversité et/ou le métabolisme intestinal, ici nous cherchons le meilleur milieu pour cultiver une bactérie spécifique déjà ciblée.

C-II-2/ La P.W.-P.C.R. (Plate Wash - Polymerase Chain Reaction)

La PW-PCR a été développée par Bradley S. Stevenson et ses collègues en 2004 afin d'isoler des bactéries n'ayant jamais été cultivées, notamment des bactéries (*Verrucomicrobia* et *Acidobacteria*) provenant du tube digestif des termites (*Reticulitermes flavipes*). La PW-PCR permet de tester un grand nombre de milieux de culture selon leur capacité à faire croître des microorganismes particuliers que l'expérimentateur cherche à isoler. Son principal avantage est de faciliter la reconnaissance des microorganismes ciblés dès l'étape de sélection, en évitant les étapes laborieuses de repiquage. Pour cela, la technique associe aux méthodes classiques de microbiologie (isolement sur boîte de Pétri) les techniques de biologie moléculaire telle que l'amplification spécifique d'ADN. En effet, l'ADN génomique des colonies bactériennes présentes sur le milieu de sélection sert de matrice à une PCR spécifique qui permet de détecter la présence des souches d'intérêt. Seuls les milieux testés positivement (amplification réussie) sont utilisés pour effectuer les étapes d'isolement.

C-II-3/ Approche expérimentale

La PW-PCR permet donc de tester plusieurs milieux ou plusieurs facteurs variant pour un même milieu de base. A l'origine la technique a été mis au point pour les cultures sur boîte de Pétri (Figure C-5) mais peut aussi être décliné pour les milieux liquides. Ainsi, pour chaque milieu ayant montré un développement bactérien, un répliquat est sélectionné par dilution (10^{-1} ou 10^{-2}) comprenant une centaine de colonies. Les micro-organismes qui se sont développés sont mis en suspension dans un tampon de lavage (UltraClean fecal DNA kit-moBio Laboratories). Après centrifugation (1200 rpm pendant 5 minutes), le culot est récupéré. L'ADN est ensuite extrait par une technique utilisant du CTAB (cf. 'mat. et meth.'), puis amplifié par PCR. Cette amplification est réalisée à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques ne s'hybridant qu'avec l'ADN du microorganisme ciblé.

Si l'amplification se révèle positive, le milieu est considéré comme apte à la culture du micro-organisme ciblé. Les deux répliquats restants sont alors utilisés pour les étapes de repiquages sur un milieu riche. Les différentes souches isolées selon leurs morphologies sont ensuite identifiées. Une PCR spécifique peut également être réalisée à cette étape pour identifier directement la souche recherchée parmi les nombreux isolats.

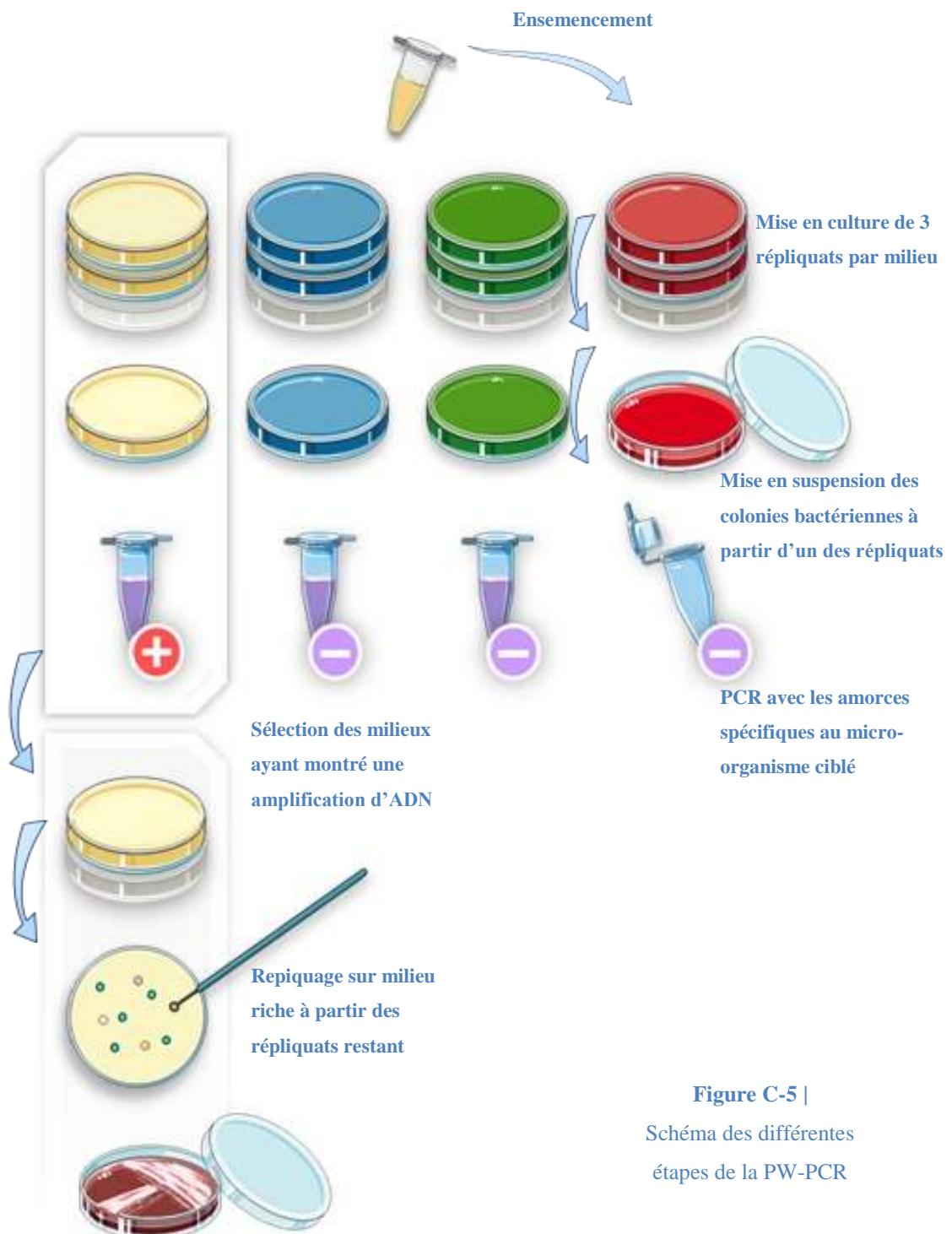


Figure C-5 |
Schéma des différentes étapes de la PW-PCR

C-III/ Conception des oligonucléotides spécifiques aux propionibactéries de termites.

La méthode de PW-PCR implique dans un premier temps, l'utilisation d'une amplification spécifique. Il est donc nécessaire de définir un ou plusieurs oligonucléotides capables de s'hybrider uniquement avec les séquences de propionibactéries ciblées.

C-III-1/ Principe général pour la conception d'amorces PCR.

Un oligonucléotide est une courte séquence nucléotidique simple brin de 18 à 24 bases. Il sert à initier la synthèse du brin complémentaire par l'ADN polymérase en s'hybridant spécifiquement sur la séquence d'ADN ciblée. On choisit ainsi un couple d'amorces de façon à ce que celles-ci délimitent la région d'ADN à amplifier. La définition d'une amorce répond à plusieurs exigences qui permettent une hybridation optimale dans les conditions de la PCR. Les caractéristiques générales d'un primer sont les suivantes:

- un contenu en G/C de 40 à 60 % ;
- une distribution équilibrée de domaines riches en G/C et en A/T ;
- pas de structure secondaire dont les étendues de G/T/C/A au milieu des séquences ;
- pas plus de 3 bases G/C en 3' du primer ;
- pas de séquences d'ADN répétées pour limiter les hybridations non spécifiques ;
- pas de séquences d'ADN qui pourraient se retrouver ailleurs dans le génome ;
- pas de séquence complémentaire à celle de l'autre amorce de façon à éviter la formation de dimère d'amorces.

Les amorces doivent également être choisies de façon à ce que leurs températures de fusion (T_m) soient assez proches (3°C de différence maximum). Le T_m correspond à la température à laquelle 50% des fragments sont sous forme simple brin. En règle générale, la température d'hybridation utilisée pour la PCR est comprise entre 55 et 65°C. Cependant, pour une spécificité maximale, la température d'hybridation peut atteindre de 62 à 72°C.

C-III-2/ Méthode de conception d'oligonucléotides spécifiques.

L'outil bioinformatique

Le principe pour définir un oligonucléotide spécifique est de sélectionner une séquence nucléotidique d'une vingtaine de nucléotides conservée pour les espèces ciblées (*i.e.* les *Propionibacteriaceae* de termites) mais différente pour les autres espèces (*i.e.* les autres

espèces d'actinobactéries). Ici, les séquences ciblées proviennent de la base de données Ribosomal Data Project II (Cole et al. 2007) et sont référencées comme provenant de différents genres de termites (*Reticulitermes*, *Odontotermes* et *Cubitermes*). La définition de ces amorces peut se faire visuellement sur les logiciels d'alignement de séquences ou à l'aide de logiciels spécialisés. Ainsi deux logiciels de bioinformatique ont été utilisés :

- Le logiciel multi-usage **BioEdit** (Hall 1999) qui permet l'alignement de séquences, leur comparaison et la recherche de régions conservées. C'est également par ce logiciel que le calcul des températures de fusion (Tm) ont été réalisés selon le modèle dit du plus proche voisin thermodynamique (*the nearest neighbor thermodynamic model* ; Santa Lucia 1998).
- Le logiciel **Primrose** (Ashelford et al. 2002) qui est spécialement conçu pour la conception d'amorces spécifiques. Ce logiciel compare les séquences ciblées avec une base de données sélectionnée sur RDP II, puis propose plusieurs oligonucléotides définis selon leur spécificité et leurs caractéristiques propres (Tm, nombre de bases dégénérées...).

En croisant les informations fournies par les deux logiciels, les oligonucléotides présentant les meilleures caractéristiques de spécificité et de compatibilité sont alors choisis.

Vérification de la spécificité des amores.

Les oligonucléotides synthétisés ont été testés pour leur capacité à s'hybrider avec leur matrice. Pour cela, plusieurs températures d'hybridation (Ta) de 64°C à 72°C ont été testées sur des extraits d'ADN des tubes digestifs de termites. En effet, ne possédant pas de souches de *Propionibacteriaceae* de termites, on utilise comme témoin positif des échantillons de broyat de panses où leur présence a été avérée.

Puisque les oligonucléotides ont également été testés pour leur capacité à amplifier uniquement les *Propionibacteriaceae* symbiontes des termites, des PCR ont été réalisées avec l'ADN extrait de différentes souches actinomycétales (isolées dans la partie B) comme autant de témoins négatifs : *Mycobacterium* sp. (M2xyl15) (T₁), *Rhodococcus* sp. (M2xyl02) (T₂), *Streptomyces* sp. (M1hv008) (T₃), *Saccharothrix* sp. (M5ipv10) (T₄) et *Curtobacterium* sp. (M1hv014) (T₅).

Les conditions de PCR sont les suivantes : 5 minutes de dénaturation initiale à 95°C, 30 cycles d'amplification comprenant 45 secondes de dénaturation à 95°C, 45 secondes d'hybridation à la température optimale Ta (qui dépendra des amorces mises en jeu) et une

minute d'elongation à 72°C, enfin 30 minutes d'elongation finale à 72°C. La température d'hybridation (Ta) sera précisée, au cours de l'étude, pour chaque couple d'amorces utilisé.

C-III-3/ Définition des oligonucléotides synthétisés et résultats des tests.

Les amorces sens PB-83 et PB-720.

Dans un premier temps, la conception des oligonucléotides spécifiques requis pour la méthode de PW-PCR s'est limitée à la création d'amorces sens spécifiques aux *Propionibacteriaceae* de termites. En théorie, l'utilisation d'une seule amorce spécifique peut suffire à amplifier exclusivement les séquences recherchées. La conception de ces amorces a été réalisée visuellement à l'aide du logiciel d'alignement de séquences *BioEdit*.

Le premier oligonucléotide à être défini est le PB-720 (Figures C-10a). Il dérive d'un oligonucléotide (PB1) déjà conçu pour amplifier spécifiquement les espèces de *Propionibacterium* se développant dans des milieux laitiers (Rossi et al. 1999). Cette amorce de 24 paires de bases a été modifiée par substitution de 4 nucléotides, dont un dégénéré, afin de correspondre exclusivement aux séquences de *Propionibacteriaceae* de termites. Le pourcentage en bases G/C est compris entre 54,17% et 58,33%, la température de fusion entre 61,12°C et 62,69°C.

Le primer PB-83 a été défini plus en amont dans la séquence d'ADNr 16S, en position 83 selon la norme internationale fixée par rapport à *E. coli* (Figures C-9a). Cette amorce de 24 paires de bases semble être d'autant plus spécifique aux propionibactéries de termites qu'elle affiche généralement plus de 3 nucléotides de substitutions par rapport aux autres séquences. Son pourcentage en bases G/C est de 58,3% et sa température de fusion de 61,9°C.

Tests sur les amorces PB-83 et PB-720.

Les amorces sens spécifiques PB-83 et PB-720 ont été couplées avec l'amorce anti-sens R1378. Cette dernière s'hybride avec une zone très conservée en aval du gène d'ADNr 16S. Elle est beaucoup plus généraliste et n'exerce donc pas de rôle de sélection. Pour les deux couples d'amorces PB-83/R1378 et PB-720/R1378, on observe une amplification d'ADN à partir de l'extrait de tube digestif de terme dans les longueurs attendues d'environ 1300 pb et 650 pb respectivement (Figure C-06 et Figure C-07) et pour des températures d'hybridation testées entre 64°C et 72°C. La quantité d'ADN amplifiée est cependant toujours plus élevée pour le couple PB-720/R1378. Il se peut que les conditions de la PCR conviennent mieux à ce couple d'amorces ou que celui-ci amplifie des fragments aspécifiques.

Afin de vérifier la spécificité des amores, des tests on été réalisés sur des souches témoins appartenant à plusieurs genres d'actinomycètes pour une température d'hybridation de 68°C. Il apparaît d'une part que le couple PB-83/R1378 amplifie l'ADN ribosomal des souches de *Mycobacterium* sp. (T₁), de *Rhodococcus* sp. (T₂) et de *Saccharothrix* sp. (T₄), et d'autre part que le couple PB-720/R1378 amplifie l'ADN ribosomal des souches de *Rhodococcus* sp. (T₂) et de *Curtobacterium* sp. (T₅).

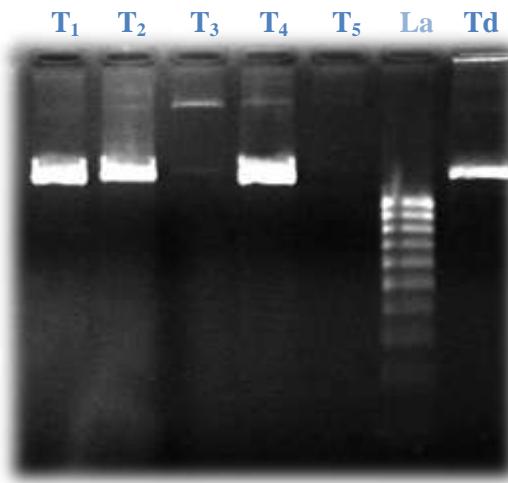


Figure C-06 | Test de spécificité du couple d'amores PB-83/R1378

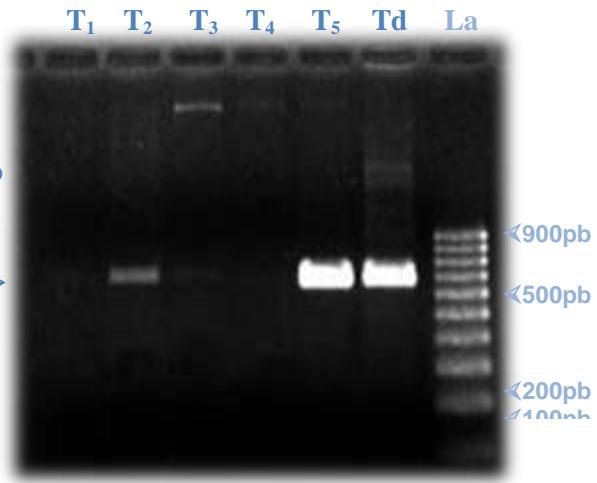


Figure C-07 | Test de spécificité du couple d'amores PB-720/R1378

En réalisant une analyse de spécificité par le logiciel *Primrose*, on remarque que les deux oligonucléotides sont en effet capables d'amplifier un spectre plus large d'actinomycètes en acceptant jusqu'à 4 mutations dans la séquence d'ADN hybridée.

Concernant le primer PB83 (Figures C-9 b) il reste très spécifique jusqu'à 2 nucléotides mutés en n'hybridant que 6 séquences d'actinomycètes non-désirés. Puis, le nombre d'organismes aspécifiques accrochés augmente légèrement à partir de 3 erreurs pour atteindre moins de 20% des séquences d'actinomycètes référencées dans RDP II. Parmi ces espèces non ciblées, se trouvent des représentants des genres *Mycobacterium*, *Rhodococcus* et *Saccharothrix*, ce qui confirme les résultats des tests précédents.

Concernant le primer PB720 (Figures C-10 b) si la spécificité est forte pour un nucléotide substitué, elle diminue rapidement dès la deuxième erreur atteinte. Pour 4 erreurs sur les 24 nucléotides que compte la séquence hybridée, près de 90% des actinomycètes sont accrochés. Ainsi, cette amorce est capable d'hybrider l'ADN ribosomal des souches de *Rhodococcus* sp. et de *Curtobacterium* sp.

Afin de palier à ce problème, des tests ont été réalisés en augmentant la température d'hybridation pour optimiser la spécificité de l'amorçage. Les résultats de ces tests (non

montrés ici) se sont révélés négatifs puisque les souches témoins amplifiées à 68°C continuaient à l'être à jusqu'à 72°C.

Les amorces anti-sens PB-737 et PB-1292.

Afin d'accroître la spécificité des amplifications, deux oligonucléotides anti-sens spécifiques aux *Propionibacteriaceae* de termites ont été définis. L'idée est de former des couples d'amorces spécifiques dont les spectres de non-spécificité (organismes involontairement accrochés) soient différents entre les deux amorces. Ainsi, par une association exclusive et doublement sélective, seules les espèces ciblées sont amplifiées.

La définition des amorces anti-sens est réalisée directement à l'aide du logiciel *Primrose*. Deux oligonucléotides, nommés PB-737 et PB-1292 (Figures C-11, Figures C-12), ont ainsi été sélectionnés pour leur position sur la séquence et leur compatibilité avec les amorces sens (T_m , non formation de dimères d'amorces). Concernant les caractéristiques propres des amorces, l'oligonucléotide PB-737 a un taux en bases G/C de 54,2% et un T_m de 61°C, alors que l'oligonucléotide PB-1292 a un taux en bases G/C compris entre 50% et 62,5% et un T_m entre 59,6 °C et 65,2°C. On peut noter que ce dernier oligonucléotide comporte 3 bases dégénérées afin de correspondre spécifiquement à tous les *Propionibacteriaceae* de termites.

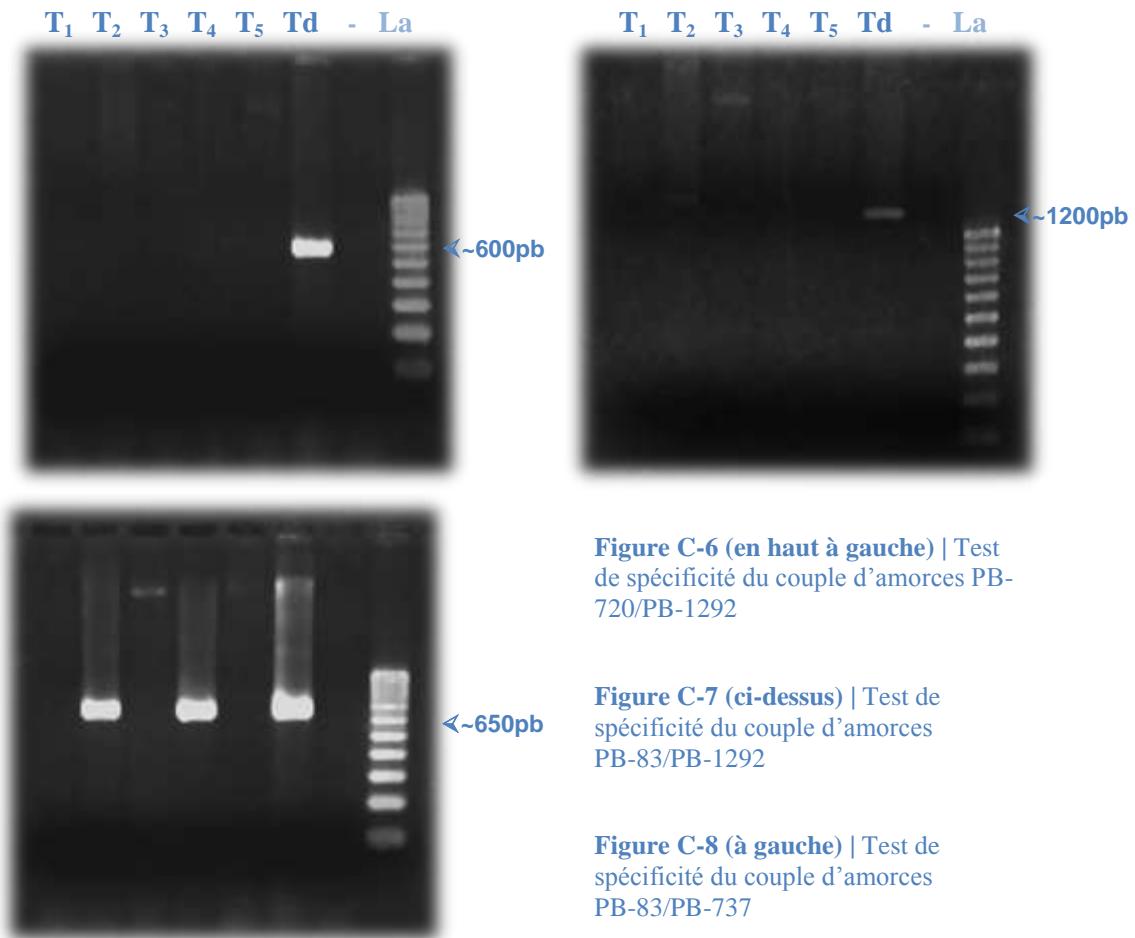
Par ailleurs, les deux amorces présentent une forte spécificité puisque moins de 10% des espèces d'actinomycètes non-ciblées sont accrochées pour 3 nucléotides substitués. De plus, la correspondance entre les organismes accrochés involontairement par les amorces sens et anti-sens est faible. Seuls 5 ou 7 genres d'actinobactéries (sur une cinquantaine de genres accrochés par au moins un des oligonucléotides) peuvent être hybrides par les couples d'amorces respectifs PB-83/PB-1292 et PB-83/PB-737. Il est d'ailleurs intéressant de noter que tous les genres hybrides appartiennent au sous-ordre des *Propionibacterineae*. Par contre, pour le couple PB-720/PB-1292, 21 genres peuvent être hybrides dû au manque de spécificité de l'amorce sens.

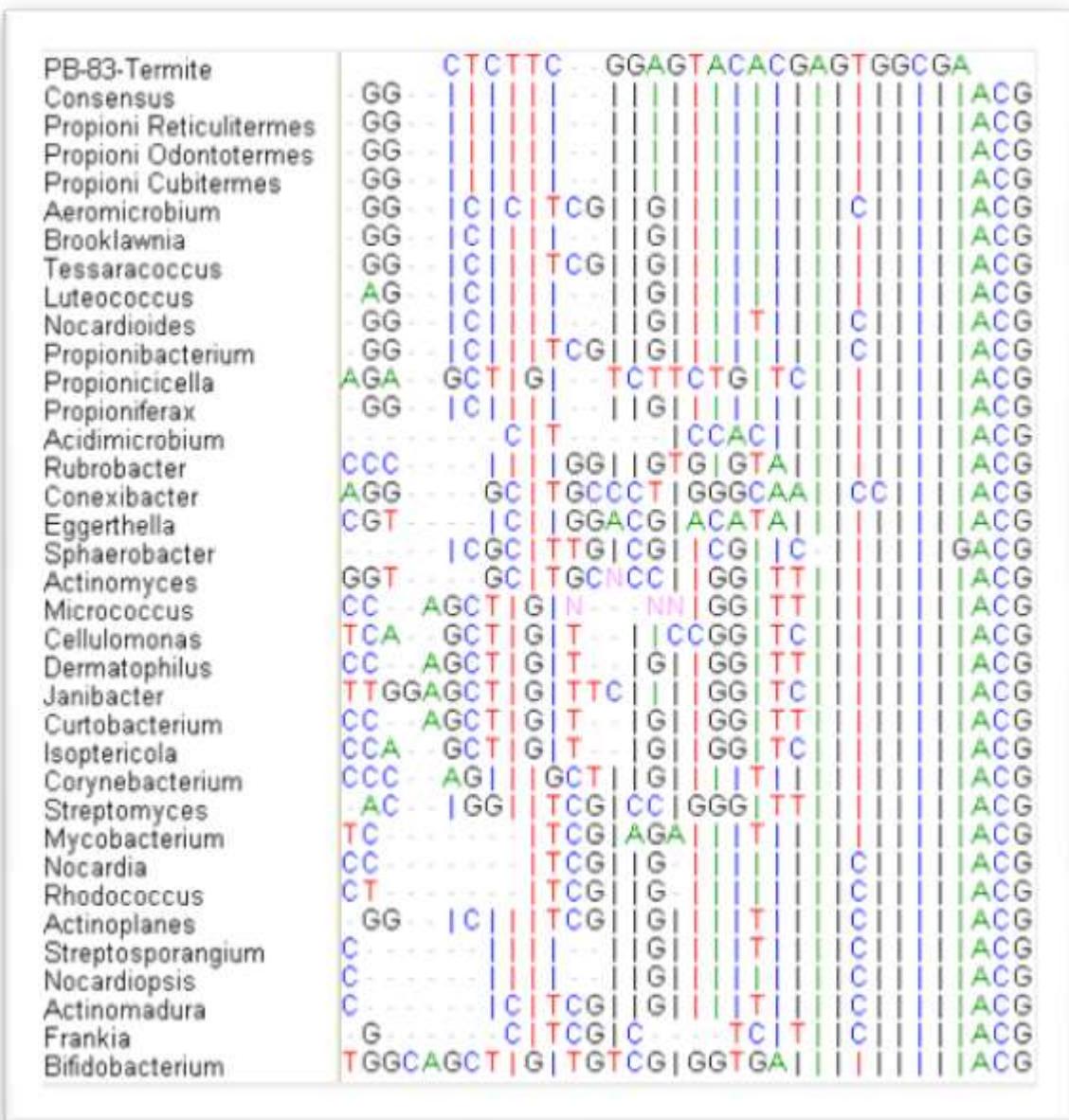
Sélection des meilleurs couples d'amorces.

Afin de vérifier la spécificité théorique des paires d'oligonucléotides, les 3 combinaisons possibles d'amorces (PB-720/PB-1292, PB-83/PB-1292 et PB-83/PB-737) ont été testées sur les 5 souches actinomycétales utilisés comme témoins négatifs (Figure C-6, Figure C-7, Figure C-8). Les conditions de PCR sont les mêmes que précédemment avec une température d'hybridation fixée à 68°C.

La révélation des amplifications par électrophorèse montre une forte spécificité des deux premiers couples d'amorces utilisés (PB-720/PB-1292 et PB-83/PB-1292), puisqu'aucun des témoins négatifs n'a pu être amplifié contrairement au témoin positif. Les fragments d'ADN amplifiés à partir de l'échantillon de tube digestif affichent les longueurs attendues (environ 570pb et 1210pb, respectivement). Il serait cependant nécessaire d'étendre la gamme des témoins, en particulier pour le couple PB-720/PB-1292. En effet, seule l'amorce anti-sens PB-1292 suffirait pour éviter l'hybridation des 5 échantillons témoins.

La paire PB-83/PB-737 montre une amplification inattendue pour les témoins T_1 , T_2 et T_4 . Il s'agit des mêmes témoins que ceux amplifiés par le couple PB-83/R1378. Il semblerait donc que le primer PB-737 n'ait pas exercé son pouvoir de sélection. L'explication pourrait venir des conditions de PCR qui ne seraient pas assez adaptées pour ce couple d'amorces. Mais les caractéristiques propres de l'amorce PB-737 apportent également un élément de réponse. En effet, la fin en 3' de la séquence de l'amorce se situe dans une région très conservé de l'ADNr 16S pour tous les actinomycètes (Figures C-11). Cette séquence de douze paires de bases pourrait permettre l'amorçage de la réPLICATION sans que la partie 5' de l'oligonucléotide joue son rôle de sélection.

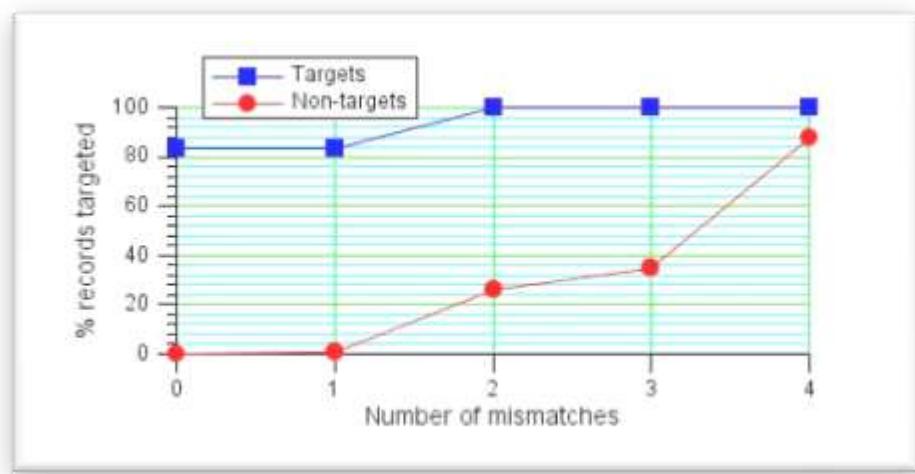




Figures C-9 a | Alignement du primer sens PB-83 avec divers séquences d'actinomycètes
b | Analyse de la spécificité du primer par le logiciel Primrose

	CRAT	GGCG	AAGGCAG	TTCTCT	TGGA		
PB-720-Termite	C	R	A	T		CCT	
Consensus	C	A	C	G		CCT	
Propioni Reticulitermes	C	A	C	G		CCT	
Propioni Odontotermes	C	A	C	G		CCT	
Propioni Cubitermes	C	A	C	G		CCT	
Aeromicrobium	C	A	C	G		GCAT	
Brooklawnia	C	A	C	G		CCT	
Tessaracoccus	C	A	C	G		CCT	
Luteococcus	C	A	C	G		GACT	
Nocardiooides	C	A	C	G		GAGT	
Propionibacterium	C	A	C	G		CCT	
Propionicicella	C	A	C	G		CCT	
Propioniferax	C	A	C	G		CCT	
Acidimicrobium	C	A	C	CGA		GCCG	
Rubrobacter	C	A	G	C	I	G	GCCG
Conexibacter	C	A	C	C	I	G	GACG
Eggerthella	C	A	C	C	T	G	GCCG
Sphaerobacter	C	A	C	CCAG		CCCT	
Actinomyces	C	A	C	G		GCCG	
Micrococcus	C	A	C	G		GCTG	
Cellulomonas	C	A	C	G	A	GCCG	
Dermatophilus	C	A	C	G		GCCA	
Janibacter	C	A	C	G		GCCA	
Curtobacterium	C	A	C	A		GCCG	
Isoptericola	C	A	C	G		GCCG	
Corynebacterium	C	A	C	G		GCAG	
Streptomyces	C	A	C	A		GCCG	
Mycobacterium	C	A	C	G		GCAG	
Nocardia	C	A	C	G		GAAG	
Rhodococcus	C	A	C	G		GCAG	
Actinoplanes	C	A	C	G		GCCG	
Streptosporangium	C	A	C	G		GCCT	
Nocardiopsis	C	A	C	G	T	GCCT	
Actinomadura	C	A	C	G	CG	GGCT	
Frankia	C	A	C	G	G	GCCG	
Bifidobacterium	C	A	C	G	G	GCCG	

a

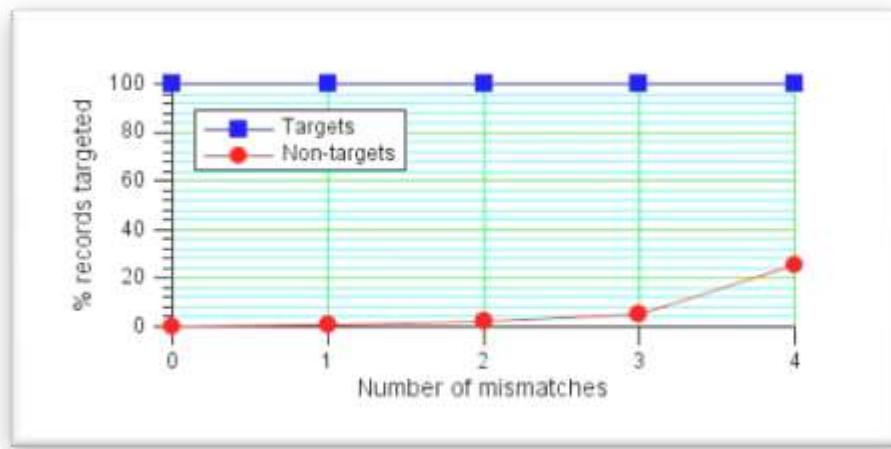


b

Figures C-10 a | Alignement du primer sens PB-720 avec divers séquences d'actinomycètes
b | Analyse de la spécificité du primer par le logiciel *Primrose*

	T	C	T	G	G	A	C	C	T	G	A	G
PB-737-Termite	T	C	T	G	G	A	C	C	T	G	A	G
Consensus	TTC											AGC
Propioni Reticulitermes	TTC											AGC
Propioni Odontotermes	TTC											AGC
Propioni Cubitermes	TTC			G	A	A						AGC
Aeromicrobium	TTC											GAGC
Brooklawnia	TTC											AGC
Tessaracoccus	TTC				GA							AGC
Luteococcus	TTC					GA						AGC
Nocardioides	TTC					GAG	A					GAGC
Propionibacterium	TTC											AGC
Propionicicella	TTC											GAGC
Propionifera	TTC											AGC
Acidimicrobium	CGA			G	GG			A				GAGC
Rubrobacter	CTCG			G	G							CGC
Conexibacter	CTCG			GA	G	G		A				CGC
Eggerthella	CCTG			G	GAA			A				GCGC
Sphaerobacter	CCAG			C		GA						GCGC
Actinomyces	GTC			G	G			A				GAGC
Micrococcus	GTC			G	TG	A		A				GAGC
Cellulomonas	GTCA			G		GCA		A				GAGC
Dermatophilus	GTC			G	A			A				AGC
Janibacter	GTC			G		ACACTA						AGC
Curtobacterium	ATC			G	G	A		A				GAGC
Isoptericola	GTC			G		GCA		A				GAGC
Corynebacterium	GTC			G	AG	A		A				GAGC
Streptomyces	ATC			G		GA		A				GAGC
Mycobacterium	GTC			G	AG	A		A				GAGC
Nocardia	GTC			G		GAAG	A	A				AGC
Rhodococcus	GTC			G	AG	A		A				GAAC
Actinoplanes	GTC			G		GA		A				GAGC
Streptosporangium	TTC			G				A				GAGC
Nocardiopsis	GTT			G				A				GAGC
Actinomadura	CGC			GG		G		T				GAGC
Frankia	GTC			G		GGA	A				A	GAGC
Bifidobacterium	GTC			G		G	I	A				GAGC

a

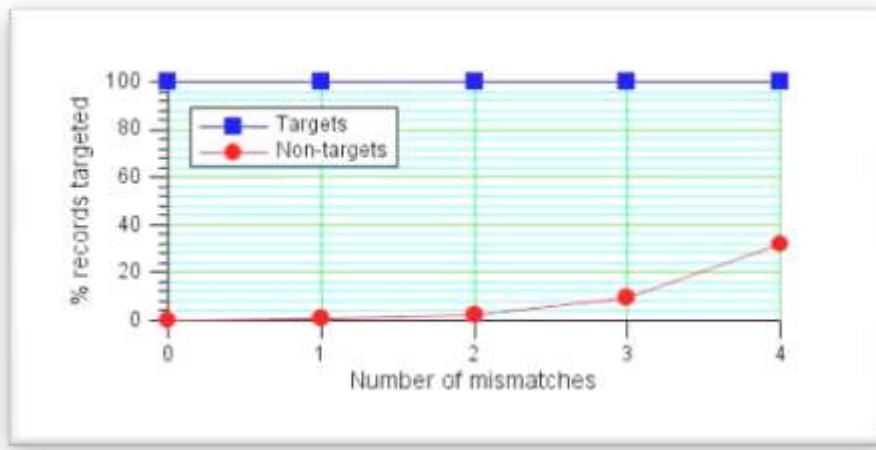


b

Figures C-11 a | Alignement du primer anti-sens **PB-737** avec divers séquences d'actinomycètes
b | Analyse de la spécificité du primer par le logiciel *Primrose*

	C	C	H	G	C	A	A	D	G	G	T	G	A	T	C	Y	C	A	A	
PB-1292-Termite	M	C	H	G	C	A	A	D	G	G	T	G	A	T	C	Y	C	A	A	
Consensus	M	A	D	G	G	A	A	T	G	G	A	T	C	T	C	Y	C	A	A	
Propioni Reticulitermes	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
Propioni Odontotermes	C	A	G																	
Propioni Cubitermes	A	A	T																	
Aeromicrobium	G	A	A	A	G				T	G										
Brooklawnia	G	A	A	T						A										
Tessaracoccus	G	A	A	T													G	A	A	
Luteococcus	G	A	A	T																
Nocardiooides	G	A	T																	
Propionibacterium	G	A	G	T					T											
Propionicicella	A	A	T	A	T												G	A	A	
Propioniferax	G	A	A	T					A								C	A	A	
Acidimicrobium	C	A	A	G					G										A	
Rubrobacter	G	A	T	G					C	G									TC	AA
Conexibacter	G	A	T	G					T	G									TT	AA
Eggerthella	G	A	T	G					A										TT	AA
Sphaerobacter	C	A	A	G					C	CG									TC	AA
Actinomyces	G	A	T	A	T				T	I									T	TA
Micrococcus	G	A	T	A	T				T	G										AA
Cellulomonas	G	A	T	A	T				T	G										AA
Dermatophilus	G	A	T	A	T				T	G							A	TT	AA	
Janibacter	G	A	T	A	T				T	G										AA
Curtobacterium	G	A	T	A	T				T	G										AA
Isoptericola	G	A	T	A	T				T	G										AA
Corynebacterium	G	A	T	G	T				C	C									TT	AA
Streptomyces	G	A	A	G	T				T	G										AA
Mycobacterium	G	A	T	G	T				T	I	A								TT	AA
Nocardia	G	A	T	A	T				T	G									TT	AA
Rhodococcus	G	A	G	A	T				T	G									TT	AA
Actinoplanes	G	A	T	G	T				T	G										AA
Streptosporangium	G	A	T	A	T				T	G									T	AAA
Nocardiopsis	G	A	T	A	T				T	G									T	TAA
Actinomadura	G	A	T	A	T				T	G									T	TAA
Frankia	G	A	T	A	T				T	G										AA
Bifidobacterium	G	A	C	A	G	I	T	G	C	I	T	G	I	G	I	G	T	G	AA	

a



b

Figures C-12 a | Alignement du primer anti-sens PB-1292 avec divers séquences d'actinomycètes
b | Analyse de la spécificité du primer par le logiciel *Primrose*

Conclusion partielle

Le couple d'amorces présentant le meilleur profil est la paire PB-83/PB-1292. Il satisfait aux exigences de spécificité, de plus, le fragment amplifié est suffisamment long (plus de 1200pb) pour permettre une meilleure analyse phylogénétique des séquences amplifiées. Ces amorces ont donc été utilisées pour effectuer l'amplification spécifique de la PW-PCR.

C-IV/ Recherche d'une stratégie d'isolement des propionibactéries de termites par la culture, application de la PW-PCR.

C-IV-1/ Choix du milieu d'isolement et des conditions de culture.

Le milieu PASM.

Très peu d'éléments nous permettent de définir un milieu adéquat pour l'isolement des propionibactéries se développant dans la panse des termites. En effet, on ne connaît ces bactéries que par des approches moléculaires. Or, selon la littérature, il existe des milieux d'isolement permettant le développement d'une gamme relativement large de propionibactéries (Kishishita *et al.* 1980; Stackebrandt & Shaal 2006). C'est notamment le cas du PASM (Sasaki *et al.* 1980 ; Tableau C-1). Particulièrement utilisé pour l'isolement des *Propionibacteria*, le milieu est relativement simple dans sa composition et peut également servir à cultiver d'autres bactéries productrices d'acide propionique. Parmi les constituants du milieu, les extraits de levure et de viande servent d'apport en facteur de croissance et le tryptone (ou trypticase) qui est obtenu par la digestion pancréatique de la caséine de

	Ingredients	Amt (%)
Medium	Tryptone	1,5
	Yeast extract	0,5
	Meat extract	0,5
	Glycerol ou Sodium DL-lactate	1,0
	NaCl	0,2
	K2HPO4	0,2
	L-Cysteine HCL	0,03
	Oleic acid	0,005
	Bromocresol purple	0,002
Diluent	Agar	1,5
	KH2PO4	0,5
	NaHPO4	0,4
	Tween 80	0,1
	L-Cysteine HCL	0,03

Tableau C-1 | Composition du milieu PASM et du diluent

soja permet le développement des microorganismes exigeants et difficiles à cultiver. L'agar habituellement utilisé pour ce milieu n'a pas été ajouté à la solution pour garder le milieu à l'état liquide.

Les sources de carbone.

La sélection des propionibactéries peut notamment se faire en limitant les sources de carbone nécessaires au développement bactérien. On sait que les propionibactéries, selon les espèces, sont capables de métaboliser divers hydrates de carbone. Elles utilisent principalement les voies d'Embden-Meyerhof et de l'hexose monophosphate (HMP) (Figure C-13 ; Vorobjeva 1999). C'est ainsi qu'elles produisent des acides organiques variés comme l'acide propionique, l'acide acétique, l'acide succinique, l'acide formique et autres en quantité moindre.

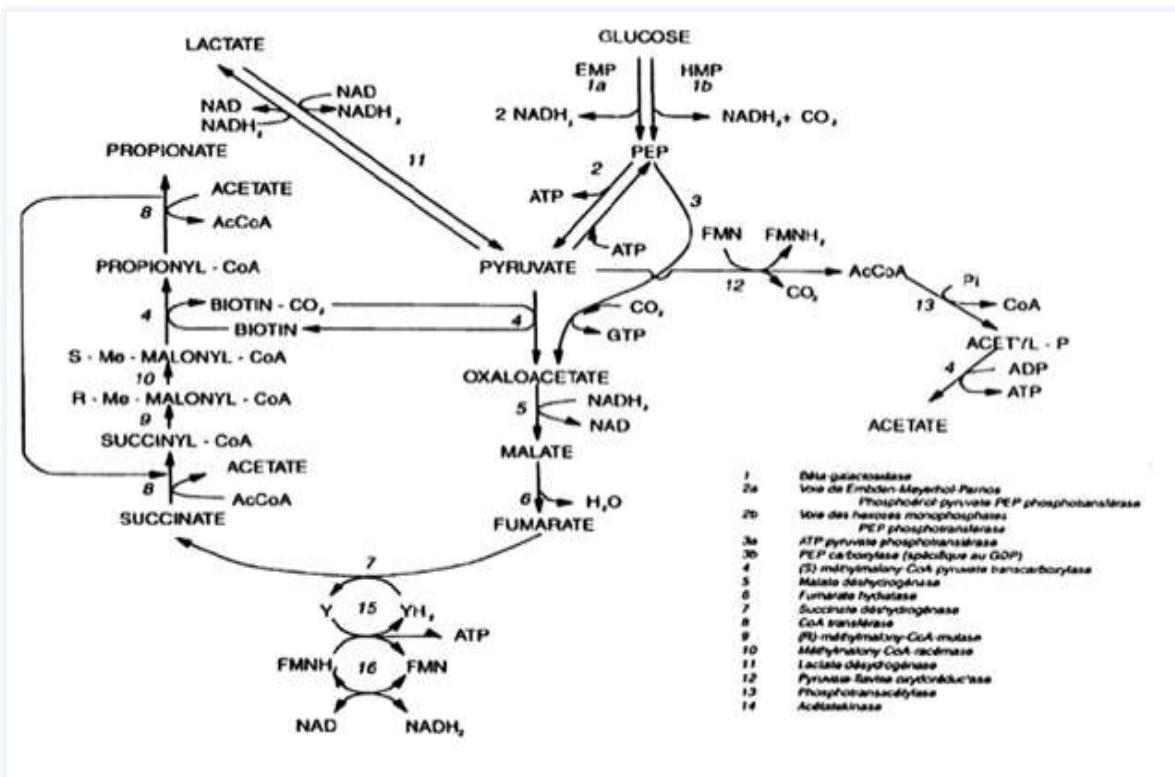


Figure C-13 | Voies métaboliques des propionibactéries

Pour notre expérience, deux sources de carbone, le lactate de sodium et le glycérol, ont été testés pour l'isolement des *Propionibacteriaceae* de termes. Le glycérol et le lactate de sodium présent dans le milieu permettent de répondre aux exigences nutritionnelles des *Propionibacteriaceae*, en tant que source de carbone. D'après certaines publications (El-Hagarawy et al. 1954; Gardner 1998), le lactate de sodium à hauteur de 1%, semble être une

alternative non négligeable comme source carbonée car il stimule la production d'acide propionique et active la croissance des propionibactéries. Lors des processus de fermentation, le lactate est transformé en pyruvate. La présence d'extrait de levure dans le milieu stimule également la fermentation du lactate de sodium.

L'oxygénéation.

Le second paramètre à être analysé est l'apport en oxygène dans le milieu de culture. Dans le tube digestif des termites, les propionibactéries semblent se répartir sur les parois de la panse dans une zone aérobie. Il est donc probable que ces actinomycètes aient besoin d'oxygène pour se développer. Cependant, les propionibactéries sont généralement connues pour être anaérobies strictes ou facultatives, voire microaérophiles.

Ces différentes caractéristiques que pourraient avoir les souches recherchées ont été testées. Le dispositif consiste à opposer une série de tubes où l'oxygénéation est favorisée par une agitation mécanique par rapport à une série de tubes immobiles où l'oxygène se raréfie suivant la profondeur du milieu. La nature de la réponse bactérienne à l'oxygène peut dans ce cas se déterminer selon l'endroit dans le tube où les bactéries se développent (Figure C-14). En effet, la surface qui est directement exposée à l'air est aérobie. Puis, le contenu en oxygène du milieu diminue vers le fond du tube jusqu'à devenir anaérobie. Dans le milieu PASM utilisé, la L-cystéine est utilisé comme agent réducteur pour diminuer le taux d'oxygène.

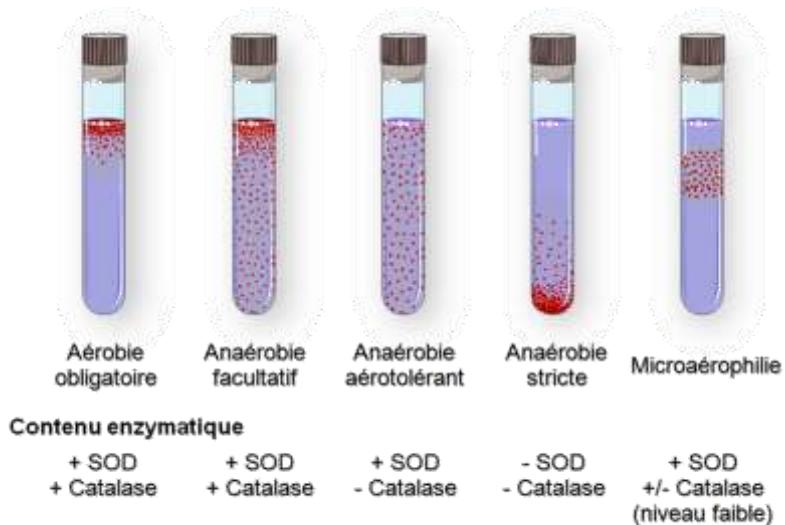


Figure C-14 | Expression des différents types respiratoires en milieu liquide
(Meyer et al. 1984)

C-IV-2/ Protocole expérimental.

Dans un premier temps, les broyats de pâses préalablement débarrassées de leur contenu sont mis en solution dans le diluant stérile. Cette suspension contenant les bactéries intestinales sert de solution mère pour la série de dilutions (de 10^{-1} à 10^{-6}). Le milieu PASM a été préparé selon les proportions détaillées dans le Tableau C-2, puis autoclavé à 120°C pendant 20 minutes (1 bar) et coulé dans les tubes stériles sous une hôte à flux laminaire. Trois répliquats sont réalisées pour chaque condition de culture et chaque dilution. Ces répliquats sont divisés en 2 séries : l'une sans agitation et l'autre avec agitation. Suite à l'ensemencement, les tubes sont incubés à 28°C pendant une semaine.

Dilutions	Source de carbone	Lactate de sodium		Glycérol	
		-	+	-	+
Agitation	10^{-1}	1	2	3	4
		5	6	7	8
		9	10	11	12
	10^{-2}	13	14	15	16
		17	18	19	20
		21	22	23	24
Dilutions	10^{-3}	25	26	27	28
		29	30	31	32
		33	34	35	36
	10^{-4}	37	38	39	40
		41	42	43	44
		45	46	47	48
	10^{-5}	49	50	51	52
		53	54	55	56
		57	58	59	60
	10^{-6}	61	62	63	64
		65	66	67	68
		69	70	71	72

Tableau C-2 | Codage des tubes de milieu de culture

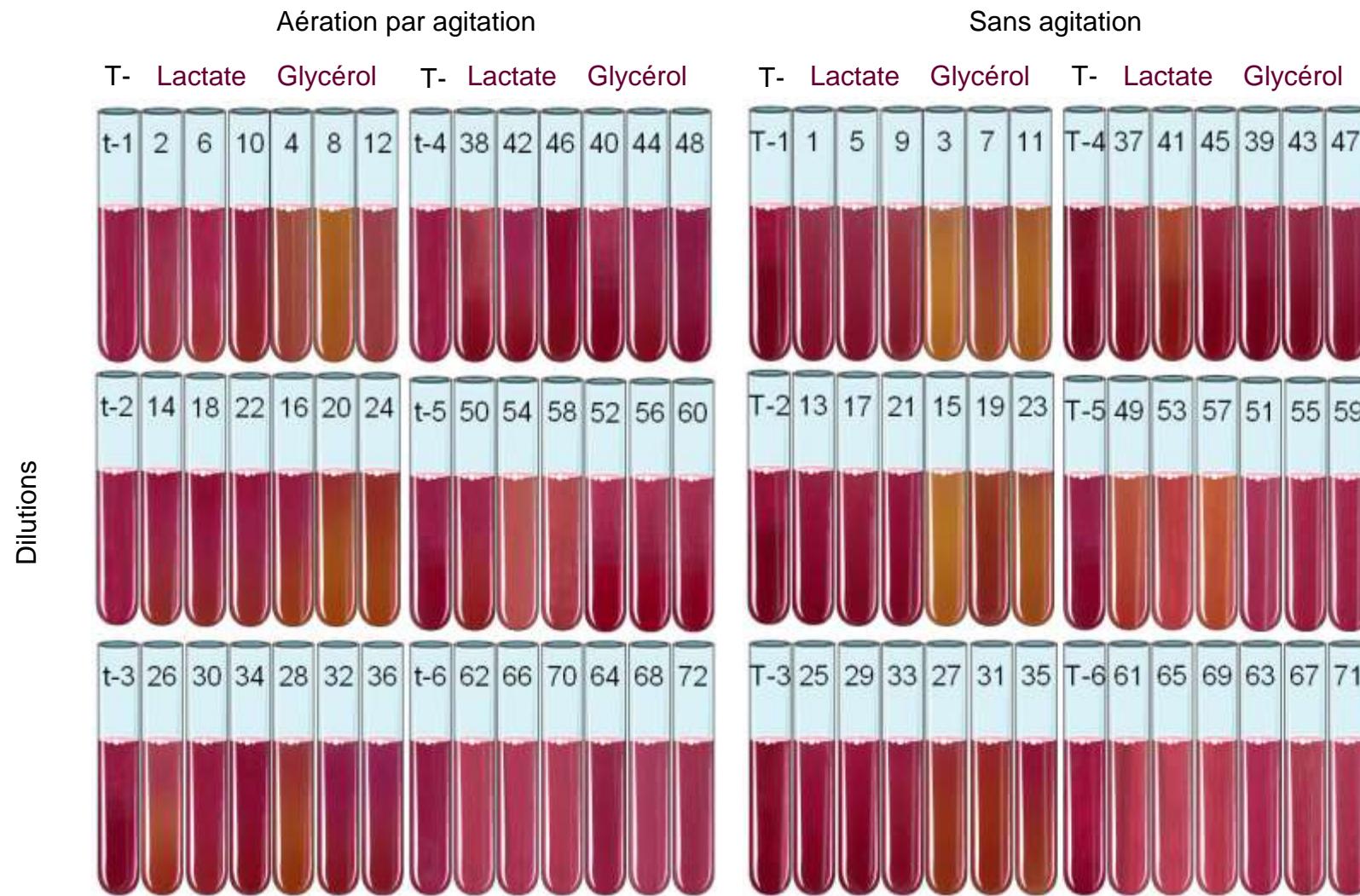
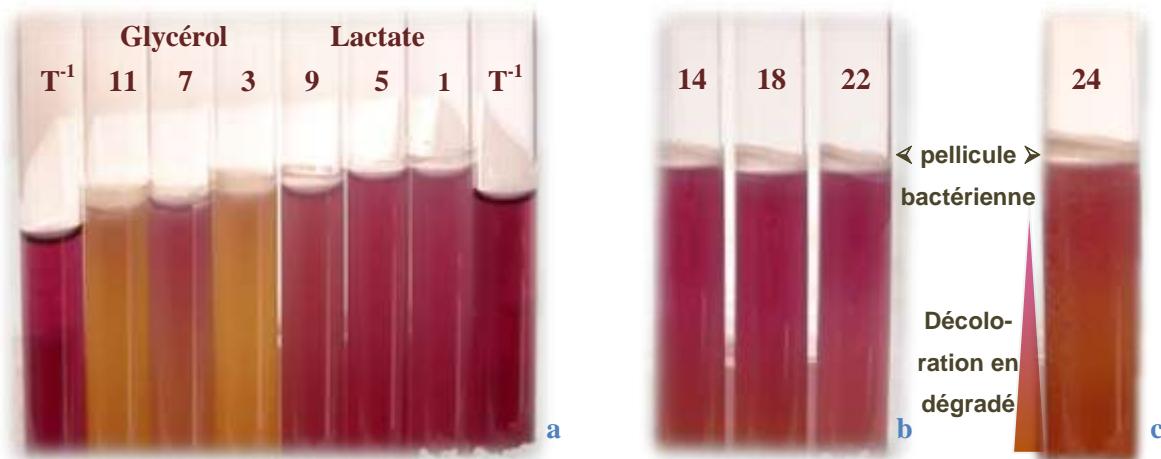


Figure C-15 | Résultats des cultures en milieu liquide (PASM)

C-IV-3/ Résultats des cultures bactériennes.

Croissance bactérienne selon les milieux de culture.

Après incubation des différents tubes de culture, un trouble est apparu rapidement mettant en évidence un développement bactérien. La croissance bactérienne a notamment été constatée dans tous les tubes de culture sous la forme d'un culot qui diminue proportionnellement avec le gradient de dilution. Une pellicule bactérienne s'est également développée à la surface du milieu de culture (Figure C-16b), et ce d'avantage pour les plus faibles dilutions (10^{-1} à 10^{-3}) mais indifféremment du milieu ou de la présence ou non d'agitation.



Le développement bactérien est également mis en évidence par un changement de coloration du milieu qui va du pourpre au jaune. Dans la plupart des tubes concernés (2, 4, 6, 7, 10, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 31, 32, 35, 36, 37, 38, 41 et 50), ce changement est sous la forme d'un gradient de couleur où le milieu jaunit graduellement vers le fond du tube (cf. Figure C-16a et c). Pour les tubes à faible dilution (10^{-1} et 10^{-2} : 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 19 et 23), la coloration est plus intense et tout le milieu est coloré.

Plus que la détermination de la masse microbienne cultivée (non montré ici), l'observation de ce phénomène de coloration permet la comparaison entre les différents

facteurs testés. Ainsi les variations de coloration entre les milieux étudiés ont été calculées en rapport avec le témoin de dilution, selon la formule suivante :

$$Ec_x = \sqrt{(R_x - R_T)^2 + (V_x - V_T)^2 + (B_x - B_T)^2}$$

R_x , V_x , B_x , R_T , V_T et B_T correspondent aux valeurs respectives des couleurs rouge, vert et bleu du code informatique RVB moyennées pour chaque échantillon (_x) et pour chaque témoin (_T) ; les valeurs sont comprises entre 0 et 255.

Ec_x est l'écart de coloration observé entre l'échantillon (_x) et le témoin correspondant (_T) (par exemple entre l'échantillon 2 et le témoin t-1) ; il correspond en réalité à un calcul de distance géométrique entre les couleurs RVB de l'échantillon et du témoin correspondant.

Le graphique Figure C-17 montre les tendances suivies selon les différents milieux et conditions de culture étudiés.

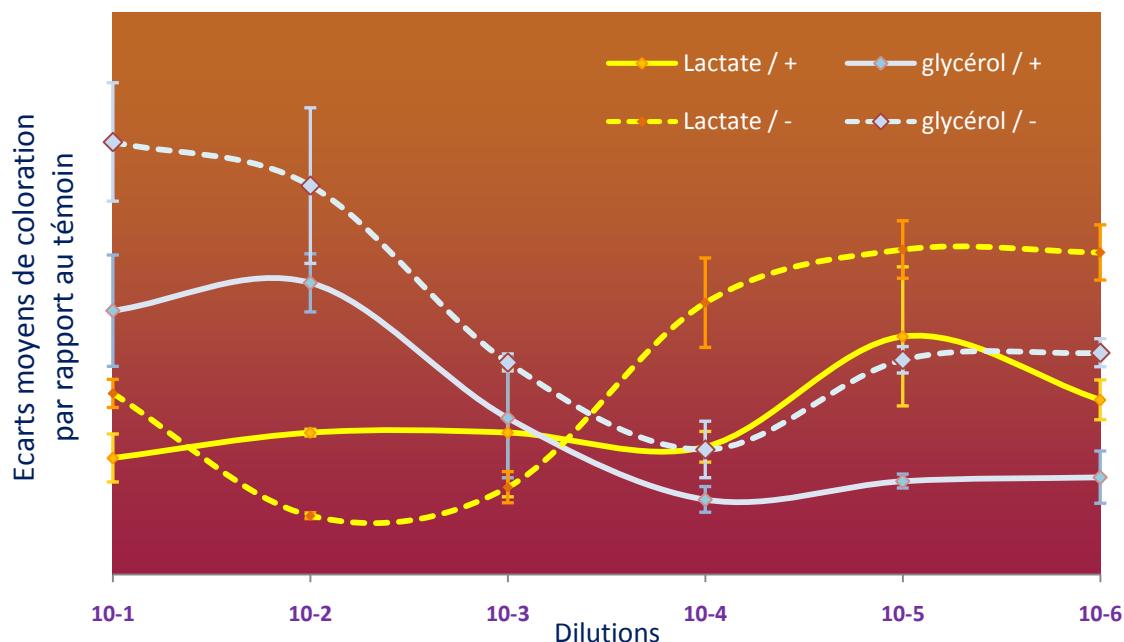


Figure C-17 | Graphique représentant l'évolution de l'écart moyen de coloration Ec_x en fonction des dilutions et pour les différents paramètres testés.

Concernant les milieux à base de glycérol, la coloration passe progressivement du jaune au pourpre avec l'augmentation des dilutions. La décoloration est en effet plus intense pour les milieux ensemencés avec des inocula concentrés, même si la variation est relativement forte du fait que certains répliquats (7, 16, 19, 32, 36) ont réagi moins fortement.

En revanche, la tendance est opposée pour les milieux à base de lactate de sodium où les plus forts changements de couleur apparaissent aux dilutions 10^{-4} et 10^{-5} (particulièrement pour les tubes 41, 49, 53, 54, 57 et 58). Dans ces cas, cependant, la décoloration tend plutôt vers un ton rosâtre que jaunâtre. Enfin, il est à noter que l'aération des tubes par agitation a eu une faible influence sur les tendances observée puisque les milieux "non-agités" montrent généralement une décoloration plus forte (Figure C-17).

Interprétation des résultats.

Le changement de coloration est dû au pourpre de bromocrésol qui est un indicateur de pH. Quand la couleur tend vers le jaune, cela traduit une acidification du milieu. Cette acidification du milieu pourrait résulter de la synthèse d'acide tel que l'acide propionique ou d'autres acides produits par les propionibactéries (Vorobjeva 1999). L'acidification est souvent plus accentuée dans le fond du tube là où se situe le culot bactérien. Il est donc probable que les bactéries de ce culot soient au moins microaérophiles (Figure C-14). Elles ne seraient pourtant pas anaérobies strictes puisqu'elles se développent également dans les milieux aérés ou microaérés par agitation.

Enfin, la différence observée entre les milieux à base de lactate de sodium et ceux à base de glycérol suggère que les bactéries 'acidifiantes' ne réagissent pas de la même manière à la source de carbone. Ces bactéries se développent moins bien en présence de lactate de sodium, peut-être inhibées par la croissance d'autres bactéries plus compétitives dans ce cas. Mais il se peut également que ce ne soit pas les mêmes bactéries 'acidifiantes' qui interviennent dans les deux séries relatives aux sources de carbone. A savoir maintenant s'il s'agit des colonies de propionibactéries attendues.

C-IV-4/ Capacité des milieux testés à isoler les propionibactéries spécifiques aux termites, vérifiée par PW-PCR

Pour chaque dilution et pour chaque facteur étudié, un des répliquats de culture a été choisi pour effectuer le test de PW-PCR. Ici, les colonies bactériennes sont directement récupérées après centrifugation (1200 rpm, 5 minutes). L'extraction d'ADN du culot est réalisée selon la méthode CTBA (cf. 'mat. et meth.'). L'ADN extrait est quantifié par photométrie (nanodrop) puis amplifié. Cette amplification spécifique met en jeu le couple d'amorces PB-83/ PB-1292 selon le programme défini page X et pour une température d'hybridation de 68°C.

Résultats de la PW-PCR

Après révélation du gel d'électrophorèse (Figure C-18), aucune amplification n'apparaît pour les tubes de culture testés. En revanche, le témoin positif présente une bande correspondant au fragment d'ADN de longueur attendue, ce qui suggère que les résultats négatifs ne sont pas dus à des conditions de PCR défaillantes. On peut donc conclure que les milieux de culture testés n'ont pas permis la croissance de souches de *Propionibacteriaceae* spécifiques au tube digestif des termites.

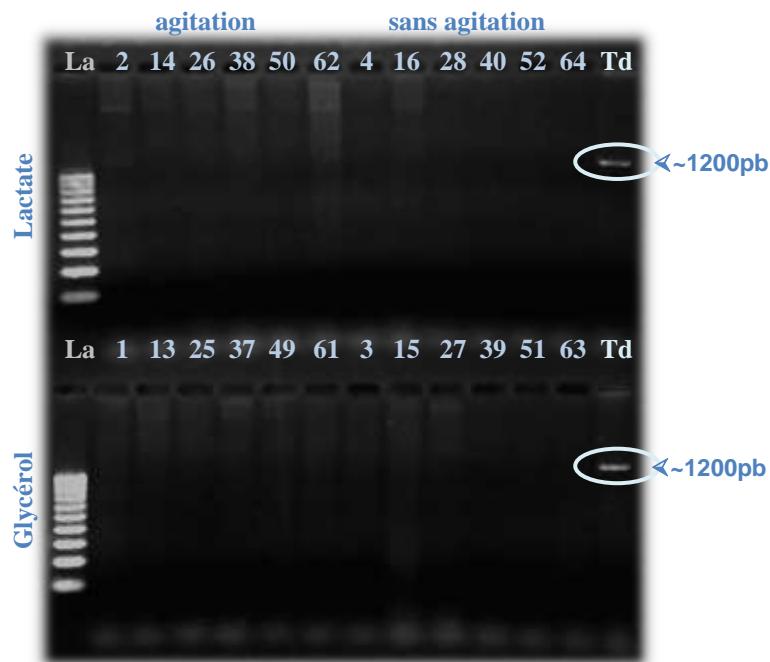


Figure C-18 | Résultats de la PW-PCR

Discussion et conclusion partielle

Si nos investigations visant à isoler les propionibactéries spécifiques aux termites n'ont pu aboutir, plusieurs explications pourraient être avancées.

La première hypothèse est celle de la compétition entre bactéries. En effet, une quantité relativement importante de bactéries s'est rapidement développée dans les tubes de culture. Or, ce n'est pas la propriété des micro-organismes spécialistes d'avoir une croissance rapide. Il est donc possible que le trouble bactérien obtenu soit le résultat d'une contamination par des formes opportunistes, ayant par ailleurs empêché la croissance des propionibactéries attendues.

Le milieu d'isolement PASM convient à une gamme élargie de propionibactéries, néanmoins, il semblerait que les *Propionibacteriaceae*, qui se développent uniquement dans

le tube digestif des termites, aient des exigences de croissance plus précises, et par conséquent plus difficile à reproduire. On peut supposer qu'elles dépendent de leurs interactions avec le tube digestif des termites et/ou avec le milieu fermentaire, qui n'ont pu être imité. Plus généralement, le milieu PASM offre des conditions de vie très différentes du milieu naturel de ces propionibactéries. Plusieurs facteurs pourraient être à nouveau testés tels que la basicité, la solidification du milieu, l'apport de produits de fermentation, l'ajout d'antibiotiques, etc. C'est, en effet, tout l'intérêt de la méthode de PW-PCR qui permet de tester plusieurs milieux tout en allégeant le travail d'analyse des cultures. A ce stade, l'étude n'est pas encore aboutie et plusieurs pistes restent à approfondir.

Enfin, ces investigations ont débuté avec le postulat que les propionibactéries découvertes chez les termites étaient génétiquement proches des bactéries propioniques connues dans les milieux médical et industriel. Or, il est possible que les formes présentes chez les termites aient un métabolisme éloigné de celui des *Propionibacteria* de la peau ou des produits laitiers. Il serait donc intéressant d'analyser plus finement les relations phylogénétiques entre les formes spécifiques aux intestins de termites et les autres genres de la famille. La conception des amorces spécifiques PB-86 et PB-1292 permet d'ailleurs ce genre d'analyses phylogénétiques.

C-V/ Etude phylogénétique des séquences de propionibactéries issues de la panse de plusieurs espèces de termites

C-V-1/ Etats des connaissances et présentation de l'étude.

Dans la première partie de notre étude sur les populations actinomycétales du tube digestif des termites *Nasutitermes*, 11 séquences ont pu être identifiées par la méthode de PCR-DGGE comme appartenant au sous-ordre des *Propionibacterineae*. Détectée chez toutes les espèces de termites étudiées, cette communauté particulière est la mieux représentée dans nos résultats. En comparaison, parmi toute la microflore procaryotique recensée à partir du tube digestif des termites dans les banques de données internationales (Genbank, Ribosomal Data Base II), seules 33 séquences (fragment d'ADNr 16s) sont référencées comme appartenant au sous-ordre des *Propionibacterineae*. Ces séquences proviennent de plusieurs études sur différents termites (essentiellement *Reticulitermes speratus*) (Nakajima et al. 2005 ; Miyata et al. 2007 ; Fall et al. 2007 ; Shinzato et al. 2007).

Cependant, l'alignement des séquences obtenues à partir de nos travaux et des banques de données ne permet pas de réaliser une analyse phylogénétique. En effet, la difficulté d'étudier des séquences de sources différentes est qu'elles ne présentent pas la même taille. Certaines atteignent plus de 1300 paires de bases (pb) alors que la majorité compte de 300 à 700 pb. Nos séquences obtenues par PCR-DGGE atteignent au maximum 331 paires de bases. Et comparées avec les autres séquences (Tableau C-4), elles ne recouvrent parfois pas les mêmes régions du gène codant pour l'ARNr 16s.

Objectifs de l'étude

Afin de réaliser une étude phylogénique à partir de séquences suffisamment longues, il est intéressant d'utiliser les amores PB-86 et PB-1292 définies précédemment. La taille du fragment d'ADN 16s amplifié est d'environ 1200 paires de bases et correspond aux séquences communément trouvées dans les banques de données. Les amplifications spécifiques réalisées directement à partir de broyat de pances de différentes espèces de termites, permettraient ainsi de comparer génétiquement les espèces de propionibactéries entre elles et en rapport avec les séquences des autres genres du sous-ordre *Propionibacterineae*. L'objectif serait ainsi de replacer clairement les propionibactéries de termites au sein de ce sous-ordre, mais également de discuter des relations évolutives entre les deux partenaires du mutualisme "propionibactéries / termites".

C-V-2/ Approche expérimentale.

Le matériel biologique : les différentes espèces de terme étudiées.

Afin de mieux connaître la répartition des propionibactéries parmi les isoptères, 8 espèces de termites ont été étudiées. Ces termites appartiennent à des familles variées qui diffèrent suivant des critères géographiques, alimentaires ou évolutifs.

- *Hodotermopsis sjostedti* (*Termopsidae* ; *Termopsinae*) [Vietnam]. Il s'agit de termites ayant gardé des traits morphologiques et biologiques ancestraux proche des blattes (Thorne et al. 2000). Formant de petites colonies sans ouvriers, ils vivent dans le bois humide qu'ils consomment.

- *Reticulitermes santonensis* (*Rhinotermitinae* ; *Heterotermitinae*) [Oléron, France]. Il s'agit de termites souterrains xylophages particulièrement connus pour leur importance économique. Le genre est largement répandu à travers le monde. *R. santonensis* est une espèce introduite, originaire d'Amérique du Nord, très présente dans le sud-ouest de la France mais également à Paris ou Hambourg (Clément et al. 2001).

- *Prorhinotermes canalifrons* (*Rhinotermitinae* ; *Prorhinotermitinae*) [Réunion, Fr.]. C'est une espèce insulaire répartie à l'ouest de l'océan indien. On la trouve préférentiellement dans les arbres fruitiers où ses colonies populeuses peuvent causer d'importants dégâts. (Bordereau et al. 2002)

- *Pseudacanthotermes militaris* et *P. spiniger* (*Termitidae* ; *Macrotermitinae*) [Congo et Gabon, respectivement]. Ces deux espèces sont des termites champignonnistes. Ils cultivent un champignon exosymbiotique, le *Termitomyces*, afin de dégrader la matière végétale qu'ils consomment ensuite. Ils sont également redoutés en Afrique pour être des nuisibles notables des cultures vivrières (plantations de cannes à sucre) (Mora 1992).

- *Nasutitermes lujae* et *N. voeltzkowi* (*Termitidae* ; *Nasutitermitinae*) [Congo et Île Maurice, respectivement]. Ce sont deux espèces arboricoles xylophages qui construisent généralement des nids ovoïdes dans les arbres des forêts tropicales humides. Elles forment des colonies très peuplées, avides de bois morts plus ou moins dégradé (Grassé 1984).

- *Trinervitermes* sp. (*germinatus* ?) (*Termitidae* ; *Nasutitermitinae*) [Côte d'Ivoire]. Ces termites ont été récoltés par A. Akpesse dans les savanes de Lamto. Ils sont fourrageurs et se nourrissent essentiellement d'herbes sèches. Le nid, en forme de petit monticule, est construit à la surface du sol pour stocker la nourriture (Ohiagu & Wood 1976).

Toutes ces espèces à l'exception du *Trinervitermes*, proviennent des élevages de l'université de Dijon (A. Robert, C. Bordereau). L'échantillon de *Trinervitermes* correspond à une centaine d'individus conservés dans l'éthanol à 70%.

Obtention des séquences de propionibactéries trouvées chez les termites.

L'ADN des panses de plusieurs ouvriers est extrait selon les techniques déjà décrites (cf. 'mat. et meth.'). Une amplification spécifique a été ensuite réalisée à l'aide des amores PB-86 et PB-1292 selon le protocole déjà exposé et les amplicons sont envoyés pour séquençage (Genome Express, laboratoire de Grenoble).

D'autres séquences disponibles sur les banques de données internationales (Ribosomal Data Project II, Genbank) ont été ajoutées aux nôtres. Il s'agit d'une part des 39 séquences de propionibactéries découvertes chez d'autres espèces de termites (intestin ou nid), d'autre part de 1 à 3 séquences (>1300pb) appartenant à chacun des 19 genres connus du sous-ordre des *Propionibacterineae*. Ces séquences supplémentaires permettront dans un premier temps de comparer entre-elles les formes propres aux termites, et dans un second temps, de les positionner dans la classification taxonomique.

Calcul de similarité et analyse phylogénétique.

L'ensemble des séquences d'origine différentes ont été regroupées et alignées sous BioEdit. Certaines, trop courtes, ne partagent pas de régions d'ADN communes (Tableau C-4). Ainsi, afin de pouvoir comparer génétiquement les propionibactéries de termites, un calcul de similarité a été réalisé deux par deux selon une méthode incluant les 'gaps' internes et réduisant la comparaison au plus petit fragment de séquence aligné (L2-type Percent Sequence Identity ; May 2004). Le pourcentage de similarité obtenu dépend donc de la longueur de fragment commun des séquences analysées, mais il permet néanmoins d'identifier les séquences les plus proches entre-elles. Concernant la comparaison avec les séquences relatives aux genres de *Propionibacterineae*, les calculs se sont limités aux séquences de plus de 1200 pb.

L'ensemble des séquences de plus de 1200 pb a de nouveau été aligné sous BioEdit puis analysé sous MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007). La matrice des distances génétiques est basée sur le calcul de Kimura à 2 paramètres. Les méthodes de constructions phylogénétiques utilisées sont celles du Neighbor-Joining et du Maximum de Parcimonie. Enfin, la robustesse des nœuds des arbres a été testée par Boostrap avec 5000 répétitions aléatoires.

C-V-3/ Résultats.

Amplification spécifique et séquençage des propionibactéries issues des panses des différentes espèces de termites.

Sur les 8 échantillons relatifs aux différentes espèces de termites étudiés, 7 ont permis d'obtenir un produit d'amplification d'environ 1200 pb. Ces 7 amplicons ont été séquencés. En revanche, pour le huitième échantillon correspondant à l'espèce *Nasutitermes voeltzkowi*, le résultat de la PCR spécifique est positif mais semble trop faible pour être analysé. En effet, les tentatives de séquençage ont échoué. Dans ce cas, le problème diagnostiqué, celui d'une trop faible quantité d'ADN, serait dû à la qualité de l'extrait d'ADN utilisé pour la PCR. Cet échantillon plus ancien que les autres semble avoir subi des altérations empêchant une amplification optimale.

Analyse des séquences de propionibactéries issues des panse de termites

Les séquences obtenues ont été comparées à la banque de donnée Genbank par BLAST. Toutes se rapprochent génétiquement de séquences de propionibactéries (AB198478 et AB288888) déjà détectées chez d'autres espèces de termites (*Reticulitermes speratus* et *Odontotermes formosanus*, Nakajima et al. 2005 ; Shinzato et al. 2007). Pourtant, si ces séquences correspondent aux plus proches voisins génétiques, le degré de similarité est parfois faible (90,3% pour la séquence relative à *Trinervitermes sp.*, 94,4% pour celle de *Prorhinotermes canalifrons*).

Origin Termite	Closest relatives		
	Taxonomical affiliation	Accession	% Id
1 <i>Hodotermopsis sjoestedti</i>	uncultured actinobacterium RsW01-046	AB198478	0,979
2 <i>Prorhinotermes canalifrons</i>	uncultured bacterium BOf2-16	AB288888	0,944
3 <i>Reticulitermes santonensis</i>	uncultured actinobacterium RsW01-046	AB198478	0,973
4 <i>Pseudacanthotermes militaris</i>	uncultured bacterium BOf2-16	AB288888	0,961
5 <i>Pseudacanthotermes spiniger</i>	uncultured bacterium BOf2-16	AB288888	0,955
6 <i>Trinervitermes sp.</i>	uncultured bacterium BOf2-16	AB288888	0,903
7 <i>Nasutitermes lujae</i>	uncultured bacterium BOf2-16	AB288888	0,954

Tableau C-3 | Affiliation phylogénétique des séquences de propionibactéries obtenues par PCR spécifique

Nos séquences et les 39 séquences de propionibactéries référencées comme provenant de termites ont été comparées entre-elles (Tableau C-3). Le calcul du pourcentage d'identité de type L2, montre que les propionibactéries issues du tube digestif des termites (toutes espèces confondues) sont génétiquement éloignées de celles isolées à partir de fragment de nids du nid (Id moy= 88,5%). Seule la séquence TD19 (DQ347928), provenant du tube digestif des termites humivores *Cubitermes niokoloensis*, est proche génétiquement de celles provenant du nid de cette même espèce (Id=98,1% avec le clone AB-Mi56).

Par ailleurs, les séquences provenant du tube digestif sont plus proches à l'intérieur d'un même genre de termites (pour le genre *Reticulitermes*, Id moy=97,3% ; pour celui de *Pseudacanthotermes* Id=98,5%) qu'entre les différents genres. Dans ce dernier cas, le pourcentage de similarité moyen peut varier d'environ 87% (pour les séquences de *Nasutitermitinae* Pro-Ter-Ts, NtA8, Nt-O88) à environ 96% pour la séquence BOf2-16 par rapport aux autres séquences.

#	Accession	Code	Termitic	pb																					
1	-	ProTer-Hs	<i>Hodotermopsis sjostedti</i>	Gut	1095																				
2	AB089071	Rs-Q42	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	1299	97,91%																			
3	AB198446	RsW01-005	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	1337	92,36%	93,70%																		
4	AB198453	RsW01-014	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	1336	97,81%	99,69%	93,80%																	
5	AB198455	RsW01-017	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	1336	97,91%	99,77%	93,72%	99,78%																
6	AB198463	RsW01-027	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	1334	92,27%	93,47%	92,97%	93,57%	93,64%															
7	AB198477	RsW01-044	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	427	97,19%	99,23%	89,25%	99,77%	99,77%	94,74%														
8	AB198478	RsW01-046	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	1336	97,91%	100,0%	93,87%	99,70%	99,78%	93,64%	99,30%													
9	AB198480	RsW01-051	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	704	97,82%	99,40%	92,07%	99,72%	99,57%	93,35%	99,77%	99,43%												
10	AB198487	RsW01-059	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	703	97,99%	99,55%	92,20%	99,86%	99,72%	93,48%	99,77%	99,57%	99,86%											
11	AB198495	RsW01-068	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	674	98,06%	99,53%	91,57%	99,41%	99,55%	93,21%	99,30%	99,41%	99,41%	99,55%										
12	AB198497	RsW01-070	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	1336	91,44%	92,29%	92,52%	91,77%	91,69%	93,64%	88,56%	91,63%	90,93%	90,78%	90,09%									
13	AB198503	RsW01-079	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	598	97,76%	100,0%	90,82%	99,33%	99,50%	94,11%	99,30%	100,0%	99,50%	99,50%	99,33%	89,83%								
14	AB198509	RsW01-086	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	528	97,39%	99,59%	90,57%	100,0%	99,81%	94,16%	99,77%	99,62%	100,0%	100,0%	99,62%	90,19%	99,62%							
15	AB198517	RsW02-016	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	417	97,74%	99,48%	89,98%	99,52%	99,28%	95,20%	96,96%	99,52%	99,52%	99,52%	99,04%	89,26%	99,52%	99,52%						
16	AB198522	RsW02-032	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	417	98,06%	99,48%	89,98%	100,0%	99,76%	94,96%	97,42%	99,52%	100,0%	100,0%	99,52%	89,74%	99,52%	100,0%	99,52%					
17	AB198543	RsW02-072	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	417	98,06%	99,48%	89,98%	100,0%	99,76%	94,96%	97,42%	99,52%	100,0%	100,0%	99,52%	89,74%	99,52%	100,0%	99,52%					
18	AB198549	RsW02-081	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	432	96,62%	100,0%	89,86%	99,54%	99,31%	95,22%	99,30%	100,0%	99,54%	99,54%	99,07%	90,20%	100,0%	99,54%	99,52%	99,52%	99,52%			
19	AB198557	RsW02-097	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	417	98,06%	99,48%	89,98%	100,0%	99,76%	94,96%	99,76%	99,52%	100,0%	100,0%	99,52%	89,74%	99,52%	100,0%	99,52%	100,0%	99,52%			
20	AB198569	RsW02-120	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	417	97,74%	99,21%	89,74%	99,76%	99,52%	94,72%	99,52%	99,28%	99,76%	99,8%	99,28%	89,50%	99,28%	99,76%	99,28%	99,76%	99,28%	99,76%		
21	AB198571	RsW02-123	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	420	97,76%	99,22%	89,57%	99,76%	99,52%	94,74%	99,52%	99,29%	99,76%	99,76%	99,29%	89,34%	99,29%	99,76%	99,76%	99,29%	99,76%	99,52%		
22	-	ProTer-Rs	<i>Reticulitermes santonensis</i>	Gut	1034	96,73%	97,29%	93,38%	97,01%	91,98%	95,18%	97,29%	97,11%	97,11%	97,13%	91,69%	97,10%	96,60%	96,35%	96,72%	96,72%	96,19%	96,72%	96,39%	
23	-	ProTer-Pc	<i>Prorhinotermes canaliculatus</i>	Gut	1118	93,01%	92,95%	93,76%	92,86%	92,95%	91,70%	91,30%	92,95%	94,05%	93,88%	93,58%	93,39%	93,21%	92,83%	91,64%	91,94%	91,94%	91,43%	91,94%	91,72%
24	AB288888	BOf2-16	<i>Odontotermes formosanus</i>	Gut	1337	94,38%	95,92%	94,32%	96,11%	96,04%	94,91%	96,41%	96,04%	96,31%	96,16%	95,56%	93,20%	95,82%	96,40%	96,88%	96,64%	96,41%	96,64%	96,41%	
25	-	ProTer-Ps	<i>Pseudacanthotermes spiniger</i>	Gut	1103	94,36%	94,13%	93,59%	94,13%	94,04%	92,24%	91,04%	94,13%	93,72%	93,72%	93,24%	93,22%	93,72%	93,05%	91,94%	91,94%	91,43%	91,94%	91,72%	
26	-	ProTer-Pm	<i>Pseudacanthotermes militaris</i>	Gut	1106	95,01%	94,67%	94,04%	94,67%	94,58%	92,96%	90,67%	94,67%	93,73%	93,88%	93,24%	93,68%	93,02%	92,83%	92,24%	91,64%	91,14%	91,64%	91,42%	
27	-	ProTer-Ts	<i>Trinervitermes sp.</i>	Gut	1139	88,35%	88,27%	87,82%	88,45%	88,45%	86,96%	86,44%	88,28%	86,98%	86,60%	86,15%	87,39%	85,08%	85,87%	84,48%	85,07%	85,07%	84,57%	85,07%	
28	-	ProTer-NI	<i>Nasutitermes luiae</i>	Gut	1107	92,69%	94,13%	93,42%	94,04%	94,13%	92,61%	90,99%	94,13%	92,79%	92,60%	92,24%	93,50%	91,87%	92,17%	91,33%	91,64%	91,64%	91,12%	91,64%	
29	AB277946	Nt-A8	<i>Nasutitermes takasagoensis</i>	Gut	515	87,38%	87,57%	89,34%	87,57%	87,57%	86,41%	85,55%	87,57%	87,34%	87,05%	85,99%	87,79%	84,34%	84,58%	81,81%	91,50%	81,65%	91,58%	84,88%	
30	AB277947	Nt-A44	<i>Nasutitermes takasagoensis</i>	Gut	509	93,91%	94,30%	97,84%	94,30%	94,30%	91,80%	84,73%	94,30%	93,98%	94,23%	94,03%	93,32%	93,12%	93,20%	93,68%	93,68%	93,68%	92,63%	93,75%	
31	AB277965	Nt-O88	<i>Nasutitermes takasagoensis</i>	Gut	515	87,18%	87,77%	88,95%	87,77%	87,77%	89,20%	84,05%	87,77%	87,82%	87,53%	86,52%	89,66%	85,01%	82,63%	82,63%	82,63%	82,63%	91,58%	90,82%	
32	EU086962	Ncos3	<i>Nasutitermes costalis</i>	Gut	325	91,96%	93,79%	95,76%	93,79%	93,79%	92,09%	-	-	-	-	92,09%	-	-	-	-	-	-	-	-	
33	EU086963	Ncos4	<i>Nasutitermes costalis</i>	Gut	331	91,75%	94,86%	94,56%	94,86%	94,86%	92,45%	-	94,86%	-	-	92,45%	-	-	-	-	-	-	-	-	
34	EU086967	Ncos8	<i>Nasutitermes costalis</i>	Gut	331	93,13%	95,47%	95,47%	95,47%	95,47%	92,15%	-	95,47%	-	-	92,15%	-	-	-	-	-	-	-	-	
35	DQ347928	TD19	<i>Cubitermes niokoloensis</i>	Gut	696	91,68%	91,68%	91,82%	91,68%	91,68%	93,54%	89,68%	91,68%	89,47%	89,74%	89,74%	92,53%	1,77%	90,91%	90,91%	90,91%	90,91%	91,07%		
36	DQ347943	TD47	<i>Cubitermes niokoloensis</i>	Gut	1434	93,09%	94,31%	95,73%	94,61%	94,54%	93,56%	93,13%	94,46%	94,17%	94,02%	93,31%	93,49%	93,23%	93,55%	93,27%	93,51%	93,51%	92,81%	93,51%	
37	AY387300	7317	<i>Cubitermes spp.</i>	Mound	1066	86,03%	86,78%	87,68%	87,30%	87,02%	86,82%	85,35%	87,21%	84,85%	84,69%	84,46%	86,27%	85,26%	85,50%	85,71%	85,48%	85,48%	85,24%	85,11%	
38	DQ347849	AB-Mi7	<i>Cubitermes niokoloensis</i>	Mound	708	90,13%	90,13%	90,14%	90,13%	90,11%	90,97%	90,13%	90,64%	90,91%	91,03%	90,40%	90,68%	91,52%	92,73%	92,73%	92,73%	92,73%	92,86%		
39	DQ347868	MI34	<i>Cubitermes niokoloensis</i>	Mound	1438	89,27%	90,11%	90,29%	90,52%	90,30%	91,12%	89,02%	90,37%	89,79%	89,63%	89,33%	90,69%	89,82%	89,83%	89,29%	89,23%	89,23%	89,81%	89,23%	
40	DQ347879	AB-Mi56	<i>Cubitermes niokoloensis</i>	Mound	707	90,96%	90,96%	90,68%	90,68%	90,96%	92,68%	85,45%	90,96%	87,10%	87,35%	87,78%	91,65%	2,99%	85,51%	85,51%	85,51%	85,51%	85,88%		
41	DQ347885	AB-Mi72	<i>Cubitermes niokoloensis</i>	Mound	1445	86,79%	87,89%	88,86%	88,06%	88,07%	89,81%	90,91%	88,20%	89,49%	89,62%	89,61%	88,72%	90,69%	91,35%	91,13%	91,13%	90,74%	91,13%	90,91%	
42	DQ347886	AB-Mi79	<i>Cubitermes niokoloensis</i>	Mound	1434	86,96%	88,33%	91,17%	88,56%	88,63%	89,82%	84,58%	88,63%	86,10%	85,94%	85,48%	90,13%	85,48%	85,82%	85,89%	85,65%	84,76%	85,65%	85,41%	

Tableau C-4 Pourcentages de similarité entre les séquences de propionibactéries isolées chez les termites.

Certaines séquences n'ont pas pu être alignées (cellules grises).

d'autres ont moins de 200pb de recouvrement (cellules avec pourcentage grisé).

#	Accession	Code	Termite	nb	Brookhaven
1	-	ProTer-Hs	<i>Hodotermopsis sjostedti</i>	Gut	1095
2	AB089071	Rs-Q42	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	1299
3	AB198446	RsW01-005	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	1337
4	AB198453	RsW01-014	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	1336
5	AB198455	RsW01-017	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	1336
6	AB198463	RsW01-027	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	1334
7	AB198477	RsW01-044	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	427
8	AB198478	RsW01-046	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	1336
9	AB198480	RsW01-051	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	704
10	AB198487	RsW01-059	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	703
11	AB198495	RsW01-068	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	674
12	AB198497	RsW01-070	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	1336
13	AB198503	RsW01-079	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	598
14	AB198509	RsW01-086	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	528
15	AB198517	RsW02-016	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	417
16	AB198522	RsW02-032	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	417
17	AB198543	RsW02-072	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	417
18	AB198549	RsW02-081	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	432
19	AB198557	RsW02-097	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	417
20	AB198569	RsW02-120	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	417
21	AB198571	RsW02-123	<i>Reticulitermes speratus</i>	Gut	420
22	-	ProTer-Rs	<i>Reticulitermes santonensis</i>	Gut	1034
23	-	ProTer-Pc	<i>Prorhinotermes canalifrons</i>	Gut	1118
24	AB288888	BOf2-16	<i>Odontotermes formosanus</i>	Gut	1337
25	-	ProTer-Ps	<i>Pseudacanthothermes spiniger</i>	Gut	1103
26	-	ProTer-Pm	<i>Pseudacanthothermes militaris</i>	Gut	1106
27	-	ProTer-Ts	<i>Trinervitermes sp.</i>	Gut	1139
28	-	ProTer-NI	<i>Nasutitermes lujae</i>	Gut	1107
29	AB277946	Nt-A8	<i>Nasutitermes takasagoensis</i>	Gut	515
30	AB277947	Nt-A44	<i>Nasutitermes takasagoensis</i>	Gut	509
31	AB277965	Nt-O88	<i>Nasutitermes takasagoensis</i>	Gut	515
32	EU086962	Ncos3	<i>Nasutitermes costalis</i>	Gut	325
33	EU086963	Ncos4	<i>Nasutitermes costalis</i>	Gut	331
34	EU086967	Ncos8	<i>Nasutitermes costalis</i>	Gut	331
35	DQ347928	TD19	<i>Cubitermes niokoloensis</i>	Gut	696
36	DQ347943	TD47	<i>Cubitermes niokoloensis</i>	Gut	1434
37	AY387300	7317	<i>Cubitermes spp.</i>	Mound	1066
38	DQ347849	AB-Mi7	<i>Cubitermes niokoloensis</i>	Mound	708
39	DQ347868	MI34	<i>Cubitermes niokoloensis</i>	Mound	1438
40	DQ347879	AB-Mi56	<i>Cubitermes niokoloensis</i>	Mound	707
41	DQ347885	AB-Mi72	<i>Cubitermes niokoloensis</i>	Mound	1445
42	DQ347886	AB-Mi79	<i>Cubitermes niokoloensis</i>	Mound	1434

Figure C-19 | Pourcentages de similarité moyens entre les séquences de propionibactéries isolées chez les termites et les différents genres de *Propionibacterineae*

Tableau C-4 (suite) | Pourcentages de similarité entre les séquences de propionibactéries isolées chez les termites.

Il existe cependant des exceptions à ces tendances générales. Trois séquences issues de l'intestin de *Reticulitermes speratus* (RsW01-005, RsW01-027 et RsW01-070) se démarquent des autres séquences du genre. Ainsi, le clone RsW01-005 est génétiquement plus proche du clone Nt-A44 découvert chez le terme *Nasutitermes takasagoensis* (Id= 97,8%). De même, au sein du genre *Nasutitermes*, il existe deux groupes de séquences, certaines sont présentes dans toutes les espèces (ProTer-N1, Nt-A44, Ncos3, Ncos4 et Ncos8) alors que d'autres (Nt-A088 et Nt-A8) se rattachent (Idmoy=96,0%) à la séquence issue de *Trinervitermes sp.*, un autre *Nasutitermitinae* (ProTer-Ts).

Les séquences issues du tube digestif de terme (>1000pb) ont été ensuite comparée à des séquences représentatives de chaque genre du sous-ordre des *Propionibacterinae* (cf. Figure C-19). Pour la quasi-totalité des séquences analysées, le genre le plus proche génétiquement est *Brooklawnia* (Id moy=94,0%*), suivi par *Luteococcus* (Id moy=93,8%*). Les autres genres ont une similarité inférieure à 92,5%*. (* Id moy calculé sans les séquences de RsW01-027 et RsW01-070). Les séquences des clones RsW01-027 et RsW01-070 se rattachent toutefois à d'autres genres connus que sont, respectivement, *Propionicimonas* (Id moy=95,6%) et *Propionicicella* (Id moy=97,5%).

Analyse phylogénétique des propionibactéries de termes.

Les analyses phylogénétiques par Neighbor-Joining (Figure C-20) ou Maximum de Parcimonie (non montré ici) nous donnent la même représentation des séquences étudiées. Excepté RsW01-027 et RsW01-070, toutes les séquences définies par amplification spécifique se regroupent dans un même clade (A) monophylétique avec celles issues du tube digestif des termes. Ce clade est soutenu par une valeur de bootstrap de 50% (NJ), et ce malgré la variabilité génétique des séquences qui le composent. Trois sous-clades peuvent ensuite être différenciés : A1 (bootstrap=100%) qui regroupe la majorité des séquences issues de *Reticulitermes*, plus une d'*Hodotermopsis sjoestedti*, A2 (bootstrap=73%) qui regroupe les séquences issues des termes champignonnistes, A3 (bootstrap=56%) qui regroupe les séquences issues uniquement des termes *Nasutitermitinae*.

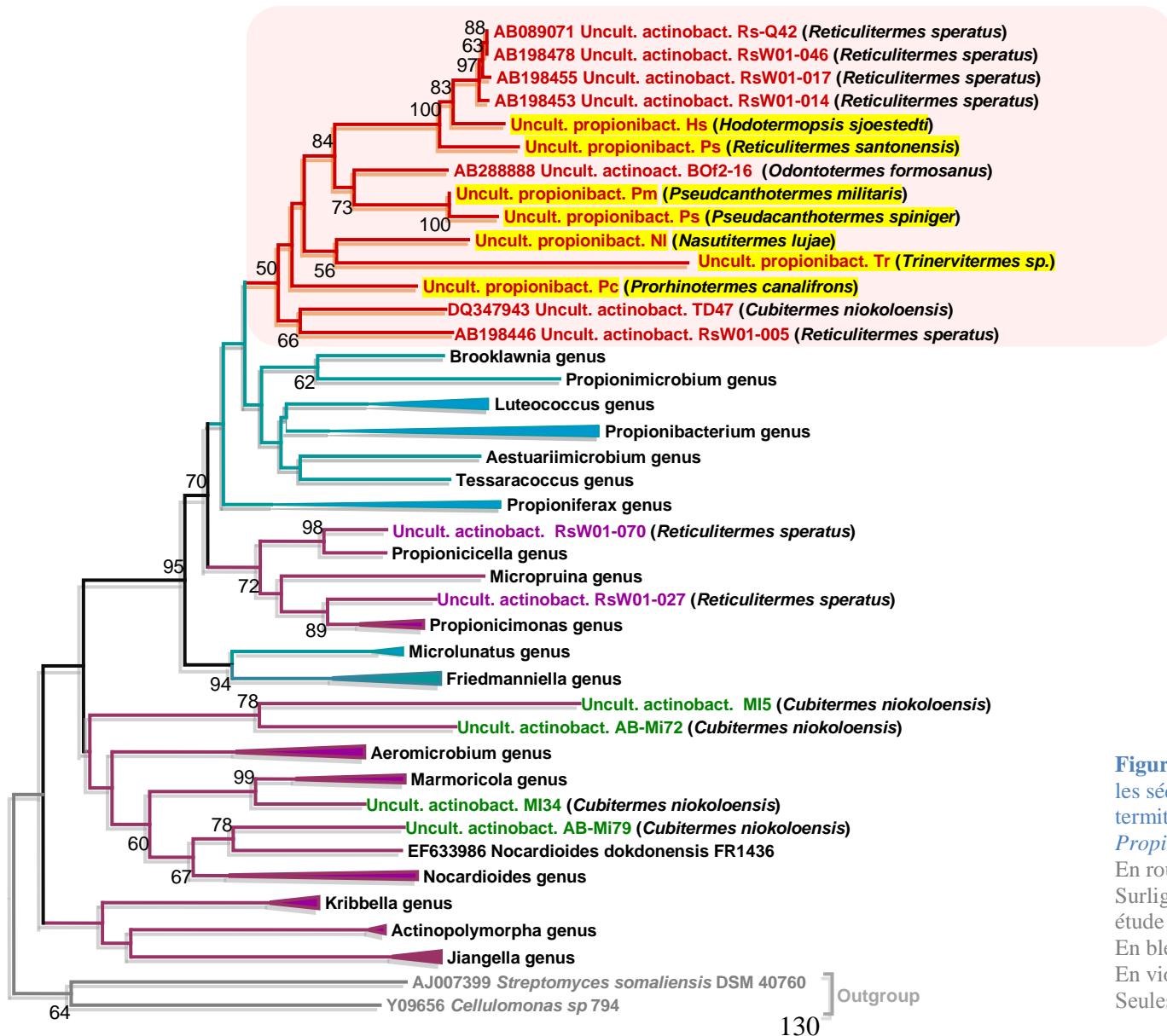


Figure C-20 | Arbre phylogénétique (NJ) comparant les séquences de propionibactéries isolées chez les termites par rapport aux autres genres de *Propionibacterineae*.

En rouge : les séquences issues des termites
 Surligné en jaune : les séquences obtenues dans cette étude par amplification spécifique
 En bleu : les genres de *Propionibacteriaceae*
 En violet : les genres de *Nocardioidaceae*
 Seules les valeurs de Bootstrap $\geq 50\%$ ont été notées

Par rapport aux différents genres connus de *Propionibacterinae*, le clade A se place clairement parmi la famille des *Propionibacteriaceae* mais ne s'inclut dans aucun genre connu. En revanche, il est intéressant de noter que toutes les autres séquences provenant des termites (intestin et nid) appartiennent à la famille des *Nocardiaceae*. Ainsi, les séquences des clones RsW01-027 et RsW01-070 se regroupent avec les genres respectifs *Propionicimonas* (bootstrap=89%) et *Propionicicella* (bootstrap=98%). Concernant les séquences issues des nids de *Cubitermes niokoloensis*, le clone AB-Mi79 correspond à un *Nocardioides sp* (bootstrap=78%), le clone Mi34 à un *Marmoricola sp* (bootstrap=99%), et les clones Mi5 et AB-Mi72 se regroupent dans le clade B (bootstrap=78%) qui ne correspond à aucun genre connu.

C-V-3/ Discussions.

Un nouveau genre de Propionibacteriaceae spécifique aux termites?

L'objectif de cette étude était premièrement de replacer les séquences de propionibactéries découvertes chez les termites par rapport aux différents genres connus du sous-ordre de *Propionibacterianeae*. La comparaison de ces séquences et leur analyse phylogénétique montrent clairement que les propionibactéries issues de la panse des termites forment un groupe monophylétique. Ceci a déjà été noté chez les isoptères puisqu'il existe des groupes associées spécifiquement aux termites dans 12 autres phyla bactériens (Hongoh *et al.* 2006).

Le clade A se sépare nettement des autres genres du sous-ordre malgré une valeur de bootstrap peu élevée (50%). Cette robustesse statistique modérée s'explique par la diversité génétique observée à l'intérieur du clade. Celui-ci regroupe en effet des séquences très éloignées entre-elles pouvant atteindre des pourcentages de similarité très bas (séquence issues de *Trinervitermes sp.* par exemple, $Id < 88\%$), et parfois même inférieurs à ceux observés avec les autres genres ($87\% < Id < 95\%$). Ce type de divergence intra-générique, pouvant dépasser la divergence inter-générique, n'est pourtant pas inédit, le même phénomène existe chez les espèces de *Propionibacterium spp.* (Stackebrandt & Schaal 2006). En réalité, la différence entre les phyla se réalise d'avantage sur des "signatures nucléotidiques" constituées de parties de séquences exclusives au genre ou à la famille (Stackebrandt *et al.* 1997).

D'après l'analyse phylogénétique, le clade A appartient clairement à la famille des *Propionibacteriaceae*, mais ne correspond finalement à aucun genre connu. Les

actinomycètes les plus proches génétiquement sont des espèces de *Brooklawnia* (Bae et al. 2006) et à un moindre degré de *Luteococcus* (Tamura et al. 1994). On retrouve cependant des séquences relatives aux *Nocardiaceae* provenant généralement de l'environnement (nid) des termites mais également du tube digestif (TD19, RsW01-027 et RsW01-070). Ces deux dernières séquences sont incluses dans des genres connues (*Propionicimonas* et *Propionicicella*, respectivement). Elles ne sont pas spécifiques aux termites, contrairement aux séquences composant le clade A. Leur origine est certainement allochtone et leur présence dans le tube digestif temporaire. Cette hypothèse est confortée par le clone TD19 qui est à la fois détectée dans le tube digestif et dans les parois de termitière de *Cubitermes niokoloensis*.

Le clade A semble donc suffisamment singulier pour pouvoir être considéré taxonomiquement comme un nouveau genre actinobactérien spécifique aux termites. Phylogénétiquement, il s'agit d'un clade qui s'isole à un degré similaire aux autres genres. Et biologiquement, ces propionibactéries se distinguent par leur association exclusive avec les termites et leur localisation particulière sur les parois de leur panse (Nakajima et al. 2005). La définition d'un nouveau genre implique néanmoins la caractérisation physiologique de ces représentants. Dans la classification du vivant, il existe pourtant, des phyla bactériens -"candidate phyla" (Rappé & Giovannoni 2003)- définis taxonomiquement sans même en connaître des cultivables (ex : "TG1" Ohkuma et al. 2007). Le cas des propionibactéries spécifiques des termites mériterait peut-être plus d'approfondissement mais force est de constater qu'il tend à prendre une place distincte dans la classification taxonomique.

Une spécificité pour toutes les espèces de termites étudiées

La deuxième partie de l'étude consistait à vérifier la présence des propionibactéries chez différentes espèces de termites et de discuter de leurs possibles relations évolutives. Sur les 8 espèces de termites étudiées, nous avons montré que toutes abritent des populations propionibactériennes du clade A dans leur intestin postérieur. Que ces termites aient gardé des caractères primitifs (*Hodotermopsis sjoestedti*) ou soit plus évolués, et quel que soit leur régime alimentaire - champignonnistes (*Pseudacanthotermes spiniger*, *P. militaris*, *Odontotermes formosanus*), humivores (*Cubitermes niokoloensis*), xylophages (*Reticulitermes speratus*, *R. santonensis*, *Prorhinotermes canalifrons*, *Nasutitermes lujae*, *N. voeltzkowi*) ou herbivores (*Trinervitermes sp.*) -, les propionibactéries du clade A forment une composante constante de la microflore procaryotique intestinal. Cette constatation permet de formuler deux suppositions :

- Premièrement, la présence des propionibactéries chez une espèce plésiomorphe telle que *Hodotermopsis sjoestedti* suggère que l'association entre celles-ci et les termites pourrait être très ancienne. Ceci pourrait d'ailleurs expliquer les fortes divergences génétique entre certaines séquences (Id<88%).

- Deuxièmement, et du fait que les propionibactéries se répartissent chez tous les termites étudiés, celles-ci sembleraient avoir un rôle essentiel (ou obligatoire) pour le terme, indépendamment du régime alimentaire adopté. Autrement-dit, ces actinomycètes pourraient ne pas intervenir que dans la dégradation directe de la matière lignocellulosique mais aussi dans la gestion de l'azote, la transformation des produits de fermentation, le transfert d'électrons, etc (Brune 2006). A ce stade de l'étude et en l'absence de souches cultivées, cette question ne peut cependant être résolu.

L'étude phylogénétique nous montre, d'autre part, qu'il existe à l'intérieur du clade A des sous-regroupements monophylétiques correspondant aux sous-familles de termites *Macrotermitinae* et *Nasutitermitinae* (A2 et A3). Ces arrangements de séquences pourraient suggérer un schéma d'évolution conjointe des propionibactéries liée avec celle des termites, voire de co-spéciation. Pourtant, pour les autres espèces et notamment parmi les termites dits "inférieurs", les séquences sont mélangées par rapport à leur origine (A1) et ne coïncide donc pas avec la classification des isoptères. De manière globale, il n'y a pas de congruence entre les arbres phylogénétiques des propionibactéries et des hôtes. Un cas relativement similaire a bien été décrit pour les spirochètes issus du tube digestif des termites (Lilburn et al. 1999). En réalité, il en est de même pour la majorité des lignées bactériennes du tube digestif des termites (Ohkuma et al. 2002 ; Shinzato et al. 2005 ; Hongoh et al. 2005 ; Herlemann et al. 2007) à l'exception notable des groupes bactériens relatifs aux fibrobactéries et au phylum TG3 (Hongoh et al. 2006). Pour la plupart des communautés bactériennes spécifiques aux termites, y compris celle des propionibactéries, la question se pose alors de leur transmission entre congénères et entre générations de termites. Pour comparaison, l'exemple le plus connu est celui des termites champignonnistes (*Macrotermitinae*) et de leur association symbiotique avec le champignon *Termitomyces* où la transmission est majoritairement verticale (quasi héréditaire) et parfois horizontale (Rouland-Lefèvre et al. 2006). Pourtant, le scénario semble différent pour les lignées bactériennes où les modes de transmission entre individus seraient, comme les protistes, plutôt horizontaux (Hongoh et al. 2005) (acquisition par coprophagie ou par trophalaxie proctodéale?) Mais les mécanismes sont encore inconnus et mériteraient des investigations approfondies (les reproducteurs sont-ils porteurs des propionibactéries ?).

Limites et perspectives

Par la technique de clonage-séquençage, plusieurs formes de propionibactéries ont été décelées au sein d'une même colonie de termites -voire d'un même individu-, aussi bien chez *Reticulitermes speratus* (Nakajima et al. 2005) que chez *Nasutitermes takasagoensis* (Miyata et al. 2007). Et bien que la majorité des séquences soient identiques, certaines se distinguent nettement (Id<93% pour RsW01-005, par exemple). Par la technique de DGGE, nous avons pu mettre en évidence la présence de 2 à 3 phylotypes chez les espèces de *Nasutitermes spp* étudiées (Partie A). Une espèce de terme garderait ainsi plusieurs souches de propionibactéries dans son intestin. Il est possible que notre étude, basée sur le séquençage direct des produits des PCR spécifiques, n'ait pas permis l'identification de toutes les propionibactéries du tube digestif, la réalisation de clonages pourrait utilement compléter ces données.

Il serait également intéressant d'étendre l'échantillonnage à d'autres espèces de termites dont des formes plus primitives comme *Mastotermes darwiniensis*, ou même à des proches cousins tel que *Cryptocercus sp.*. Afin de mieux comprendre l'histoire évolutive des propionibactéries en relation avec leur hôte et de donner une vision plus détaillée de ce phylum spécifique aux termites.

C-VI/ Conclusion générale sur les propionibactéries de termites.

L'étude phylogénétique des séquences obtenues par PCR spécifique nous a permis de mettre en évidence que les propionibactéries liées au tube digestif des termites forme un groupe monophylétique, réparti chez toutes les espèces d'isoptères étudiées quelle que soit leur place taxonomique. Ce groupe fait partie de la famille des *Propionibacteriaceae* mais se différencie clairement des genres connus. Au regard de sa position phylogénétique, il pourrait être considéré comme un nouveau genre d'actinomycète. Les genres les plus proches sont *Brooklawnia* et *Luteococcus*.

Les travaux de Nakajima *et al.* (2005) ont montré que d'importantes populations de propionibactéries se répartissent sur les parois de la panse de leur hôte. Ces formes n'ont cependant jamais été cultivées et, par conséquent, leur physiologie et leur rôle dans le métabolisme des termites restent encore ignorés. Nos tentatives d'isolement à partir de milieux spécifiques (PASM liquide) ne nous ont pas non plus permis de cultiver ces propionibactéries. La raison principale en est l'utilisation de milieux propres à l'isolement des

Propionibacterium spp qui apparaissent finalement comme éloignés phylogénétiquement des propionibactéries spécifiques aux termites.

De façon générale, il est difficile de cultiver les bactéries qui vivent dans des environnements complexes très particuliers et, qui plus est, lorsque des relations de mutualisme voire de symbiose existent avec un hôte. Malgré l'ambition d'un tel projet, plusieurs éléments nous permettent d'envisager d'autres pistes avec un réel espoir de succès :

- Bien que les séquences issues des termites forment un groupe phylétique isolé, les genres génétiquement proches comme *Brooklawnia* et *Luteococcus* contiennent des espèces déjà isolées sur boîte de Pétri. En nous appuyant sur les milieux de culture utilisés pour ces isolements, nous pourrions augmenter nos chances de succès.
- D'après la littérature (Stackebrandt & Schaal 2006 ; Bae et al. 2006), ces différents genres ont en commun d'être "anaérobiques facultatifs", "catalase positif" et incapables de réduire le nitrate. Le principal facteur à tester est donc la culture en absence d'oxygène. Néanmoins, la technique de PW-PCR nous permettrait d'expérimenter simultanément et en combinaison d'autres facteurs comme l'acidité, l'apport d'antibiotique ou la quantité et la nature des nutriments.
- Un autre axe de recherche, récemment développé par Fröhlich et König (2000), consisterait à isoler individuellement les propionibactéries directement à partir du tube digestif des termites. Cette technique originale est dérivée des procédés de micromanipulation (Bactotip method, laser manipulation, optical tweezers). Elle permet d'extraire manuellement des cellules uniques de la colonie de microorganismes ciblés et de les cultiver en microplaques. Ceci permet d'éliminer les inhibitions dues aux phénomènes d'antibiose ou à l'agglomération des cellules entre elles. Par ailleurs, cette technique a été mise au point pour des symbiontes du tube digestif des termites (*Acidobacteria* et *Verrocomicrobia* chez *Reticulitermes flavipes*), elle pourrait donc s'appliquer aux propionibactéries de termites d'autant que leur localisation sur la panse de l'hôte est connue.
- Enfin, les travaux de Hongoh et al. (2008) suggèrent qu'en utilisant des techniques de micromanipulation, l'isolement des symbiontes n'est plus nécessaire. Cette équipe a ainsi pu montrer le rôle des bactéries du phylum TG1, symbiontes intracellulaires des protistes associés aux termites, dans l'apport de composés azotés. En cas de nouvel échec des tentatives de culture, ce pourrait être un moyen de clarifier le rôle joué par les propionibactéries dans la panse des termites.

Discussion-Conclusion





Discussion générale

Conclusion

Depuis les premières découvertes de Hungate en 1946 ou les premières observations en microscopie électroniques à la fin des années 70 (Breznak & Pankratz 1977 ; Bignell 1979 ; Bignell et al. 1980 ; Brauman 1983), nous savons qu'il existe dans le tube digestif des termites une microflore actinobactérienne non-négligeable. Pourtant, et malgré plusieurs études sur cette microflore, sa composition exacte n'a jamais pu être clairement identifiée et son rôle reste encore peu connu. Nos travaux ont permis, pour la première fois, de réaliser un inventaire des communautés actinobactériennes présentes dans la panse des termites du genre *Nasutitermes*. Combinant les techniques de microbiologie conventionnelle avec les techniques moléculaires, indépendantes de la culture, nous avons pu examiner la nature des interactions biologiques entre les actinomycètes et les termites. Si certains actinomycètes sont spécifiques à leur hôte, d'autres entretiennent des relations moins étroites, d'origine exogène, juste de passage ou se développant temporairement dans le tube digestif. Dans cette dernière partie, nous présentons un bilan détaillé des différentes associations pouvant exister entre les termites et les actinomycètes.

I/ Diversité des actinomycètes identifiés à partir du tube digestif des termites.

I-1/ Inventaire

Toutes approches confondues, 93 séquences réparties dans 14 groupes phylétiques actinobactériens ont été identifiés au cours de cette étude. Ces séquences ont été comparées aux 89 séquences d'actinomycètes disponibles dans les banques de données (RDPII) trouvés dans la termitosphère étendue de l'intestin (plus de la moitié) au milieu environnant. Toutes ces séquences ont été ordonnées phylogénétiquement par rapport à 368 séquences représentant tous les genres et toutes les familles d'actinobactéries connus (Figure D-1).

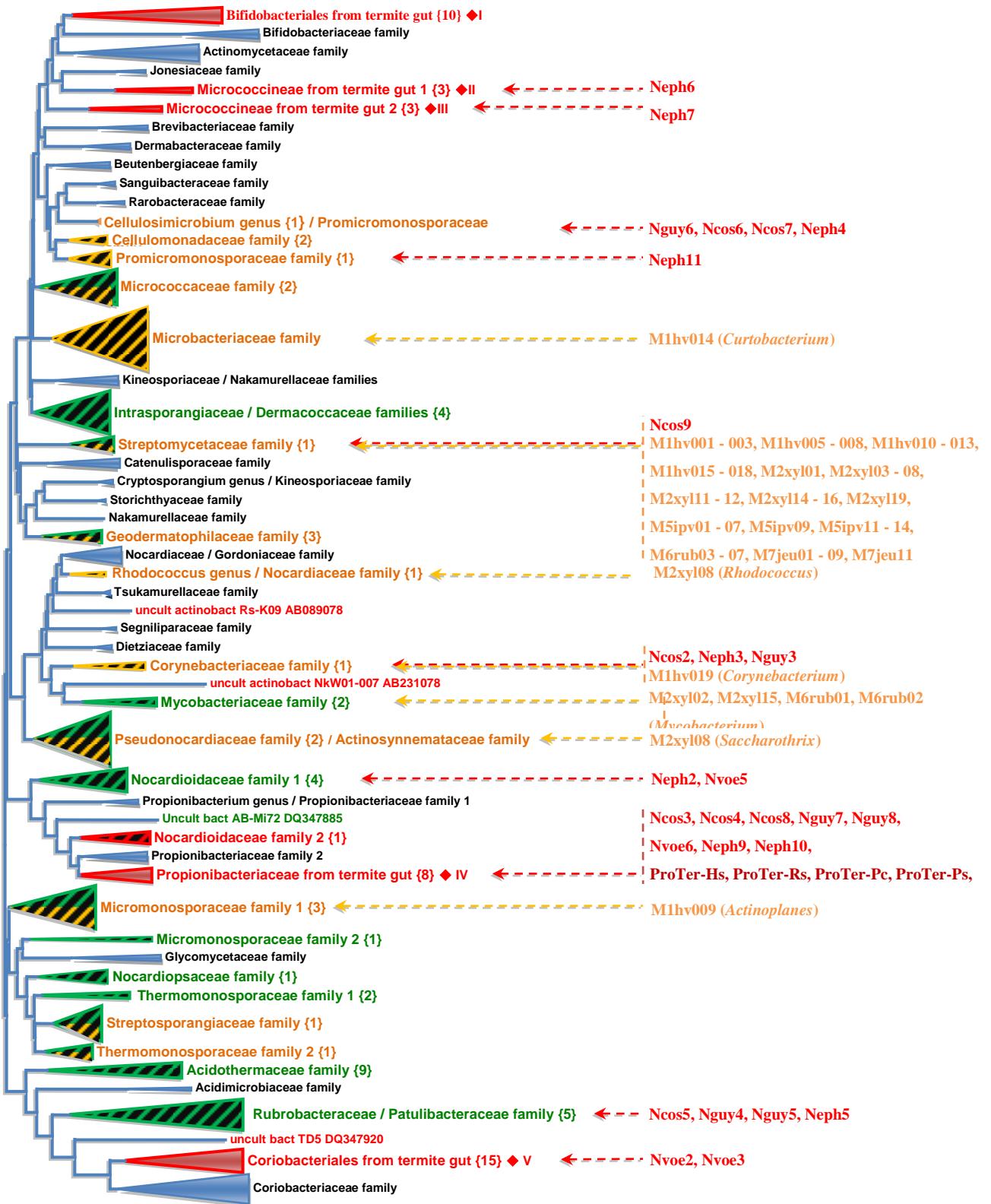


Figure D-1 Positionnement des séquences et des isolats actinobactériens découverts dans cette étude (à droite) par rapport à l'arbre phylogénétique (NJ) représentant les familles d'actinobactéries contenant des représentants (isolats ou clones) issues de la termitosphère (tube digestif et environnement proche) (à gauche).

En rouge : les actinomycètes découverts à partir du tube digestif des termites par une approche moléculaire ; En orange : *idem* pour des souches isolées ; En vert : les actinomycètes issus de l'environnement proche (termitière) ; En bleu : les autres familles d'actinomycètes. Les triangles hachurés indiquent la présence de séquences environnementales mélangées avec les séquences issues des termites.

Parmi les 48 familles que compte le phylum des actinobactéries, la moitié (24) comprend des séquences relatives aux termites. Cependant, une partie d'entre elles (6) ont été isolées exclusivement à partir de la microflore externe (termitière, sol environnant). La majorité des familles (18) contiennent (à différents degrés) des clones ou des souches isolées à partir du tube digestif. Dix de ces 18 familles -*Nocardiaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Micromonosporaceae*, *Microbacteriaceae*, *Geodermatophilaceae*, *Micrococcaceae*, *Actinomysnemataceae*, *Thermonosporaceae*, *Mycobacteriaceae* et *Streptorangiaceae*- ne sont représentées que par des isolats de culture. Ces séquences sont toutes génétiquement proches d'isolats déjà connus. Quatre familles contiennent à la fois des isolats de culture et des clones : *Corynabacteriaceae*, *Streptomycetaceae*, *Cellulomonadaceae* et *Promicromonosporaceae*. Finalement, seuls 5 groupes de séquences (marquées dans la figure par un losange ♦), obtenues uniquement par les techniques indépendante de la culture, apparaissent clairement séparés des phylotypes environnementaux identifiés par la culture. Quatre de ces groupements phylogénétiques (I, II, III, V) ne s'apparentent solidement à aucune des familles d'actinobactéries. Le clade V, le plus important numériquement, correspond à l'ordre des *Coriobacteriales*, ses plus proches voisins étant des bactéries intestinales –telles que *Eggerthella spp*- retrouvées également chez des espèces bovines ainsi que chez l'Homme. Il comprend des séquences issues de divers termites, des plus primitifs aux plus évolués. Les clades I, II, III sont plus difficiles à classer ; ils semblent appartenir au vaste sous-ordre des *Micrococcineae* bien que le groupe I se rapproche également des bifidobactéries. Ce dernier clade présente de nombreuses séquences mais qui ne proviennent que de termites *Rhinotermitidae*, alors que les autres semblent plus répandues chez les isoptères. Enfin, Le clade IV s'apparente clairement au sous-ordre des *Propionibacterineae* et formerait un nouveau genre assez basal dans la famille des *Propionibacteriaceae* (cf. partie C). Il est parmi les plus représentés avec des séquences issues de termites “inférieurs” ou “supérieurs”, humivores, xylophages ou même champignonnistes.

I-2/ Deux méthodes (moléculaire et microbiologique) pour deux visions.

L'inventaire des actinomycètes identifiés à partir du tube digestif des termites montre clairement l'écart existant entre les résultats obtenus par les méthodes microbiologiques conventionnelles (isolement en milieu de culture) et ceux obtenus par les méthodes de biologie moléculaire (PCR, criblage par des techniques d'électrophorèse et/ou de clonage, et séquençage de l'ADNr 16s).

Les séquences détectées par les techniques moléculaires nous donnent une image plus complète et plus fidèle de la diversité réelle. Elles reflètent les communautés actinomycétales présentes à plus de 1% dans l'échantillon étudié. Pour nos études, nous avons encore amélioré cette représentativité par l'utilisation de la nested PCR (Heuer et al. 1997). Il en résulte que la plupart des séquences détectées se regroupent de façon récurrente dans les mêmes assemblages phylogénétiques (clades I à V). Cette récurrence indique que les techniques moléculaires donnent une représentation non biaisée de la réalité.

A l'inverse, les souches détectées en microbiologie se répartissent inégalement dans les nombreuses familles actinomycétales. Comme le remarquent Kurtböke et ses collaborateurs (2007), les isolats du tube digestif des termites sont semblables à ceux découverts généralement à partir du sol. Bien sûr, cette constatation met en évidence les biais inhérents aux techniques de culture. Elle interroge aussi sur la réelle représentativité de la diversité des cultivables. Le problème de l'isolement des symbiontes vient surtout de la difficulté à reproduire l'environnement où ils se développent, et en particulier les interactions qui peuvent exister avec les autres microorganismes ou avec l'hôte (échange chimique, habitat) (cf partie B et C). Ainsi, la plupart des procaryotes isolés sont aérobies ou anaérobies facultatives alors que l'environnement intestinal est majoritairement anaérobie et donc propice aux fermenteurs. Seuls quelques isolats bactériens ont été trouvés uniquement dans le tube digestif des termites (Brune 2006) et peuvent être considérés comme spécifiques aux termites. Les autres, ubiquistes dans la nature, seraient plutôt issus de l'environnement extérieur (*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, etc). Les isolats bactériens seraient plutôt issus de la microflore de passage, la culture donnerait donc une représentation fortement biaisée de la diversité du milieu naturel.

II/ Spécificité et nature des interactions biologiques entre les termites et les actinomycètes.

Si les techniques moléculaires et microbiologiques sont différentes, elles n'en sont pas moins complémentaires. La combinaison des deux techniques a permis au cours de notre étude de discriminer la microflore spécifique et endogène de la microflore exogène semi-permanente ou de passage.

II-1/ Spécificité et origine endogène ou exogène des actinomycètes du tube digestif des termites.

La première partie de notre étude (cf. Partie A) a permis de déterminer les communautés actinobactériennes spécifiques au tube digestif des termites du genre *Nasutitermes*. Ces actinomycètes sont donc présents uniquement chez les termites et forment donc des groupes monophylétiques. Dans notre étude, seuls 5 groupes phylétiques correspondent à cette définition (Figure D-1) et bien qu'on ne connaisse pas leur rôle dans l'intestin des termites, on peut suggérer qu'ils rassemblent les seuls actinomycètes réellement spécifiques aux termites.

Le terme “spécificité” peut aussi se rapporter à une origine endogène des microorganismes, en opposition à une origine exogène. C'est pourquoi nous avons conçu une série d'expérience visant à éliminer les populations actinobactériennes provenant de la nourriture ingérée. Nos résultats montrent clairement que les communautés intestinales restent stables quel que soit le type d'alimentation et qu'elles se différencient fortement de celles du bois consommé. Cependant, il nous est apparu au cours de cette étude que les actinomycètes stables, appartenant aux familles *Cellulomonadaceae*, *Promicromonosporaceae*, *Corynebacteriaceae* et *Streptomycetaceae*, pourraient quand même être d'origine exogène. Cette hypothèse est soutenue par le fait que ces actinomycètes sont fréquents dans les milieux côtoyés par les termites (sol, bois, litière, etc.).

II-2/ Une microflore permanente, semi-permanente ou transitoire.

L'idée serait donc que seuls les 5 clades actinobactériens exclusifs aux termites représentent la microflore fixée de la panse. Cette idée est supportée par les études de localisation *in situ* par fluorescence (Nakajima et al. 2005) qui montre que les propionibactéries du clade IV colonisent les parois de la panse de *Reticulitermes speratus*. Cependant, il existerait aussi une microflore d'origine exogène qui pourrait se maintenir dans la panse des termites même après une période de jeûne. Ces actinomycètes qui se caractérisent par leurs capacités à dégrader les composés lignocellulosiques (cf. les 4 familles citées plus haut, McCarthy 1987), seraient maintenus et même développés dans la panse des ouvriers de *Nasutitermes* après leur recrutement dans l'environnement proche. Cette hypothèse est celle de Bignell (2000) qui observe des filaments actinobactériens retenus au niveau de structures secondaires (épines cuticulaires) de la panse. En plus de cette microflore semi-permanente, il

existerait une grande gamme d'actinobactéries qui ne seraient qu'en transit dans le tube digestif des termites, sous formes de spores, amenés et transportés dans le bol alimentaire. La diversité des cultivables rendraient compte de cette microflore de passage.

II-3/ La nature des interactions biologiques.

Il existe plusieurs catégories d'interactions biologiques : la symbiose, le mutualisme, le commensalisme, le parasitisme, l'amensalisme, la phorésie, etc. La question ici est de savoir si la relation actinomycètes / termites est une vraie symbiose. Sans connaître la fonction qu'occupent ces actinomycètes dans l'intestin des termites, il est difficile de répondre. Cependant la monophylétie de certains groupes indique une association obligatoire (ces actinomycètes ne pouvant vivre en dehors de leur hôte) et peut-être la possibilité d'une évolution conjointe. Dans ce cas, il pourrait y avoir symbiose. Pour les espèces semi-permanentes, en revanche, l'association n'étant pas obligatoire, l'interaction serait plutôt de type mutualiste ou commensal. Les termites pourraient s'adapter aux ressources alimentaires d'un biotope particulier en intégrant dans leur microflore digestive et en activant des actinomycètes environnementaux. Ces bactéries pourraient aussi, en opportunistes, profiter du milieu favorable offert par l'intestin des termites sans pour autant leur apporter un quelconque bénéfice. Enfin, le parasitisme ne peut être totalement exclu mais cette hypothèse semble la moins probable, du fait que les termites élevés ne semblent pas perturber par leur présence dans l'intestin.

II-4/ Degré de spécificité et transmission entre congénères.

En se focalisant sur les propionibactéries spécifiques aux termites, nous avons montré que le degré de spécificité par rapport à l'hôte n'est pas très élevé. En effet, il n'y a pas de congruence entre les lignées de termites et celles de propionibactéries. C'est d'ailleurs le cas pour la majorité des bactéries symbiontes du tube digestif des termites (Hongoh et al. 2005). Les différents patterns de spécificité plus ou moins élevée entre les deux partenaires d'une symbiose ont été détaillés par Aanen et ses collaborateurs (2007) dans le cas de la relation *Macrotermitineae* / *Termitomyces*. Pour les propionibactéries, le degré de spécificité est plus faible et l'association serait donc moins stricte. Cela serait dû au mode de transmission. Alors que chez les termites champignonnistes la transmission est plutôt verticale (transporté par les reproducteurs ailés), la microflore actinobactérienne serait transmise horizontalement par trophallaxie proctodéale ou coprophagie.

III/ Perspectives et applications.

Notre étude s'est confrontée à plusieurs difficultés techniques, notamment dans nos tentatives d'isolement des actinomycètes spécifiques aux termites. Comme décrit à la fin des parties B et C, de nouvelles pistes de recherches sont encore à exploiter. Certaines sont innovantes (PW-PCR, Bactotip méthode, séquençage complet du génome) et mériteraient d'être développées. L'isolement des symbiontes est la véritable finalité de ce genre d'étude. Seule la culture peut permettre de définir leur rôle dans l'intestin des termites et de les caractériser. Mais plus qu'une simple compréhension fondamentale des mécanismes inhérents à la microflore digestive des termites, elle permettrait également de concevoir des applications en particulier en biotechnologie. Isoler des souches spécifiques aux termites pourrait permettre de muter ces bactéries pour aider à la lutte contre les termites invasifs (Husseneder et al. 2002 ; Kuzina et al. 2002 ; Watanabe et al. 2000). La caractérisation des potentialités enzymatiques de ces souches originales pourraient conduire à leur utilisation dans les industries de recyclage ou de production de biocarburants (Warnecke et al. 2007 ; Brune 2007).

Références bibliographiques

- Aanen DK, Eggleton P, Rouland-Lefevre C, Guldberg-Froslev T, Rosendahl S, Boomsma JJ (2002) The evolution of fungus-growing termites and their mutualistic fungal symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14887-14892.
- Aanen DK, Ros VI, de Fine Licht HH, Mitchell J, de Beer ZW, Slippers B, Rouland-Lefevre C, Boomsma JJ (2007) Patterns of interaction specificity of fungus-growing termites and *Termitomyces* symbionts in South Africa. *BMC Evol Biol* **7**: 115
- Abe T (1987) Evolution of life types in termites. In: *Evolution and Coadaptation in Biotic Communities* (Eds: Kawano S, Connell JH, Hidaka T),. University of Tokyo Press, Tokyo. pp. 125–148
- Aisaka K, Uwajima T (1987) Production of neuraminidase by *Micromonospora viridifaciens*. *FEMS Microbiol Lett* **44**: 289-291
- Ashelford KE, Weightman AJ, Fry JC (2002) PRIMROSE: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with the RDP-II database. *Nucleic Acids Research* **30**: 3481-3489
- Bae H-S, Moe WM, Yan J, Tiago I, da Costa MS, Rainey FA (2006) *Brooklawnia cerclae* gen. nov., sp. nov., a propionate-forming bacterium isolated from chlorosolvent-contaminated groundwater. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 1977-1983
- Bakalidou A, Kampfer P, Berchtold M, Kuhnigk T, Wenzel M, Konig H (2002) *Cellulosimicrobium variabile* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the hindgut of the termite *Mastotermes darwiniensis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1185-1192
- Benz M, Schink B, Brune A (1998) Humic acid reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and other fermenting bacteria. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4507-4512
- Bignell DE (1994) Soil-feeding and gut morphology in higher termites In, Nourishment and evolution in insect societies. (Eds: Hunt JH, Nalepa CA) Westview Press, San Francisco. p.131-158.

- Bignell DE (2000). Introduction to symbiosis In: Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology (Eds: Abe T, Bignell D, Higashi M). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 189-208
- Bignell DE, Anderson JM & Crosse R (1991) Isolation of facultatively aerobic actinomycetes from the gut, parent soil and mound materials of the termites *Procubitermes abutiensis* and *Cubitermes severus*. *FEMS Microbiol Ecol* **85**: 151-160.
- Bignell DE, Anderson JM (1980). Determination of pH and oxygen status in the guts of lower and higher termites. *J Insect Physiol* **26**:183–188.
- Bignell DE, Eggleton P (1995) On the elevated intestinal pH of higher termites (Isoptera: Termitidae). *Insect Soc* **42**: 57-69
- Bignell DE, Oskarsson H, Anderson JM (1979) Association of Actinomycete-Like Bacteria with Soil-Feeding Termites (Termitidae, Termitinae). *Appl Environ Microbiol* **37**: 339-342
- Bignell DE, Oskarsson H, Anderson JM (1980) Distribution and abundance of bacteria in the gut of a soil-feeding termite *Procutiermes aburiensis* (Termitidae, Termitinae). *J Gen Microbiol* **117**: 393-403
- Bignell DE, Oskarsson H, Anderson JM, Ineson P (1983) Structure, microbial associations and function of the so-called “mixed segment” of the gut in two soil-feeding termites, *Procubitermes aburiensis* and *Cubitermes severus* (Termitidae, Termitinae). *J Zool* **201**:445–480.
- Bjørnvad ME, Hatakeyama M, Schulein M, Bjørnvad, Nielsen JB (2001) Endo-B-1,4-glucanases from *Saccharothrix*. US Patent 6207436
- Bordereau C, Clément J-L, Jequel M, Vieau F (2002) Termites. Biologie, lutte, réglementation. Europe, départements et territoires d'outre-mer français. Paris, France, Ctba, 208 p.
- Bougle D, Roland N, Lebeurrier F, Arhan P (1999) Effect of *propionibacteria* supplementation on fecal *bifidobacteria* and segmental colonic transit time in healthy human subjects. *Scand J Gastroenterol* **34**:144-148
- Brauman A (1983) Etude de la microflore hétérotrophe d'un terme supérieur *Nasutitermes arborum*. DEA UTC Compiègne 110 p.

- Brauman A, Dore J, Eggleton P, Bignell D, Breznak JA & Kane MD (2001) Molecular phylogenetic profiling of prokaryotic communities in guts of termites with different feeding habits. *FEMS Microbiol Ecol* **35**: 27-36.
- Brauman A, Kane MD, Labat M, Breznak JA (1992) Genesis of acetate and methane by gut bacteria of nutritionally diverse termites. *Science* **257**: 1384-1387
- Breznak JA (2000). Ecology of prokaryotic microbes in the guts of wood- and litter-feeding termites. In: *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology* (Eds: Abe T, Bignell D, Higashi M). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 209–231.
- Breznak JA (2002) A need to retrieve the not-yet-cultured majority. *Environ Microbiol* **4**: 4-5
- Breznak JA, Pankratz HS (1977) In situ morphology of the gut microbiota of wood-eating termites [*Reticulitermes flavipes* (Kollar) and *Coptotermes formosanus* Shiraki]. *Appl Environ Microbiol* **33**: 406-426
- Brugerolle G, Radek R. (2006). Symbiotic protozoa of termites. In: *Intestinal Microorganisms of Termites and Other Invertebrates* (Eds: Konig H, Varma A), Springer Berlin Heidelberg, pp.243-269
- Brune A (1998) Termite guts: the world's smallest bioreactors. *Trends Biotech* **16**: 16-21
- Brune A (2006) Symbiotic associations between termites and Prokaryotes. In *The Prokaryotes*, 3rd edn, Vol. 1: *Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology* (Eds: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H & Stackebrandt E), Springer, New York. pp. 439-474
- Brune A (2007) Microbiology: Woodworker's digest. *Nature* **450**: 487-488
- Brune A, Emerson D, Breznak J (1995) The termite gut microflora as an oxygen sink: microelectrode determination of oxygen and pH gradients in guts of lower and higher termites. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2681-2687
- Brune A, Friedrich M (2000) Microecology of the termite gut: structure and function on a microscale. *Curr Opin Microbiol* **3**: 263-269
- Brune A, Kuhl M (1996) pH Profiles of the extremely alkaline hindguts of soil-feeding termites (Isoptera: Termitidae) determined with microelectrodes. *J Insect Physiol* **2**: 1121-1127
- Brune A, Stingl U (2006) Prokaryotic symbionts of termite gut flagellates: phylogenetic and metabolic implications of a tripartite symbiosis In: *Molecular basis of symbiosis* (Ed: Overmann J), Springer pp. 39-60

- Bulina TI, Terekhova LP & Tyurin MV (1998) Use of electric pulses for selective isolation of actinomycetes from soil. *Microbiol* **67**: 459-462.
- Chung SY, Maeda M, Song E, Horikoshi K, Kudo T (1994) Isolation and characterization of a Gram-positive polychlorinated biphenyl-degrading bacterium, *Rhodococcus erythropolis* strain TA421, from a termite ecosystem. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**:2111–2113.
- Clément JL, Bagnères AG, Uva P, Wilfert L, Quintana A, Reinhard J, Dronnet S (2001) Biosystematics of Reticulitermes termites in Europe: morphological, chemical and molecular data. *Insect Soc* **48**: 202-215
- Cleveland LR (1925) The effects of oxygenation and starvation on the symbiosis between the termite, *Termopsis*, and its intestinal flagellates. *Biol Bull* **48**:309-326.
- Cleveland LR (1926) Symbiosis Among Animals with Special Reference to Termites and Their Intestinal Flagellates. *The Quarterly Review of Biology* **1**: 51
- Cleveland LR, Grimstone AV (1964) The fine structure of the flagellate Mixotricha paradoxa and its associated micro-organisms. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **159**:668–686.
- Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Bandela AM, Cardenas E, Garrity GM, Tiedje JM (2007) The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res* **35**: 169-172
- Cook AE, Meyers PR (2003) Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1907-1915
- Crosland MWJ, Chan LK, Buswell JA (1996). Symbiotic fungus and enzymatic digestion in the gut of the termite, *Macrotermes barneyi* (Light) (Isoptera: Termitidae). *J. Entomol. Sci.* **31**:132-137
- Cross T (1982) Actinomycetes: a continuing source of new metabolites. *Dev Ind Microbiol* **23**:1-18
- Czolij R, Slaytor M, O'Brien RW (1985) Bacterial flora of the mixed segment and the hindgut of the higher termite *Nasutitermes exitiosus* Hill (Termitidae, Nasutitermitinae). *Appl Environ Microbiol* **49**:1226–1236.

- Dari K, Bechet M, Blondeau R (1995) Isolation of soil *Streptomyces* strains capable of degrading humic acids and analysis of their peroxidase activity. *FEMS Microbiol Ecol* **16**:115–122.
- Davies RG, Eggleton P, Jones DT, Gathorne-Hardy FJ, Hernández LM (2003) Evolution of termite functional diversity: analysis and synthesis of local ecological and regional influences on local species richness. *J Biogeography* **30**: 847-877
- Davis KER, Joseph SJ & Janssen PH (2005) Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* **71**: 826-834.
- Donovan SE, Bignell DE (2001) Gut content analysis and a new feeding group classification of termites. *Ecol Entomol* **26**: 356-366
- Eggleton P (2000) Global patterns of termite diversity In: Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology (Eds: Abe T, Bignell D, Higashi M). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 25-52
- Eggleton P (2001) Termites and trees: a review of recent advances in termite phylogenetics. *Insect Soc* **48**: 187-193
- Eggleton P (2006) The termite gut: its evolution and co-evolution In: Intestinal Microorganisms of termites and other invertebrates (Eds: Konig H, Varma A), Springer Berlin Heidelberg, pp. 373-404
- Eggleton P, Bignell DE, Sands WA, Mawdsley NA, Lawton JH, Wood TG, Bignell NC (1996) The diversity, abundance and biomass of termites under differing levels of disturbance in the Mbalmayo forest reserve, southern Cameroon. *Phil Trans R Soc B Biol Sc* **351**: 51-68
- Eggleton P, Tayasu I (2001) Feeding groups, lifetypes and the global ecology of termites. *Ecol Res* **16**: 941-960
- El-Hagarawy IS, Slatter WL , Harper WJ, Gould IA (1954) Factors affecting the organic acid production of *propionibacteria* used in manufacture of Swiss cheese. *J Dairy Sc* **40**:579-587.
- El-Tarably KA & Sivasithamparam K (2006) Non-streptomycte actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol Biochem* **38**: 1505-1520.
- Embley TM, Stackebrandt E (1994) The molecular phylogeny and systematics of the Actinomycetes. *Ann Rev Microbiol* **48**: 257-289

- Emerson AE (1941) Phylogeny of the termites. *J. NY Ent. Soc.* **49**: 115-115.
- Emerson AE (1967) Cretaceous insects from Labrador 3. A new genus and species of termite (Isoptera: Hodotermitidae). *Psyche Cambridge* **74**: 276-289.
- Eutick ML, O'Brien RW, Slaytor M (1978) Bacteria from the gut of Australian termites. *Appl Environ Microbiol* **35**: 823-828.
- Fall S, Hamelin J, Ndiaye F, Assigbetse K, Aragno M, Chotte J L & Brauman A (2007) Differences between bacterial communities in the gut of a soil-feeding termite (*Cubitermes niokoloensis*) and its mounds. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5199-5208.
- Farris MH & Olson JB (2007) Detection of *Actinobacteria* cultivated from environmental samples reveals bias in universal primers. *Lett Appl Microbiol* **45**: 376-381.
- Fröhlich J & König H (2000) New techniques for isolation of single prokaryotic cells. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 567-572.
- Goodfellow M, Williams ST (1983) Ecology of Actinomycetes. *Ann Rev Microbiol* **37**: 189-216
- Grassé PP (1949) Ordres des Isoptères ou termites. In: *Traité de Zoologie, Anatomie, Systematique, Biologie* (Ed : Grassé PP), Masson, Paris .pp. 408-544.
- Grassé PP (1959) Un nouveau type de symbiose : la meule alimentaire des termites champignonnistes. *Nature* **3293** : 385-389
- Grassé PP (1982) *Termitologia* Vol.1 Anatomie, physiologie, reproduction des termites. Masson, Paris 676 p.
- Grassé PP (1984) *Termitologia* Vol.2 Fondation des sociétés, construction. Masson, Paris 613 p.
- Grimaldi D, Engel MS (2005) *Evolution of the insects*. Cambridge University Press, New York. 755 p.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**: 95-98.
- Harazono K, Yamashita N, Shinzato N, Watanabe Y, Fukatsu T, Kurane R (2003) Isolation and characterization of aromatics-degrading microorganisms from the gut of the lower termite *Coptotermes formosanus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**: 889-892
- Hayakawa M, Nonomura H (1987) Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Technol* **65**: 501-509

- Hayashi A, Aoyagi H, Kinjyo K, Yoshimura T, Tanaka H (2007) Development of an efficient method for screening microorganisms by using symbiotic association between *Nasutitermes takasagoensis* and intestinal microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**: 1437-1446
- Heim R (1941) Etudes descriptives et expérimentales sur les agarics termitophiles d'Afrique tropicale. *Mem de l'Acad Sc* **64** : 25-29.
- Herlemann DP, Geissinger O, Brune A (2007) The termite group I phylum is highly diverse and widespread in the environment. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6682-6685
- Heuer H & Smalla K (1997) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. *Modern Soil Microbiology* (van Elsas JD, Wellington EMH & Trevors JT, eds), pp. 353–373. Marcel Dekker, New York.
- Heuer H, Kesk M, Baker P, Smalla K & Wellington E. M. H. (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3233-3241.
- Holmgren N (1909) Termitenstudien. I. Anato-mische untersuchungen. *Kongelige Svenska Vetenskapsakad Handlingen*
- Holmgren N (1911) Termitenstudien. 2. Systematik der termiten. Die familie Mastotermitidae, Protermitidae and Mesotermitidae. *Kgl. Svens. Veten. Hand.* **46**: 1 88.
- Holmgren N (1912). Termitenstudien. 3. Systematik der termiten. Die familie Metatermitidae. *Kgl. Svens. Veten. Hand.* **48**: 1 166.
- Hongoh Y, Deevong P, Inoue T, Moriya S, Trakulnaleamsai S, Ohkuma M, Vongkaluang C, Noparatnaraporn N & Kudo T (2005) Intra- and interspecific comparisons of bacterial diversity and community structure support coevolution of gut microbiota and termite host. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6590-6599.
- Hongoh Y, Ekpornprasit, Inoue T, Moriya S, Trakulnaleamsai S, Ohkuma M, Noparatnaraporn N & Kudo T (2006) Intracolony variation of bacterial gut microbiota among castes and ages in the fungus-growing termite *Macrotermes gilvus*. *Mol Ecol* **15**: 505-516.

- Hongoh Y, Ohkuma M & Kudo T (2003) Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiol Ecol* **44**:231-242.
- Hongoh Y, Sharma VK, Prakash T, Noda S, Taylor TD, Kudo T, Sakaki Y, Toyoda A, Hattori M, Ohkuma M (2008) Complete genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 5555-5560
- Hungate RE (1946) Studies on cellulose fermentation II. An anaerobic cellulose-decomposing actinomycete, *Micromonospora propionici*, N. Sp. *J Bacteriol* **51**: 51-56.
- Husseneder C, Grace JK, Oishi DE (2002) Recombinant bacteria for use in insect control. US Patent 6,926,889
- Imada C (2005) Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek* **87**: 59-63
- Inoue T, Kitade O, Yoshimura T, Yamaoka I (2000) Symbiotic associations with protists. In: Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology (Eds: Abe T, Bignell D, Higashi M). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 275-288
- Inward D, Beccaloni G, Eggleton P (2007) Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. *Biol Lett* **3**: 331-335
- Inward DJ, Vogler AP, Eggleton P (2007) A comprehensive phylogenetic analysis of termites (Isoptera) illuminates key aspects of their evolutionary biology. *Mol Phylogenet Evol* **44**: 953-967
- Jan G, Leverrier P, Pichereau V, Boyaval P (2001a) Changes in protein synthesis and morphology during acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii*. *Appl Environ Microbiol* **67**:2029-2036
- Jan G, Leverrier P, Roland N (2001b) Survival and beneficial effects of *propionibacteria* in the human gut: in vivo and in vitro investigations. *Lait* **82**:131-144
- Janssen PH, Yates PS, Grinton BE, Taylor PM & Sait M (2002) Improved culturability of soil Bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2391-2396.
- Jarzembowski EA (1981) An early Cretaceous termite from southern England (Isoptera: Hodotermitidae). *Syst Entomol* **6**: 91-96

- Joseph SJ, Hugenholtz P, Sangwan P, Osborne CA & Janssen PH (2003) Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* **69**: 7210-7215.
- Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS (2002) Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* **296**: 1127-1129.
- Kambhampati S, Eggleton P (2000) Taxonomy and phylogeny of termites. In: Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology (Eds: Abe T, Bignell D, Higashi M). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 1-24
- Kambhampati S, Kjer KM, Thorne BL (1996) Phylogenetic relationship among termite families based on DNA sequence of mitochondrial 16S ribosomal RNA gene. *Insect Mol Biol* **5**: 229-238
- Kappler A, Brune A (2002) Dynamics of redox potential and changes in redox state of iron and humic acids during gut passage in soil-feeding termites (*Cubitermes spp.*). *Soil Biol Biochem* **34**: 221-227
- Keller M & Zengler K (2004) Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews Microbiology* **2** (2): 141-50.
- Khandelwal KC, Gaur AC (1980) Degradation of humic acids, extracted from manure and soil by some streptomycetes and fungi. *Zentralbl Bakteriol Naturwiss* **135**: 119-122
- Kishishita M, Ushijima T, Ozaki Y & Ito Y (1980) New medium for isolating *Propionibacteria* and its application to assay of normal flora of human facial skin. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1100-1105.
- Klass KD, Nalepa C, Lo N (2008) Wood-feeding cockroaches as models for termite evolution (Insecta: Dictyoptera): *Cryptocercus* vs. *Parasphaeria boleiriana*. *Mol Phylogenet Evol* **46**: 809-817
- Koizumi M. (1921). Studies on the intestinal protozoa found in the termites of Japan. *Parasitology* **13**: 235-309.
- König H, Fröhlich J, Hertel H (2006) Diversity and lignocellulolytic activities of cultured microorganisms In: Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates (Eds: Konig H, Varma A), Springer Berlin Heidelberg, pp. 271-301
- Konig H, Varma A (2006) Intestinal Microorganisms of Termites and Other Invertebrates. Soil Biology Vol 6 Springer Berlin Heidelberg, 520p.

- Kosono S, Maeda M, Fuji F, Arai H, Kudo T (1997) Three of the seven bphC genes of *Rhodococcus erythropolis* TA421, isolated from a termite ecosystem, are located on an indigenous plasmid associated with biphenyl degradation. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3282-3285
- Krassilnikov NA (1938). Ray fungi and related organisms, Actinomycetales Akademiya Nauk SSSR, Moscow
- Kuhnigk T, Borst EM, Ritter A, Kämpfer P, Graf A, Hertel H, König H (1994). Degradation of lignin monomers by the hindgut flora of xylophagous termites. *Syst Appl Microbiol* **17**:76–85.
- Kurtböke DI & French JRJ (2007) Use of phage battery to investigate the actifloral layers of termite gut microflora. *J Appl Microbiol* **103**: 722-734.
- Kuzina LV, Miller ED, Ge B, Miller TA (2002) Transformation of *Enterobacter gergoviae* isolated from pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) gut with *Bacillus thuringiensis* toxin. *Curr Microbiol* **44**: 1-4
- Lavelle P, Spain AV (2001). Soil Ecology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 686p.
- Lazzarini A, Cavaletti, Toppo G & Marinelli F (2000) Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* **78**: 399-405.
- Lechevalier MP, Lechevalier HA (1970) Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Soc General Microbiol* **20**: 435-443
- Lefebvre T, Chaline N, Limousin D, Dupont S, Bagnères AG (2008) From speciation to introgressive hybridization: the phylogeographic structure of an island subspecies of termite, *Reticulitermes lucifugus corsicus*. *BMC Evol Biol* **8**: 38
- Legendre F, Whiting MF, Bordereau C, Cancello EM, Evans TA, Grandcolas P (2008) The phylogeny of termites (Dictyoptera: Isoptera) based on mitochondrial and nuclear markers: Implications for the evolution of the worker and pseudergate castes, and foraging behaviors. *Mol Phylogenet Evol* **48**: 615-627
- Leidy J (1881) The parasites of termites. *J Acad Nat Sci Phila* **8**:425-447.
- Leniaud L, Pichon A, Uva P, Bagnères AG (2008) Unicoloniality in *Reticulitermes urbis*: a novel feature in a potentially invasive termite species. *Bull Entomol Res*: 1-10
- Lenoir-Labé F (1994) Recherche d'une microflore actinomycétale spécifique du segment mixte de plusieurs espèces de termites supérieurs: caractérisation et rôles. Thèse de Doctorat , université Paris XII 135p.

- Leverrier P, Dimova D, Pichereau V, Auffray Y, Boyaval P, Jan G (2003) Susceptibility and adaptive response to bile salts in *Propionibacterium freudenreichii*: physiological and proteomic analysis. *Appl Environ Microbiol* **69**:3809-3818
- Li L, Fröhlich J, König H (2006) Cellulose digestion in the termite gut. In: Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates (Eds: Konig H, Varma A), Springer Berlin Heidelberg, pp. 221-241
- Li YV, Terekhova LP & Gapochka MG (2002) Isolation of actinomycetes from soil using extremely high frequency radiation. *Microbiol* **71**: 105-108.
- Li YV, Terekhova LP, Alferova IV, Galatenko OA & Gapochka MG (2003) The application of succession analysis in combination with EHF irradiation to the selective isolation of actinomycetes from soil. *Microbiol* **72** : 114-117.
- Lilburn, Schmidt, Breznak (1999) Phylogenetic diversity of termite gut spirochaetes. *Environ Microbiol* **1**: 331-345
- Lo N, Bandi C, Watanabe H, Nalepa C, Beninati T (2003) Evidence for cocladogenesis between diverse dictyopteran lineages and their intracellular endosymbionts. *Mol Biol Evol* **20**: 907-913
- Lo N, Tokuda G, Watanabe H, Rose H, Slaytor M, Maekawa K, Bandi C, Noda H (2000) Evidence from multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches. *Curr Biol* **10**: 801-804
- Lozupone C, Knight R (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8228-8235
- Mackenzie LM, Muigai AT, Osir EO, Lwande W, Keller M, Toledo G, Boga HI (2007) Bacterial diversity in the intestinal tract of the fungus-cultivating termite *Macrotermes michaelsoni* (Sjöstedt). *Afr J Biotechnol* **6**:658-667
- Maeda M, Chung SY, Song E & Kudo T (1995) Multiple genes encoding 2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenase in the gram-positive polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* ITA421, isolated from a termite ecosystem. *Appl Environ Microbiol* **61** : 549-555.
- Mantere-Alhonen S (1995) *Propionibacteria* used as probiotics - A review. *Lait* **75**:447-452
- Martin MM, Martin JS (1978) Cellulose digestion in the midgut of the fungus-growing termite *Macrotermes natalensis*: the role of acquired digestive enzymes. *Science* **199**: 1453-1455

- May A (2004) Percent Sequence IdentityThe Need to Be Explicit. *Struct* **12**: 737-738
- McCarthy AJ (1987) Lignocellulose-degrading actinomycetes. *FEMS Microbiol Lett* **46**:145-163
- Meyer A, Deiana J, Leclerc H (1984) Cours de microbiologie générale (Eds Doin) 309 p.
- Minkley N, Fujita A, Brune A, Kirchner W (2006) Nest specificity of the bacterial community in termite guts (*Hodotermes mossambicus*). *Insect Soc* **53**: 339-344
- Miyata R, Noda N, Tamaki H, Kinjyo K, Aoyagi H, Uchiyama H & Tanaka H (2007) Influence of feed components on symbiotic bacterial community structure in the gut of the wood-feeding higher termite *Nasutitermes takasagoensis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 1244-1251.
- Mora P (1992) Dégâts des termites champignonnistes (Macrotermitinae) *Pseudacanthotermes spiniger* et *Microtermes subhyalinus* dans les plantations de canne à sucre - Mise au point d'une lutte spécifique. *Thèse de Doctorat, Université Paris XII*. 177 p.
- Moriya S, Noda S, Ohkuma M, Kudo T (2007) In situ hybridization of termite microbes. *Methods Mol Biol* **353**: 105-112
- Muyzer G, de Wall EC & Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**: 3233-3241.
- Nakajima H, Hongoh Y, Noda S, Yoshida Y, Usami R, Kudo T, Ohkuma M (2006) Phylogenetic and morphological diversity of Bacteroidales members associated with the gut wall of termites. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**: 211-218
- Nakajima H, Hongoh Y, Usami R, Kudo T & Ohkuma M (2005) Spatial distribution of bacterial phylotypes in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* and the bacterial community colonizing the gut epithelium. *FEMS Microbiol Ecol* **54**: 247-255.
- Nakatsu CH (2007) Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Sci Soc Am J* **71**:562-571
- Nalepa C, Li L, Lu WH, Lazell J (2001) Rediscovery of the wood-eating cockroach *Cryptocercus primarius* (Dictyoptera: Cryptocercidae) in China, with notes on ecology and distribution. *Act Zootax Sin* **26**: 184-190.

- Noirot C, Pasteels JM (1987) Ontogenetic development and evolution of the worker caste in termites. *Experientia* **43**:851-860.
- Odelson DA, Breznak JA (1985) Cellulase and other polymer-hydrolyzing activities of *Trichomitopsis termopsisidis*, a symbiotic protozoan from termites. *Appl Environ Microbiol* **49**: 622-626
- Ohigu CE, Wood TG (1976) A method for measuring rate of grass-harvesting by *Trinervitermes germinates* (Wasmann) (isopteran, Nasutitermitinae) and observation on its foraging behavior in southern guinea savanna, Nigeria. *J Appl Ecol* **13**: 705-713
- Ohkuma M & Kudo T (1996) Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. *Appl Environ Microbiol* **62**: 461-468.
- Ohkuma M (2003) Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose. *Appl Microbiol Biotech* **61**: 1-9
- Ohkuma M (2008) Symbioses of flagellates and prokaryotes in the gut of lower termites. *Trends Microbiol* **16**: 345-352
- Ohkuma M, Hongoh Y, Kudo T (2006) Diversity and molecular analyses of yet-uncultivated microorganisms In: Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates (Eds: Konig H, Varma A), Springer Berlin Heidelberg, pp. 304-317
- Ohkuma M, Iida T, Kudo T (1999) Phylogenetic relationships of symbiotic spirochetes in the gut of diverse termites. *FEMS Microbiol Lett* **181**: 123-129
- Ohkuma M, Noda S, Hongoh Y, Kudo T (2002) Diverse bacteria related to the bacteroides subgroup of the CFB phylum within the gut symbiotic communities of various termites. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**: 78-84
- Ohkuma M, Sato T, Noda S, Ui S, Kudo T, Hongoh Y (2007) The candidate phylum 'Termite Group 1' of bacteria: phylogenetic diversity, distribution, and endosymbiont members of various gut flagellated protists. *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 467-476
- Ohkuma M, Yuzawa H, Amornsak W, Sornnuwat Y, Takematsu Y, Yamada A, Vongkaluang C, Sarnthoy O, Kirtibutr N, Noparatnaraporn N, Kudo T, Inoue T (2004) Molecular phylogeny of Asian termites (Isoptera) of the families Termitidae and Rhinotermitidae based on mitochondrial COII sequences. *Mol Phylogenet Evol* **31**: 701-710

- Orja-Jensen S (1909) Die hauptlinien des natürlichen Bacteriensystems. *Zbl Bakt Hyg, II Abt* **22** : 305-346
- Ouwehand AC, Suomalainen T, Tolkko S, Salminen S (2002) In vitro adhesion of propionic acid bacteria to human intestinal mucus. *Lait*. **82**:123-130
- Pasti MB & Belli ML (1985) Cellulolytic activity of actinomycetes isolated from termites (Termitidae) gut. *FEMS Microbiol Lett* **26**: 107-112.
- Pasti MB, Pometto AL, 3rd, Nuti MP, Crawford DL (1990) Lignin-solubilizing ability of actinomycetes isolated from termite (Termitidae) gut. *Appl Environ Microbiol* **56**: 2213-2218
- Perez Chaia A, Zarate G, Oliver G (1999) The probiotic properties of *propionibacteria*. *Lait*. **79**:175-185
- Pester M, Brune A (2006) Expression profiles of fhs (FTHFS) genes support the hypothesis that spirochaetes dominate reductive acetogenesis in the hindgut of lower termites. *Environ Microbiol* **8**: 1261-1270
- Pester M, Brune A (2007) Hydrogen is the central free intermediate during lignocellulose degradation by termite gut symbionts. *ISME J* **1**: 551-565
- Petch T (1913) Termite fungi: a résumé. *Ann Roy Bot Gard*
- Porteus LA, Seidler RJ & Watrud LS (1997) An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Mol Ecol* **6**: 787-791.
- Potrikus CJ, Breznak JA (1981) Gut bacteria recycle uric acid nitrogen in termites: A strategy for nutrient conservation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 4601-4605
- Prillinger H, König H (2006) The Intestinal Yeasts In: Intestinal Microorganisms of Termites and Other Invertebrates (Eds: König H, Varma A), Springer Berlin Heidelberg, pp. 319-334
- Rappé MS & Giovannoni (2003) The uncultured microbial majority. *Annual Rev Microbiol* **57**: 369-394.
- Rheims H & Stackebrandt E (1999) Application of nested polymerase chain reaction for the detection of as yet uncultured organisms of the class *Actinobacteria* in environmental samples. *Environ Microbiol* **1**: 137-143.
- Roisin Y (2000) Diversity and evolution of caste patterns. In: Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology (Eds: Abe T, Bignell D, Higashi M). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 95-119

- Rossi F, Torriani S & Dellaglio F (1999) Genus- and species-specific PCR-based detection of dairy *Propionibacteria* in environmental samples by using primers targeted to the genes encoding 16S rRNA. *Appl Env Microbiol* **65** : 4241-4244.
- Rouland C, Lenoir-Labé F (1998) Microflore intestinale symbiotique des insectes xylophages : mythe ou réalité ? *Cahiers Agricul* **7** : 37-47
- Rouland C, Civas A, Renoux J, Petek F (1988) Purification and properties of cellulases from the termite *Macrotermes mülleri* (Termitidae, Macrotermitinae) and its symbiotic fungus *Termitomyces* sp. *Comparative Biochemistry and Physiology* **91B**: 449–458.
- Rouland-Lefèvre C, Johjima T, Inoue T (2006) *Termitomyces*/termite interactions. In: Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates (Eds: König H, Varma A). Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 335–350
- Rouland-Lefèvre C, Bignell DE (2001) Cultivation of symbiotic fungi by termites of the subfamily Macrotermitinae. In: Symbiosis: mechanisms and model systems (Ed: Seckbach J). Kluwer academic publishers, Netherlands, pp 731–756
- Sait M, Davis KER & Janssen PH (2006) Effect of pH on Isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum *Acidobacteria* occurring in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (3): 1852-1857.
- Sait M, Hugenholtz P & Janssen PH (2002) Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environ Microbiol* **4** : 654-666
- Saito A, Iwabuchi T, Harayama S (1999) Characterization of genes for enzymes involved in the phenanthrene degradation in *Nocardioides* sp. KP7. *Chemosph* **38**:1331-1337
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- Sanglier JJ, Haag H, Huck TA, Fehr T (1993) Novel bioactive compounds from actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res Microbiol* **144**:633-642
- Santa Lucia J (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1460–1465
- Sasaki N, Sakai K, Takazoe I (1980) An improved medium for the selective isolation of *Propionibacterium acnes* from the human oral cavity and skin. *Journal of Dental Research* **59**: 1518–1519.

- Schäfer A, Konrad R, Kuhnigk T, Kampfer P, Hertel H, Konig H (1996) Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut. *J Appl Bacteriol* **80**: 471-478
- Schmitt-Wagner D, Brune A (1999) Hydrogen profiles and localization of methanogenic activities in the highly compartmentalized hindgut of soil-feeding higher termites (*Cubitermes spp.*). *Appl Environ Microbiol* **65**: 4490-4496
- Schmitt-Wagner D, Friedrich MW, Wagner B & Brune A (2003) Axial dynamics, stability, and interspecies similarity of bacterial community structure in the highly compartmentalized gut of soil-feeding termites (*Cubitermes spp.*). *Appl Environ Microbiol* **69**: 6018-6024.
- Schultz JE, Breznak JA (1978) Heterotrophic bacteria present in hindguts of wood-eating termites [*Reticulitermes flavipes* (Kollar)]. *Appl Environ Microbiol* **35**: 930-936
- Sebald M, Prévot AR (1962) Étude d'une nouvelle espèce anaérobie stricte *Micromonospora acetoformici* n.sp. isolée de l'intestin postérieur de *Reticulitermes lucifugus* var. *santonensis*. *Ann Inst Pasteur* **102**, 199–214
- Shinzato N, Muramatu M, Matsui T & Watanabe Y (2005) Molecular phylogenetic diversity of the bacterial community in the gut of the termite *Coptotermes formosanus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 1145-1155.
- Shinzato N, Muramatu M, Matsui T & Watanabe Y (2007) Phylogenetic analysis of the gut bacterial microflora of the fungus-growing termite *Odontotermes formosanus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 906-915.
- Slaytor M (1992) Cellulose digestion in termites and cockroaches: what role do symbionts play? *Compar Biochem Physiol* **103**: 775–784.
- Slaytor M (2000) Energy metabolism in the termite gut and its gut microbiota. In Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology (Eds: Abe T, Bignell DE & Higashi M) Kluwer academic publishers, Netherlands, pp 307-332
- Slaytor M, Chappell DJ (1994) Nitrogen metabolism in termites. *Comp Biochem Physiol* **107**:1-10
- Snyder TE (1949) Catalogue of the Termites (Isoptera) of the World. *Smith. Miscellaneous Coll.* **112**: 1 490.
- Stach JEM, Maldonado LA, Ward AC, Goodfellow M & Bull AT (2003) New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Env Microbiol* **5**: 828–841.

- Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey N (1997) Proposal for a new hierarchical classification system, Actinobacteria class nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**:479-491.
- Stackebrandt E, Schaal KP (2006) The family Propionibacteriaceae: the genera *Friedmanniella*, *Luteococcus*, *Microlunatus*, *Micropruina*, *Propioniferax*, *Propionimicrobium* and *Tessarococcus*. In: The Prokaryotes, 3rd edn, Vol. 3: Archaea; Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes (Eds: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H & Stackebrandt E), Springer, New York. pp. 383-399.
- Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT, Schmidt TM & Breznak JA (2004) New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4748-4755.
- Swofford DL (1993) PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1.1. Illinois Natural History Survey, Champaign.
- Taguchi K, Motoyama M, Iida T, Kudo T (2007) Polychlorinated biphenyl/biphenyl degrading gene clusters in *Rhodococcus* sp. K37, HA99, and TA431 are different from well-known bph gene clusters of *Rhodococci*. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 1136-1144
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596-1599.
- Tamura T, Takeuchi M, Yokota A (1994) *Luteococcus japonicus* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive coccus with LL-diaminopimelic acid in the cell wall. *Int J Syst Bacteriol* **44**: 348-356
- Tanaka H, Aoyagi H, Shina S, Dodo Y, Yoshimura T, Nakamura R & Uchiyama H (2006) Influence of the diet components on the symbiotic microorganisms community in hindgut of *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Appl Environ Biotechnol* **71**: 907-917.
- Terra WR (1990) Evolution of Digestive Systems of Insects. *Ann Rev Entomol* **35**: 181-200
- Tholen A, Brune A (2000) Impact of oxygen on metabolic fluxes and in situ rates of reductive acetogenesis in the hindgut of the wood-feeding termite *Reticulitermes flavipes*. *Environ Microbiol* **2**: 436-449
- Tholen A, Schink B, Brune A (1997) The gut microflora of *Reticulitermes flavipes*, its relation to oxygen, and evidence for oxygen-dependent acetogenesis by the most abundant *Enterococcus* sp. *FEMS Microbiol Ecol* **24**:137-149

- Thompson GJ, Miller LR, Lenz M, Crozier RH (2000) Phylogenetic analysis and trait evolution in Australian lineages of drywood termites (Isoptera, Kalotermitidae). *Mol Phylogenet Evol* **17**: 419-429
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence weighing, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* **76**: 4350–4354.
- Thorne BL (1997) Evolution of eusociality in termites. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **28**: 27 54.
- Thorne BL, Breisch NL, Muscedere ML (2003) Evolution of eusociality and the soldier caste in termites: influence of intraspecific competition and accelerated inheritance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 12808-12813
- Thorne BL, Grimaldi D, Krishna K (2000) Early fossil history of the termites. In *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology* (Eds: Abe T, Bignell DE, Higashi M) Kluwer academic publishers pp 77-93
- Tokuda G, Saito H, Watanabe H (2002) A digestive beta-glucosidase from the salivary glands of the termite, *Neotermes koshunensis* (Shiraki): distribution, characterization and isolation of its precursor cDNA by 5'- and 3'-RACE amplifications with degenerate primers. *Insect Biochem Mol Biol* **32**: 1681-1689
- Tokura M, Ohkuma M, Kudo T (2000) Molecular phylogeny of methanogens associated with flagellated protists in the gut and with the gut epithelium of termites. *FEMS Microbiol Ecol* **33**: 233-240
- Uyeda M (2004) Metabolites produced by actinomycetes--antiviral antibiotics and enzyme inhibitors. *Yakugaku Zasshi* **124**: 469-479
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D (2007) Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 495-548
- Vobis N (1992) The genus *Actinoplanes* and related genera. In *The Prokaryotes* (Eds: Balows A, Truper HG, Dworkin M) Springer, New York, pp. 1029–1060.
- Vorobjeva LI (1999). *Propionibacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 291 p
- Warnecke F, Luginbuhl P, Ivanova N, Ghensemian M, Richardson TH, Stege JT, Cayouette M, McHardy AC, Djordjevic G, Aboushadi N, Sorek R, Tringe SG, Podar M, Martin HG, Kunin V, Dalevi D, Madejska J, Kirton E, Platt D, Szeto E, Salamov A, Barry K, Mikhailova N, Kyrpides NC, Matson EG, Ottesen EA, Zhang

- X, Hernandez M, Murillo C, Acosta LG, Rigoutsos I, Tamayo G, Green BD, Chang C, Rubin EM, Mathur EJ, Robertson DE, Hugenholtz P, Leadbetter JR (2007) Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature* **450**: 560-565
- Watanabe H, Noda H, Tokuda G, Lo N (1998) A cellulase gene of termite origin. *Nature* **394**: 330-331
 - Watanabe K, Abe K, Sato M (2000) Biological control of an insect pest by gut-colonizing *Enterobacter cloacae* transformed with ice nucleation gene. *J Appl Microbiol* **88**: 90-97
 - Watanabe Y, Shinzato N, Fukatsu T (2003) Isolation of actinomycetes from termites' guts. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**: 1797-1801
 - Wenzel M, Schonig I, Berchtold M, Kampfer P, Konig H (2002) Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. *J Appl Microbiol* **92**: 32-40
 - Williams ST & Wellington EMH (1982) Principles and problems of selective isolation of microbes. In: Bioactive microbial products: search and discovery (Eds: Bu'lock JD, Nisbet LJ and Winstanley DJ), Academic Press, London, pp. 9-26.
 - Wilson EO (1971) Social insects. *Science* **172**: 406
 - Wilson LP & Bouwer EJ (1997) Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review. *J Ind Microbiol& Biotechnology* **18**: 116-130.
 - Wintzingerode Fv, Gobel UB & Stackebrandt E (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* **21**: 213-219.
 - Xu J, Gordon JI (2003) Inaugural Article: Honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10452-10459
 - Yang H, Schmitt-Wagner D, Stingl U, Brune A (2005) Niche heterogeneity determines bacterial community structure in the termite gut (*Reticulitermes santonensis*). *Environ Microbiol* **7**: 916-932
 - Yara K, Jahana K, Hayashi H (1989) In situ morphology of the gut microbiota of the fungus-growing termite *Odontotermes formosanus* (Termitidae Macrotermitinae). *Sociobiol* **15**:247-260

- Zakharova OS, Zenova GM & Zvyagintsev DG (2003) Some approaches to the selective isolation of actinomycetes of the genus *Actinomadura* from soil. *Microbiol* **72**: 126-130.
- Zarate G, Morata de Ambrosini VI, Chaia AP, Gonzalez SN (2002) Adhesion of dairy *Propionibacteria* to intestinal epithelial tissue in vitro and in vivo. *J Food Prot* **65**: 534-539
- Zengler K, Toledo G, Rappé M, Elkins J, Mathur EJ, Short JM & Keller M (2002) Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci U SA* **99**: 15681-15686.

Résumé / Abstract



Associations biologiques entre les termites du genre *Nasutitermes* et leur microflore actinomycétale: spécificité et évolution.

Résumé

Cette étude porte sur la diversité et la nature des associations entre les actinomycètes et le tube digestif des termites.

La structure des communautés actinobactériennes de la panse de 9 espèces de *Nasutitermes* ont été comparées à différentes échelles par la méthode de “Nested PCR - DGGE”. Les résultats montrent que les termites maintiennent dans leur intestin une microflore actinobacterienne stable, quel que soit le traitement alimentaire ou l'origine géographique de la colonie. Les séquences d'ADNr 16s détectées en DGGE à partir de l'intestin des termites ont été analysées phylogénétiquement. La plupart d'entre elles sont incluses dans des lignées spécifiques aux termites tandis que les autres semblent être des formes opportunistes.

Une stratégie de culture a été élaborée en parallèle afin d'isoler les actinomycètes du tube digestif des termites. Sur la base du milieu HV, plusieurs facteurs intervenant à différentes étapes de la culture microbiologique ont été examinés. Bien que les souches de *Streptomyces* soient largement majoritaires, plusieurs souches appartenant à des genres rares jamais trouvés chez les termites, ont pu être isolées. Pourtant, aucune d'entre elles n'est réellement associée aux termites, illustrant la très faible représentativité donnée par la diversité des cultivables.

Les recherches se sont alors focalisées sur les populations de *Propionibacteriaceae* associées à l'intestin des termites. De nouvelles amores spécifiques ont été définies puis utilisées à la fois pour développer une approche intégrative de culture microbiologique (PW-PCR) et pour réaliser une analyse phylogénétique à partir de diverses espèces de termites. Les séquences de propionibactéries ont été détectées chez tous les termites étudiés. Elles forment un groupe exclusif et monophylétique, divergent de tous les autres genres connus. Les relations évolutives entre les deux partenaires de l'association biologique ont finalement été discutées.

Mots clés: terme, *Nasutitermes*, microflore intestinale, actinobactéries, associations spécifiques, nested PCR, DGGE, PW-PCR, stratégie d'isolement en culture.

Biological associations between *Nasutitermes* termites and their gut actinobacterial microflora: specificity and evolution.

Abstract

This comprehensive survey studied the diversity and the nature of the associations between actinomycetes and termite guts.

The actinobacterial community structures from the gut of 9 species of *Nasutitermes* were compared at different scales using nested PCR-DGGE methods. The results support that termites maintain in their gut a stable actinobacterial microflora, regardless of the alimentary treatment or the geographical origin of the colony. The 16s rDNA actinobacterial sequences retrieved in termite gut were phylogenetically analysed. Most of them are included in termite-specific lineages whereas the others ones seem to be opportunist forms.

A cultivation strategy was developed in the same way to isolate the termite-specific actinomycetes. On the basis of HV medium, several factors involving in different steps of microbiological culture are investigated. Although *Streptomyces* strains widely predominate on plates, we isolated strains belonging to rare genera never found from termite gut. However, none of them are termite specific, which illustrates the great discrepancy between the genuine and the cultivable diversity.

The last investigations focused on *Propionibacteriaceae* populations associated with termite gut. New specific primers were defined and used both to develop an integrative approach of culture (PW-PCR) and to fulfil a phylogenetic analysis from diverse termite species. The 16s rDNA sequences of propionic bacteria are distributed in every specimen studied and form an exclusive monophyletic group divergent from all known genera. The evolutionary relationships between the two partners of the biological association were finally debated.

Key words: termite, *Nasutitermes*, gut microbiota, actinobacteria, specific association, nested PCR, DGGE, PW-PCR, and isolation strategy.

