

Enregistrement scientifique n° : 1488
Symposium n° : 9
Présentation : poster

DNA extraction from some termite mounds and molecular analysis of microbial communities Extraction d'ADN de nids de termites et analyses moléculaires des communautés bactériennes

HARRY Myriam, GARNIER-SILLAM Evelyne

Laboratoire de Biologie des Sols et des Eaux, Université ParisXII, 94000 Créteil, France

Introduction

Selon leur régime trophique et leur comportement constructeur, les termites ont un impact plus ou moins important sur les cycles de dégradation de la matière organique. Différents auteurs ont montré que les termites humivores qui se nourrissent d'humus et les termites champignonnistes qui développent une exosymbiose particulière avec un champignon pour dégrader le matériel végétal, modifient les propriétés physiques et chimiques des sols (LEE & WOOD, 1971 ; LOBRY DE BRUYN & CONACHER, 1990 ; GARNIER-SILLAM & HARRY, 1995). En revanche, leur action sur les micro-organismes du sol a très été peu étudiée. Quelques auteurs ont estimé les populations microbiennes des nids de termitières de champignonnistes à l'aide de méthodes de culture (MEIKLEJOHN, 1965 ; KEYA *et al.*, 1982). Mais, ces méthodes ne permettent la mise en évidence que d'une faible fraction de la biomasse microbienne totale dans les milieux environnementaux, estimée par différents auteurs comme étant de l'ordre de 0,01 à 10 % (ATLAS & BARTA, 1993). Avec l'essor des techniques moléculaires, des macromolécules informatives comme l'ADN deviennent accessibles sans qu'il soit nécessaire d'isoler ou de cultiver des cellules bactériennes.

Le but de cette étude est de déterminer si la composition des communautés bactériennes présentes dans les termitières diffèrent de celles de sols témoins. Après extraction de l'ADN total de nids d'espèces de termites ayant des régimes trophiques différents et de sols témoins, deux techniques moléculaires reposant sur l'amplification spécifique ou aléatoire de séquences d'ADN ont été utilisées afin respectivement d'attester la présence de bactéries et d'apprécier leur diversité au sein des termitières (HARRY *et al.*, b). L'amplification spécifique permet d'obtenir par PCR (Polymerase Chain Reaction) une grande quantité de fragments d'ADN d'une région ciblée ; des amorces bactériennes d'ADN ribosomique 16S ont été utilisées. L'amplification aléatoire permet l'obtention de marqueurs polymorphes RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs).

Matériels et Méthodes

Site d'étude et échantillonnage

Les échantillons proviennent du bassin versant élémentaire de Nsimi-Zoétéélé du Sud-Cameroun situé en forêt tropicale humide (2°48'N et 4°32'N). Deux nids par espèce de termite étudiée ont été échantillonnés.

Cubitermes subquartus, SJÖSTEDT, érige un nid qui peut atteindre plus de 2,5 mètres de hauteur, constitué de “ demi-chapeaux ” appliqués contre le tronc d'un grand arbre. *Thoracotermes macrothorax*, WASMANN, construit un nid de forme cylindrique qui ne s'appuie pas à un tronc. *Procubitermes niapuensis*, SILVESTRI, présente un nid composé d'une série de constructions en forme de gourdes (4-10 cm) plus ou moins imbriquées, plaquées contre le tronc d'un grand arbre et d'où partent en direction du sol une ou plusieurs grosses galeries-tunnels. *Noditermes lamanianus*, SJÖSTEDT, érige au pied d'un arbre, parfois contre lui, un nid en forme de pagode, dont la base se compose d'une ou de deux autres surmontées d'une autre plus volumineuse se terminant en cône aigu. Ces quatre espèces de termites humivores (Termitinae) consomment de l'humus et incorporent leur fèces dans leur construction en quantité variable.

Odontotermes sp., HOLMGREN, construit un nid s'ouvrant à l'extérieur par un ensemble de cheminées. Les cavités des cheminées se continuent dans la profondeur du nid où elles se ramifient et convergent vers une région située à plus d'un mètre au dessous de la surface du sol. Cette espèce de termite champignonniste (Macrotermitinae) construit son nid avec des particules fines du sol cimentées par de la salive. Les fèces ne sont pas incorporés mais déposés sur les planchers des constructions.

Différentes strates de sols témoins, c'est-à-dire ne présentant pas d'activité termitique notable au moment du prélèvement, ont été échantillonnées. Dans notre étude, les strates 2-5 cm des sols témoins ont été utilisées comme référence des communautés bactériennes du sol.

Extraction et purification d'ADN

Deux méthodes principales d'extraction d'ADN du sol ont été décrites. La première décrite par HOLBEN *et al.* (1988) repose sur l'isolement des cellules bactériennes du sol puis sur l'extraction de leur ADN après une étape de lyse cellulaire. La seconde, développée par OGRAM *et al.* (1987), repose sur une lyse directe des cellules bactériennes sans isolement au préalable des cellules. Cette dernière méthode a été retenue car elle permet d'obtenir un meilleur rendement d'ADN extrait et celui-ci est plus représentatif de l'échantillon global. Le protocole général d'extraction et de purification a été décrit dans HARRY *et al.* b. Les échantillons de sols et de termitières sont soumis à une solution de lyse contenant de la protéinase *k* et du sodium dodecyl sulfate. La précipitation des protéines est réalisée à haute force ionique par ajout de NaCl. Après lavage et précipitation à l'éthanol absolu, l'ADN extrait est ensuite soumis à une purification sur gel d'agarose et puis sur mini-colonne. Seule cette double purification permet l'élimination complète des contaminants (HARRY *et al.* a).

Amplification spécifique

Le principe de la PCR (Polymerase Chain Reaction) a été décrit pour la première fois par SAIKI *et al.* (1985). Deux amorces spécifiques de l'ADNr 16S bactérien ont été utilisées (Harry *et al.* b). La réalisation d'une PCR comporte une succession d'étapes comprenant des modifications de températures (dénaturation de l'ADN: 1 min à 93°C;

hybridation des amorces spécifiques 1-3 min à 50-60°C; élongation des brins d'ADN synthétisés par la *Taq* polymérase: 1 min à 72°C). Ce cycle de températures est accompli automatiquement dans un thermocycleur. Dans notre étude 30 cycles ont été réalisés. Les produits d'amplification sont analysés sur gel d'agarose sous UV après révélation au bromure d'éthidium.

Amplification aléatoire

La technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) proposée par WILLIAMS *et al.* (1990) et WELSH & McCLELLAND (1990) repose sur l'emploi de la PCR mais les produits d'amplification varient en longueur et par la nature de leur séquence. Son application ne nécessite aucune connaissance préalable du génome étudié. Une seule amorce non spécifique dont la séquence nucléotidique est aléatoire (standardisée généralement à 10 nucléotides) est utilisée pour initier la PCR. Différents indices comparant la similarité de profils d'amplification peuvent être calculés et des phénogrammes peuvent être construits. Le traitement des données a été effectué à l'aide du groupe de programmes informatiques de BLACK (1995).

Résultats et Discussion

Extraction d'ADN de sols et de termitières

Le rendement d'ADN extrait estimé à partir de l'extraction de solsensemencés est de 70 à 90% selon la nature du sol (HARRY *et al.*, b). Les quantités d'ADN extrait varient d'environ de 1,5 à 3,5µg d'ADN /g de termitière sèche. Les termitières d'humivores présentent selon les espèces de 2,5 à 3,5 fois plus d'ADN que les sols témoins et les termitières de champignonnistes 1,5 fois plus.

Lors de la lyse directe, des composés « contaminants », comme les substances humiques et les ions métalliques, sont co-extraits. Ces composés constituent un obstacle majeur à l'utilisation de la PCR (Polymerase Chain Reaction) car ils inhibent la *Taq* polymérase en chélatant les ions Mg^{2+} nécessaires à son fonctionnement ou empêchent l'hybridation des amorces (TSAI & OLSON, 1992). De nombreux auteurs se sont heurtés à la difficulté de purification de l'ADN extrait de sol. Trois méthodes principales de purification peuvent être distinguées : les gradients de chlorure de césium, les méthodes électrophorétiques et les méthodes chromatographiques. Les techniques de purification sur gradient de chlorure de césium n'ont pas été retenues dans notre étude car elles sont longues et fastidieuses et ne sont pas toujours suffisantes à elles seules pour obtenir un ADN assez purifié pour être amplifié (OGRAM *et al.*, 1987). En revanche, nous avons testé différentes méthodes électrophorétiques et chromatographiques. Il apparaît pour nos échantillons qu'une double purification électrophorétique et chromatographique est nécessaire (HARRY *et al.*, a). Celle-ci apparaît d'autant plus efficace que des amplifications bactériennes spécifiques (ADNr 16S) ont été obtenues à partir d'ADN extrait de termitières d'humivores particulièrement riches en acides humiques (GARNIER-SILLAM *et al.*, 1989 ; GARNIER-SILLAM & HARRY, 1995).

Caractérisation des ADN_s extraits : amplification spécifique (ADNr 16S)

L'obtention d'amplifications spécifiques de la région 16S bactérienne dans tous les échantillons soumis à l'analyse atteste de la présence de bactéries au sein des termitières d'humivores et de champignonnistes étudiées (HARRY *et al.*, b).

L'utilisation de la PCR apparaît comme un outil adapté pour détecter la présence de bactéries dans ces matériaux très particulier que constituent les termitières. Si la PCR est utilisée ici pour la première fois dans des études portant sur de l'ADN extrait de termitières, différents travaux reposent sur son emploi pour l'étude de la biodiversité bactérienne d'échantillons de sol. Ainsi, la PCR a été utilisée, par exemple, pour l'établissement de phylogénies de bactéries du sol après séquençage de la région de l'ADNr 16S (STACKEBRANDT *et al.*, 1993 ; BORNEMAN & TRIPLETT, 1997).

Diversité des communautés microbiennes : marqueurs génétiques polymorphes

Une autre voie d'étude de la biodiversité bactérienne dans les termitières consiste à utiliser les marqueurs génétiques polymorphes que constituent les RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) (HARRY *et al.*, b). Si de nombreuses études utilisent les RAPDs comme outils de caractérisation de souches bactériennes (BUSSE *et al.*, 1996 pour revue), jusqu'à présent, les RAPDs n'ont été utilisés que dans une seule étude pour évaluer l'effet des pesticides sur les communautés bactériennes du sol (XIA *et al.*, 1995).

Les atouts majeurs de ces marqueurs sont la rapidité avec laquelle il est possible de les révéler sans l'obtention au préalable d'informations génétiques, et leur haut niveau de polymorphisme, dû à l'action de mécanismes variés et au fait que certains de ces marqueurs sont situés dans des régions génomiques comportant des séquences d'ADN répétées (WILLIAMS *et al.*, 1990). Cependant, la bonne reproductibilité des profils d'amplification dépend des conditions de réaction et d'électrophorèse. Aussi, pour cette étude des conditions de réactions standardisées ont été mise au point, et nous ont permis d'obtenir des profils reproductibles. Sur 23 amorces testées, six ont été retenues pour la qualité des profils obtenus. Ces six amorces ont générés 88 marqueurs RAPDs

Notre étude a clairement montré l'influence des termites sur les communautés bactériennes présentes dans leurs termitières. Un plus grand nombre de marqueurs RAPDs sont générés pour les communautés microbiennes des sols témoins et des termitières de *C. subaquartus* alors qu'une moins grande diversité microbienne est observée dans les nids de *N. lamanianus* et *P. niapuensis*. Si l'on considère les nids d'humivores, une plus grande similarité des profils RAPD est observée entre les communautés microbiennes des nids de *N. lamanianus* et de *T. macrothorax* tandis qu'une plus faible similarité est révélée entre celles des nids de *N. lamanianus* et de *P. niapuensis*. Si l'on considère les sols témoins, environ 45% des profils RAPDs sont partagés avec ceux des termitières de l'espèce champignonniste *Odontotermes* et de l'espèce humivore *C. subaquartus*, alors qu'environ 25% sont partagés avec ceux des nids des deux humivores *N. lamanianus* et *T. macrothorax*. Lors de l'établissement de phénogrammes, les communautés bactériennes des termitières d'humivores présentent plus de similarité entre elles qu'avec celles du sol témoin, comme l'attestent les hautes valeurs de bootstrap des différents noeuds. Les communautés bactériennes de l'espèce champignonniste apparaissent placées en groupe extérieur comme celles des sols témoins.

Conclusion

Les amplifications spécifiques d'ADNr 16S bactérien attestent la présence de bactéries au sein des termitières d'humivores et de champignonnistes étudiées. De plus, les termites provoquent au niveau des communautés bactériennes des changements quantitatifs reflétés par les taux plus importants d'ADN extrait des termitières par rapport aux sols témoins, et qualitatifs décelés par les marqueurs polymorphes RAPDs. La plus grande quantité d'ADN observée dans les termitières par rapport aux sols témoins s'explique d'une part, pour les termitières d'humivores par l'incorporation de fèces générant un environnement favorable au développement ou au maintien de micro-organismes, d'autre part pour les termitières de champignonnistes par la présence de carbone facilement dégradable apporté par la salive des termites qui sert de ciment aux constructions. Un plus grand nombre de marqueurs RAPDs ont été obtenus pour les sols témoins et les termitières de *Cubitermes subaquartus* révélant leur plus grande diversité en micro-organismes. Des études à long terme ont montré que les conditions micro-environnementales qui règnent dans les fèces d'invertébrés pouvaient être responsable de la succession de communautés bactériennes en fonction de l'âge des fèces (MARTIN & MARINISSEN, 1993).

Les résultats obtenus sont à mettre en relation avec les comportements trophiques et constructeurs des termites qui en modifiant les conditions physiques et chimiques de leurs termitières via l'incorporation de fèces ou l'utilisation de salive-ciment, y induisent par conséquence des modifications microbiennes.

Références

- ATLAS, R.M. & R. BARTHA, 1993. *Microbial ecology, fundamentals and applications*. Third Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., New York, 21-221.
- BLACK, IV W.C., 1995. FORTRAN programs for the analysis of RAPD-PCR markers in populations. Colorado State University, Ft. Collins, CO 80523.
- BORNEMAN, J. & E.W. TRIPLETT, 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia : evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 : 2647-2653.
- BUSSE, H.J., E.B. DENNER & W. LUBITZ, 1996. Classification and identification of bacteria : current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology* 47 : 3-38.
- GARNIER-SILLAM, E. & M. HARRY, 1995. Distribution of humic compounds in mounds of some soil-feeding termite species of tropical rainforests : its influence on soil structure stability. *Ins Soc.* 42 : 167-185.
- GARNIER-SILLAM, E., J. RENOUX & F. TOUTAIN, 1989. les composés humiques des termitières de *Thoracotermes macrothorax* (humivore) et de *Macrotermes mulleri* (champignonniste). *Soil Biol. Biochem.* 21 : 499-505.
- HARRY, M., B. GAMBIER & E. GARNIER-SILLAM (a). Evaluation of ten electrophoretical and chromatographical methods for purifying DNA extracted from soils and termite mounds for polymerase chain reaction applications. *Soumis*.

- HARRY, M., N. JUSSEAUME, B. GAMBIER & E. GARNIER-SILLAM (b). Molecular analysis of microbial communities in mounds of some tropical soil-feeding and fungus-growing termite species. *Soumis*
- HOLBEN, W.E., J.K. JANSSON, B.K.CHELM & J.M.TIEDJE, 1988. DNA Probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 703-711.
- KEYA, S.O., N.K. MURERIA, & M.A. ARSHAD, 1982. Population dynamics of soil microorganisms in relation to proximity of termite mounds in Kenya. *J. Arid Environ.* 5 : 353-359.
- LEE, K.E & T.G.WOOD, 1971. Physical and chemical effects on soils of some Australian Termites, and their pedological significance. *Pedologia* 2 : 376-409.
- LOBRY DE BRUYN, L.A., & A.J. CONACHER, 1990. The role of termites and ants in soil modification : a review. *Aust. J. Soil Res.* 28 : 55-93.
- MARTIN, A. & J.C.Y. MARINISSEN, 1993. Biological and physical chemical processes in excrements of soil animals. *Geoderma*, 56, 331-347.
- MEIKLEJOHN, J., 1965. Microbiological studies on large termite mounds. *Rhod. Zamb. Mal. J. Agric. Res.* 3 : 67-79.
- NEI, M. & W. LI, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *P. Natl Acad. Sci. USA* 76 : 5269-5273.
- OGRAM A., G.S. SAYLER & T. BARCLAY, 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Meth.* 7 : 57-66.
- SAIKI, R.K., S. SCHARF, F.A. FALOONA, G.T. HORN, H.A. ERLICH & N. ARNHEIM, 1985. Enzymatic amplification of fl-globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230 : 1350-1354.
- STACKEBRANDT E., W. LIESACK, & B.M. GOEBEL, 1993. Bacterial diversity in soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *The FASEB Journal*, 7, 232-236.
- TSAI, Y., & B.H. OLSON, 1992. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 2292-2295.
- WELSH, J. & M. MCCLELLAND, 1990. - Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. - *Nucleic Acids Research*, 18 : 7213-7218.
- WILLIAMS, J.G.K., A.R. KUBELIK, K.J. LIVAK, J.A. RAFALSKI, & S.V. TINGEY, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18 : 6531-6535.
- XIA X., J. BOLLINGER, J. & A. OGRAM, 1995. Molecular analysis of the response of three soil microbial communities to the application of 2,4-D. *Mol. Ecol.* 4 : 17-28.

Keys words : Termite mounds, DNA, Bacterial communities, PCR, 16S rDNA, RAPD
Mots clés : Termitières, ADN, Communautés bactériennes, PCR, ADNr 16S, RAPD