UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte

THÈSE présentée par :

Caroline MICHAUD

soutenue le : **19 décembre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**

Discipline / Spécialité : Sciences de la Vie

DYNAMIQUE DES SYMBIOSES MUTUALISTES HÔTES-MICROBIOTES :

Mode et efficacité de transmission des symbiotes dans les populations du termite xylophage *Reticulitermes grassei*

THÈSE dirigée par :

M. DEDEINE Franck	HDR, Maître de Conférences, Université de Tours

RAPPORTEURS :

M. FERDY Jean-Baptiste	Professeur, Université Paul Sabatier Toulouse III
Mme MOUTON Laurence	HDR, Maître de Conférences, Université Claude Bernard Lyon 1

JURY :

M. DEDEINE Franck	HDR, Maître de Conférences, Université de Tours
M. FERDY Jean-Baptiste	Professeur, Université Paul Sabatier Toulouse III
Mme HUGUET Elisabeth	Professeur, Université de Tours
M. LECLERCQ Sébastien	Chargé de Recherche, INRA Centre Val de Loire
Mme MOUTON Laurence	HDR, Maître de Conférences, Université Claude Bernard Lyon 1
M. SICARD Mathieu	Professeur, Université de Montpellier

"*We know it well that none of us acting alone can achieve success.*"

Nelson Mandela

Discours d'investiture – 10 mai 1994

À mon frangin, Antoine, dont j'ai toujours été fière.

Remerciements

*En premier lieu, je tiens à remercier **ma famille** qui m'a toujours soutenue dans mon parcours et mes projets, ce depuis mon plus jeune âge et même si je n'ai pas toujours été très présente à leurs côtés, surtout ces derniers temps. Merci à mes parents, mon frangin et sa chérie, ma mamie, Nanou, Karine, Flo et Jacquot pour votre patience et votre présence ! Je sais que vous comprenez que ça prend du temps, mais merci de ne pas m'en tenir rigueur !*

*Merci également à tous **mes 'vieux' amis** avec qui les choses ne changent pas même si on ne se voit qu'une fois par an – mon Mika (ça y est, notre amitié a atteint sa majorité !), Rourou, Marinne, Marion, Elo, Cassandre, Amélie – restez perchés, vous êtes au top ! Un grand merci à **Damien** qui m'a toujours soutenue et a toujours cru en moi et mon projet. Et un énorme et sincère merci spécial nounours de grand-frère : merci **Manu** pour tout depuis maintenant pas mal d'années ! Merci pour ton amitié, ton soutien, ton écoute, tes conseils, nos randos-discussions, et ce, que ce soit au niveau personnel ou scientifique, merci d'avoir toujours été là et pour tout le reste ! Merci aussi à ta famille au grand cœur qui m'a accueillie à bras ouverts. 'Accessoirement', je te remercie pour la relecture de ce manuscrit qui, je pense, serait plein de coquilles sans !*

*Merci à **Joël**, **Philippe** et **Sophie** d'avoir fait partie de mon comité de thèse et de m'avoir apporté de précieux conseils, de l'assurance et du soutien pour la dernière ligne droite de ce projet. Un grand merci Joël pour ton aide et tes conseils en stats (qu'est-ce que ça aurait donné sans !?). Merci également à **Elisabeth**, en tant que marraine et membre de mon comité ainsi que de mon jury de thèse, pour la bienveillance dont elle fait toujours preuve, pour ses conseils et son soutien, et pour les petites discussions de coin de couloir pour savoir si tout va bien.*

*Je remercie également les rapporteurs de mon manuscrit, **Jean-Baptiste** et **Laurence**, ainsi que les autres membres de mon jury de thèse, **Mathieu** et **Sébastien**, d'avoir accepté et pris du temps pour évaluer ce travail de thèse.*

***Franck**, mille mercis à toi pour énormément de choses. Tout d'abord, un très grand merci de m'avoir confié ce bébé et d'avoir toujours cru en moi pour arriver au bout de mon projet (et non du tien !) en faisant mon petit bonhomme de chemin. Merci de la confiance aveugle que tu m'as accordée dès le début de ma thèse, pour tous les conseils fructueux que tu as pu me donner, pour nos discussions enrichissantes, ce que tu m'as apporté au niveau scientifique, ta disponibilité, ton écoute et ton honnêteté en toute circonstance, et surtout pour ton soutien sans faille tout au long de ces trois ans. Merci de m'avoir poussée à me surpasser, mais merci également d'avoir compris que derrière ma carapace de rire se cachait une grande sensibilité et d'en avoir tenu compte dans les changements de décision stratégiques pour s'adapter au mieux à mes besoins. Je te remercie de m'avoir portée au court de ce projet, surtout dans les moments de doute, et merci de m'avoir répété de me faire confiance, je crois que je commence à y arriver ! Je suis contente d'avoir eu la chance de travailler avec toi, ce Franck Dedeine des papiers* Wolbachia *que je plaçais sur un piédestal avant même de te rencontrer et que j'admire toujours autant, même plus, tant tes connaissances et tes idées sont stimulantes et me mettent des paillettes dans les yeux. La personne que je suis devenue est en partie le phénotype étendu de ton interaction bénéfique avec moi, et j'espère ne pas avoir été un tricheur à mon insu… !*

***Géraldine**, merci pour ton soutien, tes conseils et ton point de vue extérieur au cours de ce projet. Merci de t'être investie dans mon projet quand je suis venue te voir et de ne pas m'avoir tenue rigueur du changement de cap de cette thèse quasiment à son début. Je te remercie également pour les petits moments 'détente et discussion' que tu m'as apportés et qui m'ont permis de relâcher la pression et de relativiser.*

*Je souhaite également remercier très sincèrement **Simon** pour ses grands soutien et investissement dans mon projet de thèse. Merci à toi de m'avoir tout appris de la collecte à l'élevage de termites, en passant par la case biomol pour être sûr que tout se passe bien. Je te remercie également pour tous nos échanges, pour ton humour et pour tout le reste.*

*Ah, **Annie**… Je te remercie d'avoir eu confiance en moi et ma psychose des contas pour la paillasse. Je tiens à énormément te remercier pour l'investissement que tu as fait pour m'enseigner le langage robot pipeteur et les trucs et astuces de la PCRq, même si ça t'a donné quelques sueurs froides parfois (et j'en suis désolée !) et que ça ne m'a pas empêché de rater des étapes et des plaques... Merci également pour ton amitié, toutes nos discussions (scientifiques ou non) et nos rigolades, je sais qu'on se comprend !*

*Un très grand merci à **Vincent** de m'avoir enseigné les bases de la bioinfo et des stats pour les données métabarcoding. Merci pour ta patience, tes conseils et explications, les « à ton avis ? » pour me faire réfléchir, mais aussi pour ton humour sarcastique et les discussions autour d'une (bonne ? Ça reste à voir…) bière !*

*A special thanks to **the Brune lab group**, danke schöne! Thank Andreas for welcomed me in your lab for few months and thank you for our scientific discussions and your helpful advices and remarks. I want to thank all people I met at the MPI, in particular Katja, Silvana, Undine, Hui Qi, Manuel, Yulin, Pengfei, Chris, Tom, Fabienne and Joline to make me feel like at home, for the good life at work and for parties! See you in France (or anywhere) guys!*

*Merci **aux Soriens** pour la bienveillance et les remarques constructives lors des réunions d'équipe, pour la bonne ambiance générale et pour les activités sociales qui font de cette équipe la plus chouette de toutes !*

*Je remercie **la super team secrétariat** de l'IRBI sans qui les ordres et retours de mission seraient une grande prise de tête (entre autres). Je remercie tout particulièrement Nathalie et Marjorie pour leur bonne humeur permanente qui redonne toujours le sourire.*

*Merci également à toutes les personnes que j'ai pu croiser à l'IRBI - **permanents, non permanents et étudiants** – passées et présentes… Une pensée en particulier pour Karine, Carole, Fernando, Alex, Estéban, Guillaume, Sam, Lou, Cristela, Mélanie, Anna, Max, Marion, Julie, Justine, Carole-Anne, mon chouchou le Stéphanois, Martin, Timothée, Henry, Sophie, Paul…*

*Et un merci tout particulier à **Diane**, ma partenaire d'exil en terres germaniques. Merci pour ton accueil et les visites, et pour nos discussions sur la vie et le post-thèse. Je n'en doute pas, tu vas t'épanouir dans ta nouvelle voie !*

Je tiens particulièrement et sincèrement à remercier mes amis et (ex-)collègues de catégorie A (et leurs plus un) qui font ou ont fait de l'IRBI un endroit très agréable où travailler et des sorties un moment de rigolade et de détente absolues. Je souhaite dire bien évidemment un grand merci à la team du Bureau du Milieu d'en avoir fait le meilleur bureau du monde avant mon exil chez les 'grands' ! Merci à tous (sans ordre de préférence, bien évidemment !) : ***ma Fophie d'Amour*** *pour les soirées entre filles, ton supra-soutien, les phrases et activités de remotivation, nos discussions scientifiques et non scientifiques et pour tout le reste (parce-que ça serait vraiment trop long à écrire, mais tout simplement parce-que tu es mon Turk… <3) ! ;* ***Nyny****, #BFF biologiste, pour la girl power attitude, ta bonne humeur permanente et tes supers conseils de grande sœur, merci de veiller sur nous ! ;* ***Chouquette*** *pour ton côté sans prise de tête, tes blagues (surtout les nulles, c'est celles qui me font le plus rire) et tes conseils pour la vie de tous les jours, et* ***Julie*** *pour tous tes petits plats succulents et tests culinaires, merci d'avoir pris soin de nous (entre autres) ! ;* ***Flo*** *pour ton humour sarcastique, tes conseils de papa (oui c'est moi la marraine, mais bon…) et pour les soirées défoulement à la piscine (certes rares depuis plusieurs semaines, mais on va y retourner !), et* ***Suzie*** *pour ta bonne humeur et ta gentillesse ;* ***Lulu*** *pour ta gentillesse et ton humour noir, et parce-que nous on se comprend, que la biomol c'est de la vraie science et que le comportement c'est pour les nuls ;-) ;* ***Moumour*** *pour ton côté (trop ?) zen qui m'a permis de relativiser et voir les choses autrement, et pour les potins, les p'tits-déjs et les piña-coladas of course ! ;* ***Antoine*** *pour nos discussions souvent scientifiques, tes conseils et tes blagues très bien placées (non, pas où tu crois) ;* ***Lorène*** *pour les moments de rigolade et les discussions entre filles avec souvent un humour très trash ;* ***Bea*** *pour les féministes assumées que nous sommes et ta force de vivre ;* ***Nico*** *pour le partage de la quasi-potomanie (mince, c'était confidentiel !?) et pour les discussions souvent perchées mais existentielles ;* ***Elie Morin*** *(à prononcer avec l'accent évidemment) pour tes blagues, nos délires et nos papotages de tout et de rien ;* ***Marie-Anne****, merci pour tous nos échanges, pour tes conseils et pour le métal, et merci à* ***ton barbu*** *pour sa fausse méchanceté ;* ***Clémence*** *pour ta gentillesse et tous nos questionnements sur la vie et le reste ;* ***Vaness*** *pour les pruneaux bien évidemment mais surtout pour le soleil de bonne humeur que tu nous donnes ;* ***Aurélia*** *et* ***Bruno*** *pour votre positivité, la découverte de nouvelles choses et le rêve d'une vie autrement ; et* ***Dorian*** *pour ton humour et les cocktails en soirée.*

*A tous, merci pour TOUT : votre amitié et votre incommensurable soutien, pour les moments de détente autour d'un thé/café/gâteau/bière/bonne bouffe, la bonne humeur générale, les clashs, les remontages de moral, les coups de gueule, les blagues à FORT potentiel et les nulles ; et plus sérieusement pour nos discussions scientifiques, les échanges autour de nos projets et les coups de pouces ! Je suis contente de vous avoir connus et d'avoir fait un bout de chemin avec vous ; ça ne veut pas dire que je vous lâche, vous allez encore m'avoir sur le dos… Mais vous allez me manquer, parc'que j'vous aime p***** !*

Enfin, je souhaite remercier ***Gildas*** *d'avoir été mon pilier et mon échappatoire ces dernières semaines. Merci pour ta présence, ta patience et ton grand soutien. Et surtout, je te remercie pour tous ces moments passés ensemble qui me rendent heureuse, merci d'avoir donné ce nouveau souffle à ma vie.*

Caroline

Résumé

De nombreux organismes pluricellulaires vivent en association symbiotique avec des microorganismes qui leur procurent des avantages pour leur survie et leur reproduction. La transmission des symbiotes des parents aux descendants (transmission de mode 'vertical') devrait contribuer à stabiliser l'association, notamment en améliorant le degré de fidélité entre partenaires. A ce jour, cependant, l'efficacité de la transmission verticale a rarement été étudiée, en particulier dans les systèmes symbiotiques où les hôtes hébergent une communauté microbienne (ou 'microbiote') composée de nombreux taxa microbiens interagissant les uns avec les autres et avec leur hôte.

Les termites dits 'inférieurs' (tous les termites à l'exception de la famille des Termitidae) sont des insectes sociaux xylophages qui vivent en symbiose avec un microbiote intestinal complexe composé d'archées, de bactéries et de protistes (eucaryotes unicellulaires) leur permettant de se nourrir des fibres de lignocellulose composant le bois. La transmission verticale des symbiotes chez les termites est encore peu connue, bien qu'il soit largement admis que ces symbioses représentent un des rares cas où les symbiotes se transmettent à la descendance par les deux parents (transmission biparentale). La fondation de nouvelles colonies de termites est assurée par un couple de reproducteurs ailés (la reine et le roi) essaimant de leur colonie parentale. Dans les couples royaux monogames établis, les deux parents transmettraient leurs symbiotes intestinaux à leurs larves par trophallaxie proctodéale, c'est-à-dire l'échange de fluides riches en symbiotes de l'anus des parents à la bouche de leurs descendants. Pour pouvoir être transmis, les symbiotes doivent être présents dans les reproducteurs. Il est généralement admis qu'une telle route de transmission pourrait contribuer à stabiliser ces symbioses, bien qu'aucune étude n'ait à ce jour testé cette hypothèse.

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier le mode et l'efficacité de transmission des symbiotes (protistes et bactéries) composant le microbiote intestinal du termite xylophage *Reticulitermes grassei*. Nous avons séquencé les gènes ribosomaux 18S (pour les protistes) et 16S (pour les bactéries) de 24 colonies de *R. grassei* de deux populations françaises. Pour chaque colonie, les communautés microbiennes des intestins de 14 reproducteurs ailés (7 femelles et 7 mâles) et d'un pool d'intestins de 10 ouvriers ont été caractérisées. Le taux de transmission verticale de chaque taxon microbien détecté a été estimé par sa fréquence dans les reproducteurs.

Nos résultats ont révélé des modes de transmission contrastés entre groupes de symbiotes. Les protistes semblent principalement se transmettre verticalement par les deux reproducteurs fondant les néo-colonies. Bien que généralement efficace, le taux de transmission verticale des protistes est néanmoins variable entre taxa, allant de 0.416 à 1 avec une moyenne de 0.897. A l'inverse, la plupart des bactéries présentent des taux de transmission verticale faibles variant de 0 à 1 avec une moyenne de 0.233. De plus, environ 17 % des OTUs bactériens n'étaient pas du tout présents dans les reproducteurs mais sont pourtant abondants dans l'intestin des ouvriers de termites. Ces résultats suggèrent que la plupart des taxa bactériens ne se transmettent pas uniquement verticalement, mais semblent s'acquérir par les colonies à partir de l'environnement. Nous avons également mis en évidence une relation positive entre les taux de transmission des symbiotes et leur prévalence dans les populations hôtes. Cependant, les résultats obtenus sur les protistes indiquent que seul le taux de transmission d'un symbiote n'explique pas sa prévalence dans les populations. Ensemble, ces résultats permettent de mieux connaître l'écologie de la transmission des symbiotes intestinaux chez les termites, constituant un prérequis indispensable pour mieux comprendre la dynamique et le maintien de ces symbioses mutualistes.

Mots-clés : Symbiose nutritionnelle, microbiote intestinal, maintien du mutualisme, transmission verticale et horizontale, fidélité entre partenaires, Rhinotermitidae, bactéries, protistes flagellés.

Abstract

Microbial mutualistic symbioses are widespread in nature where they often play a central role in the functioning of ecosystems, but mechanisms promoting their stability across generations are not fully understood. A vertical mode of symbiont transmission (from parents to offspring) is thought to ensure partner fidelity and stabilization, although the efficiency of vertical transmission has rarely been investigated, especially in the majority of cases where host individuals do not harbour a single symbiont species, but live in association with a diverse community of microorganisms (microbiota) interacting with each other and with the host.

The so-called 'lower' termites (all termites except members of the Termitidae family) are wood-feeding social insects living in symbiosis with a complex gut microbiota composed by archaea, bacteria and protists (unicellular eukaryotes) helping them to feed on lignocellulose. Vertical transmission of gut protists in termites is poorly known, although it is widely admitted that these symbioses represent one of the very rare cases where symbionts are transmitted to the offspring by both parents (biparental transmission). The foundation of new termite colonies is insured by a couple of winged reproductives (the queen and the king) that swarmed from their parental colony. In the established royal monogamous couples, both parents are thought to pass their gut symbionts to the offspring by proctodeal trophallaxis, an exchange of symbiont-rich fluids from the anus of parents to the mouth of their descendants. To be vertically transmitted, symbionts must be in reproductives. It is generally admitted that such a transmission route could contribute to stabilise these symbioses, but to date, no study tested this hypothesis.

The main objective of this work was to study the mode and efficiency of transmission of symbionts (protists and bacteria) composing the gut microbiota of the wood-feeding termite *Reticulitermes grassei*. We sequenced the 18S (for protists) and the 16S (for bacteria) ribosomal genes from 24 colonies of *R. grassei* collected in two French populations. For each colony, the microbial community was characterized from the gut of 14 swarming reproductives (7 females and 7 males) and from a pool of 10 worker guts. The vertical transmission rate of each detected microbial taxon was estimated by its frequency among the reproductives.

Results revealed contrasted transmission modes between groups of symbionts. Protists seem mainly vertically transmitted by both reproductives founding new colonies. Although generally efficient, the vertical transmission rate of protists is variable between taxa, ranging from 0.416 to 1 with an average of 0.897. Conversely, most bacteria have low transmission rates varying from 0 to 1 with an average of 0.233. Moreover, around 17 % of bacterial OTUs were not present in reproductives but were abundant in guts of termite workers. These results suggest that the majority of bacterial taxa is not only vertically transmitted but seems to be acquired by the environment. We also found a positive relationship between the transmission rate of symbionts and their prevalence within host populations. However, results obtained on protists reveal that alone the transmission rate of a given symbiont cannot explain its prevalence within populations. Altogether, these results allow to better know the ecology of transmission of gut symbionts in termites, an essential prerequisite to better understand the dynamic and the maintenance of these mutualistic symbioses

Key words: Nutritional symbiosis, gut microbiota, mutualism maintenance, vertical and horizontal transmission, partner fidelity, Rhinotermitidae, bacteria, flagellate protists.

Caroline MICHAUD



9 rue du pont qui tremble
86160 Brion – France
+ 33 6 75 38 80 00
caroline.michaud.0@gmail.com

Curriculum vitæ

Formation

2016-2019 :	Doctorat en Sciences de la Vie – Université de Tours.
2014-2015 :	Master 2 en Biologie, Écologie et Évolution – Université de Poitiers.
2013-2014 :	Master 1 en Écologie et Éthologie Appliquée – Université Jean Monnet de Saint-Étienne.
2010-2013 :	Licence en Écologie et Biologie des Organismes – Université de Poitiers.
2010 :	Baccalauréat Scientifique, spécialité SVT – Lycée Camille Guérin de Poitiers.

Expérience d'Enseignement et de Recherche

2016-2019 :

Doctorante à l'Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, UMR 7261, CNRS – Université de Tours :

Étude de la **transmission verticale** du microbiote intestinal du termite xylophage *Reticulitermes grassei* à une échelle écologique pour estimer l'**efficacité** de transmission des symbiotes d'une génération hôte à une autre et évaluer le **lien entre taux de transmission et prévalence** des symbiotes dans les **populations** hôtes dans un contexte évolutif.

1 article publié, 1 article en préparation.

***Encadrement** de stagiaires de Master 1 :*

- *Julie Bernier (avril-mai 2017) : barcoding de protistes de termites.*
- *Carole-Anne Dubois et Justine Girardet (avril-mai 2018) : mise au point de la PCRq sur des protistes de termites.*

Référant : Franck Dedeine (franck.dedeine@univ-tours.fr).

Sept. 2018 – Janv. 2019 :

Chercheuse invitée à l'Institut Max Planck pour la Microbiologie Terrestre de Marbourg (Allemagne) :

Apprentissage des outils bioinformatiques et statistiques pour l'analyse de jeux de données métabarcoding.

Financé par l'Office Allemand d'Échanges Universitaires (Short-Term Grant 2018)

Référant : Andreas Brune (brune@mpi-marburg.mpg.de).

2016-2018 :	**Enseignante vacataire** au département de Biologie Animale et Génétique, Université de Tours : - *TD :* Génétique des Populations (L3, 40h). - *TP :* Écophysiologie des Organismes (L3, 36h), Écologie et Éthologie (L2, 40h), Physiologie des Organismes (M1, 12h).
Janv. – Juin 2015 :	**Stagiaire de recherche** au laboratoire Biométrie et Biologie Évolutive, UMR 5558, CNRS – Université Claude Bernard Lyon 1 : Étude de l'**évolution de la virulence** de la souche *Wolbachia w*MelPop chez son hôte *Drosophila melanogaster* pour 1) connaître les **facteurs biotiques et abiotiques** permettant de sélectionner des variants bactériens, et connaître la **répartition** de ces variants dans les tissus hôtes ; et 2) savoir si la **sélection** de variants bactériens peut être **modulée** par des traitements exogènes affectant le stress oxydatif. *1 article soumis.* Référant : Fabrice Vavre (fabrice.vavre@univ-lyon1.fr).
Mars – Avril 2014 :	**Stagiaire de recherche** au laboratoire Écologie et Biologie des Interactions, UMR 7267, CNRS – Université de Poitiers : **Mise au point de marqueurs microsatellites** sur le cloporte *Porcellio dilatatus*, et utilisation de ces marqueurs pour mieux comprendre le **mode de propagation** de *Wolbachia* dans les populations hôtes. *1 article publié.* Référant : Pierre Grève (pierre.greve@univ-poitiers.fr).

Compétences

Concepts :	*Biologie évolutive :* coopération, symbioses, transmission des symbiotes. *Écologie :* génétique des population, biologie des populations, écologie générale. *Biologie moléculaire :* extraction/amplification d'ADN, barcoding, métabarcoding.
Laboratoire :	*Vivant :* élevage d'arthropodes, mesure de traits d'histoire de vie, dissection (≥ 3mm). *Biologie moléculaire :* extraction d'ADN, PCR, PCR quantitative (SYBR et TaqMan), préparation pour génotypage et séquençage. *Microbiologie :* isolation d'un seul protiste (*'single-cell'*) avec un micromanipulateur sous microscope inversé.
Logiciels :	*Traitement de séquences :* - *Basique :* BLASTn, geneious, MAFFT, iTOL, PhyML, TrimAl. - *Génétique des populations :* Fstat, GENETIX, MicroChecker, Structure. - *Métabarcoding :* mothur, oligotyping. *Statistiques :* R.
Terrain :	Collecte d'échantillons. Connaissances basiques en ornithologie et botanique. Comptage.

Langue :	*Anglais :* expression écrite : ■■■■□, expression orale : ■■■■□, compréhension écrite : ■■■■■, compréhension orale : ■■■■■.

Publications et Communications

Publications :	**Michaud C.**, Chupeau C., Bech N., Thierry M., Sicard M., Grève P., Beltran-Bech S. (**2016**). Isolation, characterization and PCR multiplexing of microsatellite loci for two sub-species of terrestrial isopod *Porcellio dilatatus* (Crustacea, Oniscidea). *Genetica*, 144, 223-228. https://doi.org/10.1007/s10709-016-9892-3 **Michaud C.**, Hervé V., Dupont S., Dubreuil G., Bézier A. M., Meunier J., Brune A., Dedeine F. (**2020**). Efficient but occasionally imperfect vertical transmission of gut mutualistic protists in a wood-feeding termite. *Molecular Ecology*, 29(2), 308-324. https://doi.org/10.1111/mec.15322 Monnin D., Kremer N., **Michaud C.**, Villa M., Henri H., Désouhant E., Vavre F. (**soumis**). Experimental evolution of virulence and associated traits in a *Drosophila melanogaster – Wolbachia* symbiosis. Soumis à *PCI Evolutionary Biology*.
Communications orales :	**Michaud C.**, Guyot S., Dupont S., Luchetti A., Dedeine F. (**2018**). Ecological and evolutionary symbiont transmission in a termite-protist mutualism. *II Joint Congress on Evolutionary Biology, Montpellier.* **Michaud C.**, Pichon S., Guyot S., Dupont S., Dubreuil-Fabre G., Dedeine F. (**2017**). Multiple symbiont acquisitions and host shifts in a termite-protist mutualistic association. *Annual meeting of European PhD network "Insect Sciences", Naples (Italie).*
Posters :	Beltran-Bech S., **Michaud C.**, Chupeau C., Sicard M., Thierry M., Bouchon D., Caubet Y., Raimond R., Bech N., Greve P. (**2015**). Cytoplasmic incompatibility induced by *Wolbachia* in the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. *Conférence annuelle du REID, Lyon.* Pichon S., Chevasco V., **Michaud C.**, Dupont S., Bagnères A.G., Dedeine F. (**2017**). Phylosymbiosis in host-associated gut microbial communities in lower termites. *International Conference on Holobionts, Paris.*

Centres d'Intérêt

Randonnée pédestre :	Préférentiellement en montagne pour plusieurs heures. Pour découvrir des paysages, me vider la tête et me surpasser.
Photographie :	En général pendant les voyages et les randonnées. *Appareil :* Canon EOS 550D. *Objectifs :* 18-55 mm et 75-300 mm.

Table des matières

Remerciements 1
Résumé 5
Abstract 7
Curriculum vitæ 9
Table des matières 13
Liste des figures 18
Liste des tables 21
Liste des annexes 22

INTRODUCTION 23

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE 27

1. Stabilité évolutive des symbioses mutualistes 31
   1.1. Qu'est-ce que la symbiose ? 31
   1.2. Diversité des symbioses mutualistes microbiennes 32
   1.3. Le paradoxe du mutualisme 33
   1.4. Mécanismes de stabilisation du mutualisme 35
      1.4.1. Fidélité entre partenaires 35
      1.4.2. Choix de partenaire 37
   1.5. Importance de la transmission des symbiotes 38
      1.5.1. Définition des modes de transmission 38
      1.5.2. Mode de transmission et mécanisme de stabilisation 39
         1.5.2.1. Transmission horizontale et choix de partenaire 40
         1.5.2.2. Transmission verticale 40
            1.5.2.2.1. Fidélité intergénérationnelle 40
            1.5.2.2.2. Coopération entre symbiotes 42
   1.6. Conséquences populationnelles et évolutive de la transmission verticale 43
      1.6.1. A court terme 43
      1.6.2. A long terme 43
2. Diversité des routes de transmission verticale 45
   2.1. Routes intracellulaires 46
   2.2. Routes extracellulaires 48

2.2.1. Chez les insectes solitaires 49
2.2.2. Transmission liée à la socialité 52

CHAPITRE II : PRÉSENTATION DU MODÈLE D'ÉTUDE 57

1. Généralités sur les termites 61
2. Cycle de vie des termites *Reticulitermes* 63
3. Microbiote intestinal chez les termites inférieurs 66
   3.1. Diversité symbiotique 67
      3.1.1. Les protistes flagellés 67
      3.1.2. Les procaryotes 68
   3.2. Système cellulolytique double, fermentation et nutrition 70
4. Maintien des symbiotes dans les colonies 72
5. Modes de transmission des symbiotes 73
   5.1. Transmission verticale biparentale 73
      5.1.1. Transmission sociale par trophallaxie proctodéale 73
      5.1.2. Goulot d'étranglement de la communauté microbienne 75
   5.2. Transmission horizontale 75

CHAPITRE III : PROBLÉMATIQUE & OBJECTIFS 77

1. Problématique générale de la thèse 81
2. Objectifs spécifiques de la thèse 83

CHAPITRE IV : MÉTHODOLOGIE DÉVELOPPÉE 87

1. Préparation des échantillons 91
   1.1. Collecte de colonies et essaimage 91
   1.2. Fondation et suivi des colonies filles (étude 1) 93
   1.3. Dissection des individus (études 2 et 3) 94
2. Étude du microbiote intestinal 95
   2.1. Approche du métabarcoding 95
      2.1.1. Principe général et outils développés 95
      2.1.1. Extraction d'ADN, amplification PCR et séquençage à haut-débit 96
      2.1.2. Traitement des séquences du métabarcoding 97

2.1.2.1. Nettoyage des séquences 98
2.1.2.2. Normalisation des données 98
2.1.2.3. Création et classification des OTUs 99
2.1.2.3.1. Choix de la méthode de création des OTUs 99
2.1.2.3.1.1. Méthode par seuil de dissimilarité 99
2.1.2.3.1.1.1. Détermination du seuil de dissimilarité 99
2.1.2.3.1.1.2. (In)validation de la méthode 101
2.1.2.3.1.2. Méthode sans supervision 101
2.1.2.3.1.2.1. Principe général du *Minimum Entropy Decomposition* 101
2.1.2.3.1.2.2. Validation de la méthode 103
2.1.2.3.2. Assignation taxonomique des OTUs 104
2.2. Approche de PCR quantitative 105
2.2.1. Principe général et outils développés 105
2.2.2. Extraction d'ADN et amplification PCR 107
2.2.3. Traitement des données de PCR quantitative 108

CHAPITRE V : ÉTUDE 1 - EFFICACITÉ DE TRANSMISSION VERTICALE PAR FONDATION DE COLONIES EN LABORATOIRE 111

1. Introduction 115
2. Résultats 116
2.1. Survie des colonies 116
2.2. Reproduction des colonies 118
3. Discussion 119

CHAPITRE VI : ÉTUDE 2 - ESTIMATION DE LA COMPOSANTE α DU TAUX DE TRANSMISSION DES PROTISTES 123

1. Introduction 127
2. Résultats 128
2.1. Caractérisation des communautés de protistes 128
2.1.1. Assignation taxonomique des protistes 128
2.1.2. Richesse des communautés de protistes 130

2.1.3. Structure des communautés de protistes 130
2.1.4. Variation des communautés de protistes entre les colonies 131
2.1.5. Détection et quantification des protistes du genre *Trichonympha* par PCR quantitative 134
2.2. Estimation du taux de transmission des protistes 135
2.2.1. Valeurs α des OTUs par colonie 135
2.2.1. Relation entre valeurs α et abondance relative 137
2.2.2. Valeurs α moyennes des protistes par population 137
2.3. Relation entre taux de transmission et prévalence des protistes dans les populations 139
3. Discussion 141
3.1. Diversité de protistes chez *Reticulitermes grassei* 141
3.2. Efficacité de la transmission verticale des protistes 142
3.2.1. Une transmission verticale efficace mais incomplète 142
3.2.2. Sous-estimation de l'efficacité de transmission ? 143
3.2.3. Biparentalité de la transmission 144
3.3. Relation entre efficacité de transmission et prévalence des protistes dans les populations 145

CHAPITRE VII : ÉTUDE 3 - ESTIMATION DE LA COMPOSANTE α DU TAUX DE TRANSMISSION DES BACTÉRIES 147

1. Introduction 151
2. Résultats 151
2.1. Caractérisation des communautés bactériennes 151
2.1.1. Assignation taxonomique des bactéries 151
2.1.2. Richesse des communautés bactériennes 155
2.1.3. Structure des communautés bactériennes 155
2.1.4. Variation des communautés bactériennes entre les colonies 157
2.2. Estimation du taux de transmission des bactéries 159
2.2.1. Valeurs α des OTUs par colonie 159
2.2.2. Relation entre valeurs α et abondance relative 160
2.2.3. Valeurs α moyennes des OTUs par population 161

2.3. Relation entre taux de transmission et prévalence des bactéries dans les populations 169

3. Discussion 170

3.1. Efficacité de la transmission verticale des bactéries 170

3.1.1. Faibles taux de transmission verticale 170

3.1.2. Sous-estimation de l'efficacité de transmission 171

3.2. Mode de transmission des bactéries 171

CHAPITRE VIII : DISCUSSION GÉNÉRALE & CONCLUSION 175

1. Mode de transmission des symbiotes 180

1.1. Transmission verticale des protistes 180

1.2. Transmission mixte voire horizontale des bactéries 181

2. Efficacité de la transmission verticale des protistes 183

2.1. Une transmission verticale efficace… 183

2.2. … Mais néanmoins imparfaite 184

2.2.1. Mécanismes de perte symbiotique 185

2.2.2. Conséquences d'une transmission imparfaite 188

3. Conclusion : quels facteurs permettent la coopération des symbiotes et la stabilité des associations hôtes-microbiotes ? 192

Références bibliographiques 194

Annexes 229

Liste des figures

Figure 1 : Apparition de symbiotes tricheurs dans une population symbiotique mutualiste. .. 34
Figure 2 : Modèle de la fidélité entre partenaires. ... 36
Figure 3 : Modèle du choix de partenaire. ... 37
Figure 4 : Mode de transmission des symbiotes entre les hôtes. ... 39
Figure 5 : Illustration de comparaison des relations évolutives entre hôtes et symbiotes. ... 45
Figure 6 : Route de transmission des bactéries nutritionnelles intracellulaires dans l'embryon *d'Acyrthosiphon pisum*. ... 48
Figure 7 : Route de transmission des bactéries nutritionnelles intracellulaires chez *Glossina morsitans*. ... 49
Figure 8 : Route de transmission des bactéries nutritionnelles extracellulaire chez *Megacopta punctatissima*. ... 50
Figure 9 : Cycles de vie liés de colonies d'insectes eusociaux et de leur microbiote intestinal. ... 53
Figure 10 : Routes de transmission verticale chez les insectes sociaux. ... 56
Figure 11 : Photographies d'insectes sociaux procurant des soins à leurs jeunes. ... 56
Figure 12 : Arbre phylogénétique schématique des familles de termites et de leur groupe frère les blattes Cryptocercidae. ... 62
Figure 13 : Photographies des différentes castes chez les termites du genre *Reticulitermes*... 64
Figure 14 : Cycle de vie des termites du genre *Reticulitermes*. ... 65
Figure 15 : Photographies d'un ouvrier (au-dessus) et d'un intestin d'ouvrier (en-dessous) de *Reticulitermes grassei*. ... 66
Figure 16 : Microscopie optique des espèces de protistes présentes chez *Reticulitermes flavipes*. ... 68
Figure 17 : Abondance relative et diversité bactérienne dans les intestins de *Reticulitermes speratus*. ... 68
Figure 18 : Procédés microbiens majeurs dans la panse des termites inférieurs. ... 71
Figure 19 : Cycle de l'azote chez les termites inférieurs. ... 72
Figure 20 : Fondation d'une nouvelle colonie de termites. ... 74
Figure 21 : Dessins d'observation (A) de reine et roi s'occupant de leurs œufs et (B) d'une reine procurant une trophallaxie proctodéale à une larve. ... 75
Figure 22 : Transmission verticale du pool symbiotique des deux colonies parentales à une colonie fille chez les termites. ... 85

Figure 23 : Carte schématisant la distribution de *Reticulitermes grassei* et *R. flavipes* en Europe. 92
Figure 24 : Dispositif expérimental d'essaimage des alates au laboratoire. 93
Figure 25 : Pipeline bioinformatique utilisé pour le traitement des séquences des trois jeux de données du métabarcoding. 97
Figure 26 : Dissimilarité entre séquences de *Trichonympha* provenant de termites du genre *Reticulitermes*. 100
Figure 27 : Principe du *Minimum Entropy Decomposition* 102
Figure 28 : Courbes de raréfaction des données oxymonades (A), parabasaliennes (B) et bactériennes (C). 104
Figure 29 : Arbre phylogénétique des *Trichonympha* de termites. 106
Figure 30 : Courbes standards des trois gènes amplifiés par PCR quantitative. 109
Figure 31 : Courbes de fusion des trois gènes cibles étudiés par PCR quantitative 110
Figure 32 : Courbes de survies des colonies de termites fondées en laboratoire par type de croisement. 117
Figure 33 : Nombre de larves ou d'ouvriers par colonie en possédant au moins une ou un et nombre moyen d'individus par colonie après 14, 65 et 92 semaines de fondation (S14, S65 et S92). 119
Figure 34 : Carte de collecte des colonies de *Reticulitermes grassei* dans les populations d'Oléron (A) et de Pissos (B). 128
Figure 35 : Résultats d'assignation des taxa oxymonades et parabasaliens au niveau espèce et abondance relative dans les jeux de données. 129
Figure 36 : Analyse en coordonnées principales de la structure des communautés oxymonades et parabasaliennes des ouvriers (A et B) et des alates (C et D). 132
Figure 37 : Clusterisation hiérarchique des colonies en fonction de leur communauté en OTUs de protistes (A) et en espèces de protistes (B). 133
Figure 38 : Proportion en *Trichonympha* TgA et TgB dans les ouvriers individuels par approche de PCR quantitative. 135
Figure 39 : Pourcentage d'OTUs de la colonie présents dans les 14 alates en fonction des valeurs α. 136
Figure 40 : Valeurs α des OTUs en fonction de leur abondance relative dans les alates et les ouvriers. 137
Figure 41 : Pourcentage d'OTUs de la population présents dans les alates en fonction des valeurs α moyennes. 138

Figure 42 : Prévalence observée (p_o) des OTUs de protistes dans les populations en fonction de leur valeur α moyenne. 140
Figure 43 : Assignation taxonomique et abondance relative des séquences bactériennes. 154
Figure 44 : Richesse bactérienne observée dans les alates femelles et mâles des deux populations. 155
Figure 45 : Analyse en coordonnées principales de la structure des communautés bactériennes des ouvriers (A) et des alates (B). 157
Figure 46 : Pourcentage d'OTUs bactériens de la colonie présents dans les alates en fonction des valeurs α. 159
Figure 47 : Abondance relative des OTUs bactériens dans les alates et les ouvriers en fonction de leur valeur α. 161
Figure 48 : Pourcentage d'OTUs bactériens de la population présents dans les alates en fonction de leur valeur α moyenne. 162
Figure 49 : Heatmap des valeurs α moyennes des OTUs du phylum Proteobacteria par sexe par population. 164
Figure 50 : Heatmap des valeurs α moyennes des OTUs du phylum Bacteroidetes par sexe par population. 165
Figure 51 : Heatmap des valeurs α moyennes des OTUs du phylum Firmicutes par sexe par population. 166
Figure 52 : Heatmap des valeurs α moyennes des OTUs du phylum Spirochaetes par sexe par population. 167
Figure 53 : Heatmap des valeurs α moyennes des OTUs du phylum Elusimicrobia par sexe par population. 168
Figure 54 : Prévalence observée (p_o) des OTUs dans la population en fonction de leur valeur α moyenne. 170
Figure 55 : Schéma récapitulatif des facteurs pouvant impacter l'efficacité de transmission verticale chez les termites. 188
Figure 56 : Schéma récapitulatif des facteurs expliquant la prévalence des symbiotes dans les populations de termites. 191

Liste des tables

Table 1 : Routes de transmission de symbiotes mutualistes intracellulaires chez les insectes. 47
Table 2 : Routes de transmission de symbiotes mutualistes extracellulaires chez les insectes solitaires. 51
Table 3 : Routes de transmission de symbiotes mutualistes extracellulaires chez les insectes sociaux. 54
Table 4 : Modalités de croisement des alates entre les différentes colonies de termites. 116
Table 5 : Pourcentage de mortalité des colonies par type de croisement après 14, 65 et 92 semaines de fondation (S14, S65 et S92). 117
Table 6 : Pourcentage de colonies par type de croisement possédant au moins une larve ou un ouvrier parmi les colonies encore vivantes après 14, 65 et 92 semaines de fondation (S14, S65 et S92). 118
Table 7 : Analyse de la variance du modèle approprié au nombre de descendants dans les colonies en possédant. 118
Table 8 : Analyse multivariée de la variance des modèles linéaires généralisés appropriés aux communautés de protistes. 131
Table 9 : Analyse de la variance du modèle linéaire mixte approprié au pourcentage d'OTUs oxymonades et parabasaliens d'une colonie dans les alates. 136
Table 10 : Valeurs α moyennes, prévalences observées (p_o) et prévalences théoriques (p_e) des espèces de protistes dans les populations. 139
Table 11 : Analyse de la variance des modèles binomial (p_o=1 vs p_o<1) et linéaire (p_o<1 uniquement) appropriés à la prévalence observée (p_o) des OTUs de protistes dans les populations. 140
Table 12 : Grandes fonctions métaboliques assurées par les phyla bactériens. 152
Table 13 : Analyse multivariée de la déviance des modèles linéaires généralisés appropriés aux communautés bactériennes. 156
Table 14 : Taxonomie des 88 OTUs composant le core bactérien des populations de *Reticulitermes grassei*. 158
Table 15 : Analyse de la variance du modèle linéaire mixte approprié au pourcentage d'OTUs bactériens par colonie présents dans les alates. 160
Table 16 : Analyse de la variance du modèle linéaire généralisé adapté au pourcentage d'OTUs bactériens de la population présents dans les alates. 163

Table 17 : Analyse de la variance du modèle linéaire généralisé approprié aux données de prévalence observée (p_o) des OTUs bactériens dans les populations..... 169

Liste des annexes

Annexe 1 : Analyses comparatives et traitement statistique des données..... 231
Annexe 2 : Article 1 publié dans *Molecular Ecology* 239

Introduction

"*There is now growing realization of the importance and ubiquity of associations involving prokaryotes and archaea to every aspect of animal life – bacteria not only enable animals to metabolize otherwise indigestible polysaccharides such as lignin and cellulose, but also shape animal development and behavior.*"

Bosch & Miller (2016)

La plupart des animaux possèdent une communauté microbienne (*i.e.*, un microbiote) dans leurs intestins pouvant jouer un rôle majeur dans les fonctions essentielles de leurs hôtes comme le développement, la nutrition, l'immunité ou encore la reproduction (Bosch & Miller, 2016 ; Douglas, 2018 ; McFall-Ngai *et al*., 2013 ; Moran, Ochman, & Hammer, 2019). Malgré leur présence quasi-universelle dans le règne animal, ces communautés microbiennes intestinales ont commencé à être étudiées il y a à peine une vingtaine d'années, grâce notamment à l'apparition des technologies de séquençage à haut-débit (Hugenholtz, 2002 ; Sogin *et al*., 2006). Ces technologies ont permis de décrire la composition des microbiotes intestinaux et ont révélé le rôle crucial du microbiote dans la biologie des hôtes (Gilbert *et al*., 2018 ; Leitão-Gonçalves *et al*., 2017). Chez l'être humain, le microbiote intestinal jouerait un rôle dans l'exclusion de potentiels pathogènes, dans la modulation du système immunitaire, dans la synthèse de certains nutriments et la dégradation d'autres, ou encore dans le comportement (Cryan & Dinan, 2012 ; Hooper, Littman, & Macpherson, 2012 ; Sekirov, Russell, Antunes, & Finlay, 2010). De plus, certaines études suggèrent que des modifications du microbiote (*i.e.*, des dysbioses) pourraient expliquer, au moins en partie, certaines maladies ou syndromes parmi lesquels l'inflammation des intestins, l'obésité ou encore certaines formes d'autisme ou de dépression nerveuse (Cryan & Dinan, 2012 ; Flint, Scott, Louis, & Duncan, 2012 ; Turnbaugh *et al*., 2006). Des manipulations de microbiote intestinal par transplantation offrent d'ailleurs de nouvelles voies thérapeutiques (Van Nood *et al*., 2013).

Les microbiotes intestinaux peuvent donc avoir une importance écologique et évolutive majeure sur leurs hôtes. Cependant, l'origine et la stabilité évolutive de ces symbioses dites mutualistes dans lesquelles l'hôte et ses microbes coopèrent constituent toujours une problématique mal comprise (Frank, 1998 ; Jones *et al*., 2015 ; Maynard Smith, 1989 ; Sachs, Essenberg, & Turcotte, 2011). Pourquoi des variants microbiens 'égoïstes', lesquels pourraient bénéficier des ressources de leurs hôtes sans produire de réciprocités coûteuses, n'envahissent-ils pas les populations constituant les microbiotes ? Parmi les mécanismes possibles de stabilisation des symbioses microbiennes mutualistes figure la transmission verticale des symbiotes (de parents à descendants), laquelle assure une fidélité entre les partenaires (Sachs,

Mueller, Wilcox, & Bull, 2004). Cette hypothèse n'a pour l'instant reçu que peu d'attention car, jusqu'à présent, les études se sont focalisées sur l'écologie de la transmission verticale dans des systèmes symbiotiques mutualistes simples où un hôte porte une population de symbiotes totalement dépendants vivant dans le cytoplasme des cellules hôtes (Buchner, 1965 ; Douglas, 1989 ; Moran, McCutcheon, & Nakabachi, 2008 ; Russell, Chappell, & Sullivan, 2019).

Pourtant, de nombreuses autres formes de mutualisme existent dans les symbioses, notamment celles entre les animaux et leurs microbiotes intestinaux. Comment sont maintenues ces symbioses hôtes-microbiotes ? Quel est le mode de transmission des symbiotes constituant la communauté intestinale ? La transmission verticale peut-elle exister dans ces systèmes ? Si oui, est-elle efficace à l'échelle des populations ? Le mode de transmission représente-t-il un facteur important dans leur évolution ? Voici les principales questions qui constituent le contexte général de mon travail de thèse.

L'objectif principal de ce projet a été d'étudier **le mode et l'efficacité de transmission des symbiotes constituant la communauté microbienne intestinale chez le termite xylophage *Reticulitermes grassei***. Nous avons souhaité connaître le(s) mode(s) de transmission des différents symbiotes composant le microbiote intestinal de ce termite et, pour les symbiotes présentant une transmission verticale, déterminer l'efficacité de cette transmission et ses conséquences sur la prévalence des symbiotes dans les populations de l'hôte.

Dans le **chapitre I**, j'exposerai par le biais d'une synthèse bibliographique le problème fondamental lié au mutualisme et comment il peut être maintenu au cours du temps, puis je discuterai de la diversité des routes de transmission verticale. Je présenterai ensuite dans le **chapitre II** la biologie de mon modèle d'étude indispensable à la compréhension de mon sujet. La problématique et les objectifs spécifiques seront développés dans le **chapitre III**. Le **chapitre IV** sera consacré à la méthodologie développée. Les résultats des études seront présentés dans les **chapitres V à VII**. Enfin, le **chapitre VIII** présentera la discussion générale qui met en lumière mes résultats afin de mieux comprendre le maintien évolutif des associations hôtes-microbiotes chez les termites et, plus généralement, chez les insectes sociaux.

Chapitre I :

Synthèse bibliographique



© Paride Bertolin (JAB) 2013

1. Stabilité évolutive des symbioses mutualistes

1.1. Qu'est-ce que la symbiose ?

Les êtres vivants interagissent dans leur environnement avec des individus de la même espèce ou d'espèces différentes. Ces interactions ont généralement un impact sur la biologie des individus et leur valeur sélective (*i.e.*, leur survie et leur reproduction). A long terme, ces interactions peuvent donc avoir un effet sur l'écologie et l'évolution des espèces (Oliver & Russell, 2016). Une des interactions interspécifiques connues pour être une force évolutive majeure des espèces est la symbiose (Maynard Smith, 1989). Ce terme, désignant l'association intime entre des organismes d'espèces distinctes, a été introduit par Frank (1877) puis De Bary (1879) au milieu du XIXe siècle pour décrire l'association entre champignons et algues formant les lichens. Ce n'est qu'un siècle plus tard que le concept d'interaction durable a été ajouté à cette définition, prenant ainsi en compte la notion d'interactions répétées au cours du temps entre les génomes des partenaires (Combes, 1995). La symbiose implique au minimum deux partenaires symbiotiques : l'hôte (*i.e.*, l'individu le plus grand) et son symbiote (*i.e.*, l'individu le plus petit).

Bien souvent, le terme 'symbiose' est utilisé de façon restreinte aux associations symbiotiques où les partenaires tirent des bénéfices mutuels de l'interaction (*i.e.* mutualisme). Or, la symbiose évolue le long d'un continuum allant du mutualisme au parasitisme, en passant par le commensalisme (Ewald, 1987). La nature de l'association symbiotique dépend de l'impact de l'interaction sur les valeurs sélectives des partenaires symbiotiques et donc du bilan de la balance entre les coûts et les bénéfices liés à l'association (Ehrman, 1983). Ainsi, une symbiose sera définie comme parasite si le symbiote tire des bénéfices de l'association aux dépens de la valeur sélective de l'hôte (association +/-) ; elle sera définie comme commensale si le symbiote tire des avantages de l'association sans impacter la valeur sélective de son hôte (association +/0) ; et elle sera définie comme mutualiste si chacun des deux partenaires symbiotiques apporte des bénéfices réciproques à la valeur sélective de l'autre (association +/+). Il existe évidemment une gradation continue entre ces trois grands types d'interaction, et surtout, la nature de la symbiose peut être modifiée en fonction de facteurs biotiques et abiotiques, de l'interaction entre eux au cours de la vie des individus et en fonction du contexte environnemental (Konrad, Grasse, Tragust, & Cremer, 2015 ; Lin & Koskella, 2015 ; Martinez *et al*., 2014). De plus, la nature de la symbiose peut changer au cours de l'évolution des

associations (Bull, Molineux, & Rice, 1991 ; Dedeine *et al*., 2001 ; Dedeine, Vavre, Shoemaker, & Boulétreau, 2004 ; Jeon, 1972). Une autre façon de classifier les symbioses dépend de l'endroit où vivent les symbiotes sur l'hôte. Ils peuvent en effet vivre de façon intracellulaire, on parle d'endosymbiose, ou de façon extracellulaire, on parle d'ectosymbiose. Dans ce dernier cas, les symbiotes peuvent être à la surface de leur hôte, se trouver dans des cavités corporelles, ou, de façon plus universelle chez les animaux, les symbiotes peuvent être hébergés dans le tube digestif (Bosch & Miller, 2016).

Une grande diversité de symbioses existe donc, du parasitisme au mutualisme, endosymbiotique ou ectosymbiotique, et beaucoup ont été et sont étudiées dans le cas d'association entre un hôte et des microorganismes : des bactéries, des protistes (*i.e.* des eucaryotes unicellulaires), des champignons ou encore des archées. Ce sont sur ces symbioses microbiennes que je vais focaliser la suite de cette synthèse, et plus particulièrement les symbioses microbiennes mutualistes qui jouent un rôle central dans le fonctionnement de nombreux écosystèmes (Kenkel & Bay, 2018 ; Kiers, Rousseau, West, & Denison, 2003 ; McFall-Ngai *et al*., 2013).

1.2. Diversité des symbioses mutualistes microbiennes

Les symbioses mutualistes sont reconnues comme étant une grande source d'innovations biologiques (Maynard Smith, 1989) notamment car elles peuvent apporter de nouvelles fonctions à l'hôte, leur permettant d'exploiter de nouvelles niches écologiques. Les symbioses sont donc des moteurs de l'évolution et ont permis la radiation adaptative de nombreuses espèces avec comme exemple les eucaryotes issus de l'endosymbiose d'une alphaprotéobactérie avec une cellule hôte affiliée aux archées Asgard (Archibald, 2015 ; Roger, Muñoz-Gómez, & Kamikawa, 2017 ; Zaremba-Niedzwiedzka *et al*., 2017). Il existe trois grands types de mutualismes en fonction de la nature des bénéfices apportés par les symbiotes à leurs hôtes (Boucher, James, & Keeler, 1982) :

(i) Le mutualisme de protection contre des facteurs biotiques ou abiotiques. Par exemple, la bactérie *Serratia symbiotica* peut conférer une protection thermique aux pucerons (Montllor, Maxmen, & Purcell, 2002 ; Russell & Moran, 2005). Chez les coléoptères du genre *Lagria*, les bactéries *Burkholderia* protègent les œufs contre les pathogènes (Flórez & Kaltenpoth, 2017).

(ii) Le mutualisme de transport du partenaire d'un environnement peu opportun vers un environnement plus propice, ou de dispersion des gamètes ou propagules du

partenaire. Les diatomées *Fragilariopsis doliolus* sont en association avec des protistes ciliés planctoniques dont le genre *Salpingella* qui augmentent leur motilité et leur permettent de se déplacer dans la colonne d'eau (Vincent *et al*., 2018). Les guêpes Angaonidae transportent le pollen des figuiers d'une inflorescence à une autre (Weiblen, 2002).

(iii) Le mutualisme nutritionnel qui consiste en la dégradation, la détoxification ou encore la complémentation de l'alimentation de l'hôte. La punaise de lit *Cimex lectularius* possède des bactéries du genre *Wolbachia* qui synthétisent de la vitamine B non présente dans l'alimentation de l'hôte et nécessaire à son développement (Hosokawa, Koga, Kikuchi, Meng, & Fukatsu, 2010).

Les symbioses microbiennes sont maintenant reconnues comme ubiquistes, chaque plante et animal vit en interaction avec des communautés microbiennes, elles jouent donc un rôle central dans le fonctionnement de nombreux écosystèmes (Bosch & Miller, 2016 ; Douglas, 2014 ; Kenkel & Bay, 2018 ; Kiers *et al*., 2003 ; Maynard Smith, 1989 ; McFall-Ngai *et al*., 2013 ; Moran, 2007).

1.3. Le paradoxe du mutualisme

Le mutualisme est défini par des phénotypes coopératifs entre individus hétérospécifiques. C'est une interaction où chaque partenaire apporte des bénéfices à l'autre. Un tel trait ne peut être sélectionné s'il n'avantage qu'une autre espèce (Darwin, 1859 ; Maynard Smith, 1989). Fournir des bénéfices à l'autre partenaire peut être coûteux et ne peut, par conséquent, se maintenir que s'il y a une réciprocité apportant des bénéfices suffisant pour contrebalancer les coûts. Le bénéficiaire doit donc en retour apporter des bénéfices pour contrebalancer les coûts de l'investissement de son partenaire dans la coopération. Ce type de coopération est appelé le modèle de réciprocité dirigée (Sachs *et al*., 2004).

Dans les symbioses microbiennes, les symbiotes sont en compétition pour les ressources limitées de l'hôte et ceux qui exploitent le mieux l'hôte vont gagner la compétition au sein de la population symbiotique. Cette surexploitation correspond à la tragédie des biens communs (Axelrod & Hamilton, 1981 ; Hardin, 1968). Les symbiotes n'investissant pas dans la production de biens communs sont considérés comme étant des 'égoïstes' ou 'tricheurs' (Jones *et al*., 2015). Dans un groupe, on peut s'attendre à ce que la sélection naturelle avantage ces individus tricheurs. Pour être considérés comme tricheurs, ces individus doivent augmenter leur propre valeur sélective tout en diminuant la valeur sélective de leur partenaire par rapport à la

moyenne de la population (Jones *et al*., 2015). Il est important de noter que les individus dits tricheurs *sensu stricto* sont dérivés de coopérateurs. En effet, l'émergence de tricheurs peut uniquement se faire à l'intérieur de populations ou de lignées déjà coopératives. Les individus d'une population non mutualiste tirant des bénéfices au profit de leur partenaire sont des parasites, et non des tricheurs à proprement parler, même s'ils peuvent également menacer la stabilité d'un mutualisme (Jones *et al*., 2015). Dans la suite de ce rapport, le terme tricheur sera donc pris au sens large et comprendra des individus dérivés de coopérateurs et des individus parasites car les deux types existent probablement dans les symbioses microbiennes mais il est difficile de les distinguer.

Les tricheurs peuvent arriver dans le système symbiotique par mutation ou par migration. En effet, les symbiotes microbiens ont généralement un taux de réplication plus rapide que celui de leur hôte. Au cours de ces réplications, le gène impliqué dans la coopération avec l'hôte pourrait muter, l'individu portant le gène muté produirait alors moins voire plus du tout de bénéfices mais bénéficierait toujours des ressources, il pourrait ainsi être sélectionné (Figure 1). Dans les symbioses 'ouvertes', comme celles intestinales dont nous parlerons plus tard dans ce rapport, des symbiotes transitoires peuvent arriver par migration et entrer en compétition avec les mutualistes déjà présents. Puisque les tricheurs n'ont pas de coût lié à l'investissement dans la coopération, ils peuvent être avantagés dans les hôtes (Figure 1).

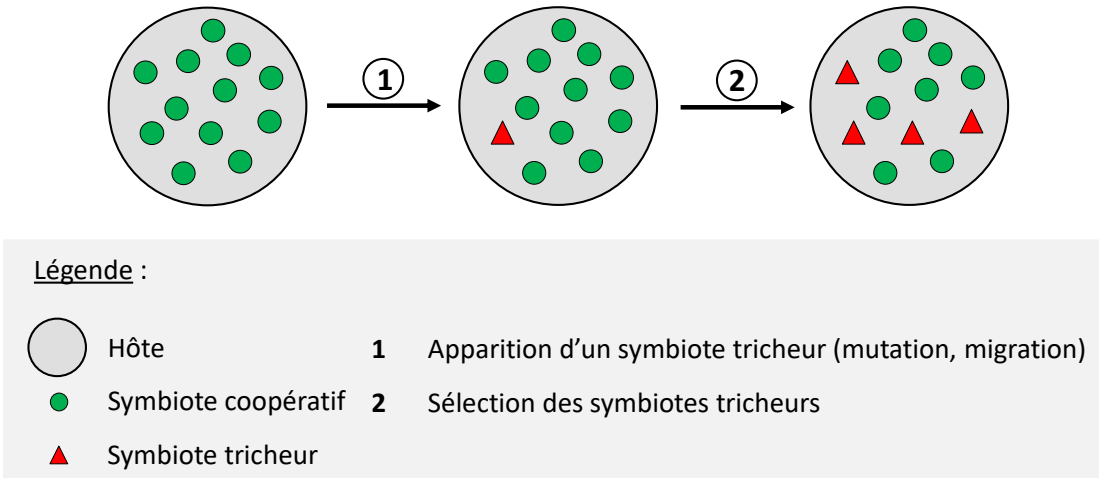


Figure 1 : Apparition de symbiotes tricheurs dans une population symbiotique mutualiste. Les tricheurs peuvent arriver par mutation ou par migration dans la population symbiotique puis être sélectionnés puisqu'ils bénéficient des ressources sans investir dans la coopération.

L'avantage de la tricherie est donc considéré comme un paradoxe de la coopération. Il pose un problème fondamental sur la stabilité et la persistance des mutualismes, et plus

généralement de la coopération, pourtant clés aux niveaux écologique et évolutif. En effet, si les tricheurs sont avantagés par rapport aux mutualistes et sélectionnés dans le système, celui-ci pourrait tendre vers du parasitisme ou tout simplement disparaître. Or, des mécanismes existent et permettent le maintien des symbioses mutualistes au cours du temps (Sachs *et al*., 2004).

1.4. Mécanismes de stabilisation du mutualisme

La réciprocité dirigée peut stabiliser le mutualisme en défavorisant les tricheurs. En effet, un individu 'accepte' un coût pour faire bénéficier un partenaire spécifique, et en retour le partenaire compense ce coût en apportant des bénéfices à l'individu donneur, la réciprocité est donc dirigée vers le partenaire (Sachs *et al*., 2004). Le modèle le plus connu illustrant le modèle de réciprocité dirigée est le jeu du dilemme du prisonnier (Axelrod & Hamilton, 1981 ; Trivers, 1971). Ce modèle a deux principales conditions prérequises : 1) des interactions répétées entre les deux individus, et 2) la capacité de l'individu à moduler son comportement en réponse à l'action de l'autre. La stratégie des représailles (*i.e.*, loi du talion) consiste à coopérer lorsque le partenaire a coopéré lors de la précédente itération, mais de refuser de coopérer s'il ne l'a pas fait (Axelrod & Hamilton, 1981). Le dilemme du prisonnier peut donc être décomposé en deux éléments : 1) la fidélité en retour entre partenaires (interactions répétées entre les partenaires) et 2) le choix de partenaire (réponse modulée au partenaire) qui sont deux mécanismes permettant un maintien évolutif du mutualisme. Dans les symbioses, les microorganismes ont un taux de réplication plus rapide que leurs hôtes, l'apparition de tricheurs par mutation est donc plus probable. De plus, des symbiotes tricheurs peuvent également entrer par migration dans le système symbiotique. Ce sont donc les hôtes qui, en général, développent des mécanismes de stabilisation.

1.4.1. Fidélité entre partenaires

Dans le modèle de fidélité entre partenaires (entre hôte et symbiotes), les intérêts évolutifs des deux partenaires symbiotiques (X et Y) sont alignés puisque les interactions sont répétées (Ewald, 1987 ; Lipsitch, Nowak, Ebert, & May, 1995 ; Sachs *et al*., 2004). Cette interdépendance des valeurs sélectives des partenaires symbiotiques signifie qu'apporter des bénéfices à X va directement et positivement impacter la valeur sélective de Y (Figure 2). Ce retour est automatique et proportionnel à la réponse du partenaire (Figure 2) et ne nécessite pas

une reconnaissance préalable ou un choix du partenaire (Sachs *et al*., 2004). Ce rétrocontrôle automatique va défavoriser les symbiotes tricheurs qui induisent des coûts sur la valeur sélective de leur hôte et donc sur l'investissement qui est fait en retour. Tout cela peut conduire à favoriser les symbiotes les plus mutualistes et ainsi à stabiliser l'association (Sachs *et al*., 2004).

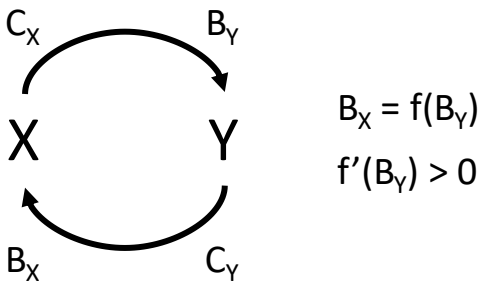


Figure 2 : Modèle de la fidélité entre partenaires. B_X et B_Y sont les bénéfices reçus par X et Y, respectivement. C_X et C_Y sont les coûts perçus par X et Y, respectivement. Les bénéfices apportés par Y à X dépendent proportionnellement de ceux apportés par X à Y ($B_X = f(B_Y)$) et sont positifs ($f'(B_Y) > 0$). D'après Sachs *et al*. (2004).

Un bel exemple de fidélité entre partenaires est l'association entre les plantes myrmécophiles du genre *Acacia* et les fourmis du genre *Pseudomyrmex*. Les acacias produisent des épines creuses servant d'endroits où nicher pour les fourmis ainsi que des récompenses nutritives sous forme de nectar extrafloral et d'organes nutritifs (Belt, 1874 ; Heil, Baumann, Krüger, & Linsenmair, 2004 ; Heil, Greiner, *et al*., 2004 ; Janzen, 1974). En échange, les fourmis protègent la plante hôte contre les prédateurs herbivores, contre les végétaux pouvant entrer en compétition avec elle et contre de potentiels pathogènes (Belt, 1874 ; Janzen, 1966). Les lignées d'acacias produisant beaucoup de récompenses nutritives et de niches sont mieux défendues et moins exploitées par les fourmis que les lignées d'acacias en produisant moins, même si elles sont en association avec une même espèce de fourmi (Heil *et al*., 2009). La proportion de nectar produite par les plantes est corrélée au niveau de défense des fourmis, elles n'en produisent d'ailleurs pas lorsque des espèces tricheuses les colonisent (Heil *et al*., 2009). La baisse ou la non production de ressources nutritives défavorise directement les fourmis. La fidélité entre les acacias et les fourmis n'est pas intergénérationnelle puisque chaque nouvelle plante doit être colonisée par des fourmis présentes dans leur environnement qui ne proviennent pas nécessairement des plantes parentes. Cette fidélité entre partenaire a lieu sur du court terme

et dure le temps de la durée de vie de l'individu acacia et de la colonie de fourmis (Sachs *et al*., 2004).

1.4.2. Choix de partenaire

Dans le cas du mécanisme de choix de partenaire, l'hôte Y interagit avec des symbiotes X. Il est capable de reconnaitre les plus coopératifs et de sélectivement les choisir soit en les récompensant, soit en sanctionnant les moins coopératifs (Figure 3) (Sachs *et al*., 2004). Ceci implique que l'hôte soit capable d'estimer le niveau de coopération du symbiote et de réguler son investissement coopératif vis-à-vis du symbiote (Sachs *et al*., 2004 ; West, Kiers, Simms, & Denison, 2002). L'hôte est cependant dépendant du nombre de symbiotes présents dans l'environnement (Noë & Hammerstein, 1994) et il peut être coûteux de ne pas s'associer avec un partenaire peu coopératif si aucun autre n'est disponible dans l'habitat (*i.e.*, 'contexte-dépendant') (Sachs *et al*., 2004).

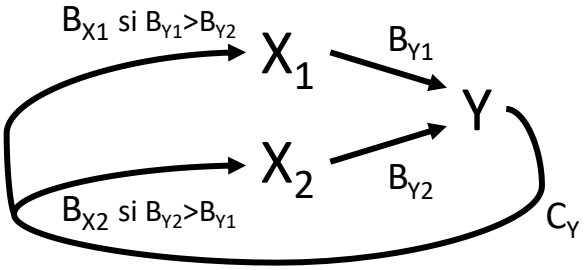


Figure 3 : Modèle du choix de partenaire. B_{X1} et B_{X2} sont les bénéfices reçus par X_1 et X_2, respectivement. B_{Y1} et B_{Y2} sont les bénéfices reçus par Y donnés par X_1 et X_2, respectivement. C_Y est le coût perçu par Y. D'après Sachs *et al*. (2004).

Un des exemples les plus connus de sanction des tricheurs par l'hôte est l'association nutritionnelle entre les plantes légumineuses et les bactéries du genre *Rhizobium* (Kiers *et al*., 2003 ; Simms & Taylor, 2002 ; West *et al*., 2002). Ces bactéries sont présentes dans le sol et entrent en symbiose avec des légumineuses en formant des nodules au niveau des racines. Les *Rhizobia* sont capables de fixer l'azote atmosphérique et de le rendre disponible et assimilable par la plante. En échange, les bactéries reçoivent des nutriments et de l'oxygène. Kiers et collaborateurs (2003) ont simulé sur des plants de soja des lignées de bactéries coopératrices ou non en remplaçant pour ces dernières l'azote atmosphérique par du gaz argon. Ils ont pu mettre en évidence une diminution de la valeur sélective de ces bactéries 'tricheuses', les plantes ont été capables de les discriminer et de les sanctionner en les privant d'oxygène (Kiers *et al*.,

2003). Ces mécanismes de choix de partenaire forcent la coopération par une sélection des génotypes symbiotiques les plus coopératifs ce qui permet de stabiliser l'association mutualiste (Sachs *et al*., 2004). Il peut en résulter une coadaptation entre l'hôte et les symbiotes.

1.5. Importance de la transmission des symbiotes

La transmission des symbiotes au cours des générations hôtes est essentielle pour la perpétuation des associations hôtes-symbiotes. En effet, pour pouvoir être maintenus au cours du temps, les symbiotes doivent être transmis à de nouveaux hôtes avant ou peu de temps après la mort de leur hôte actuel (Ebert, 2013).

1.5.1. Définition des modes de transmission

Deux modes de transmission principaux existent, la transmission verticale et la transmission horizontale. La transmission dite 'verticale' a souvent été restreinte à la transmission de symbiotes intracellulaires par la mère lors des premiers stades de développement des œufs (par exemple : Bright & Bulgheresi, 2010 ; Lombardo, 2008). D'après Fine (1975), la transmission verticale est parentale, filiale, et se définit comme le transfert du symbiote d'un parent (ou des deux) aux descendants (Figure 4 gauche). Inversement, la transmission horizontale est non parentale, non filiale, et correspond à la transmission du symbiote par des contacts directs ou indirectement *via* l'environnement entre individus de la même espèce ou d'espèces différentes (Figure 4 droite) (Fine, 1975). Il faut préciser que la transmission horizontale peut impliquer des hôtes apparentés mais sans filiation directe. Conformément à Fine (1975), nous considérerons ici tout mécanisme ou comportement de transmission des symbiotes comme vertical s'il se fait d'un ou des deux parents envers leurs descendants, les autres routes de transmission seront considérées comme horizontales.

Ces deux modes de transmission ne sont pas nécessairement exclusifs et un mode de transmission mixte entre les deux peut également avoir lieu (Bright & Bulgheresi, 2010 ; Ebert, 2013 ; Russell, 2019). Tout un continuum existe pour le mode de transmission des symbiotes qui peut, par exemple, être principalement caractérisé par de la transmission verticale et où des événements de transmission horizontale peuvent se produire ponctuellement au cours de l'évolution de l'association (Dedeine, Boulétreau, & Vavre, 2005 ; Radek *et al*., 2018). Au contraire, certains symbiotes à transmission horizontale peuvent parfois être transmis à la descendance hôte (Naucke & Lorentz, 2012).

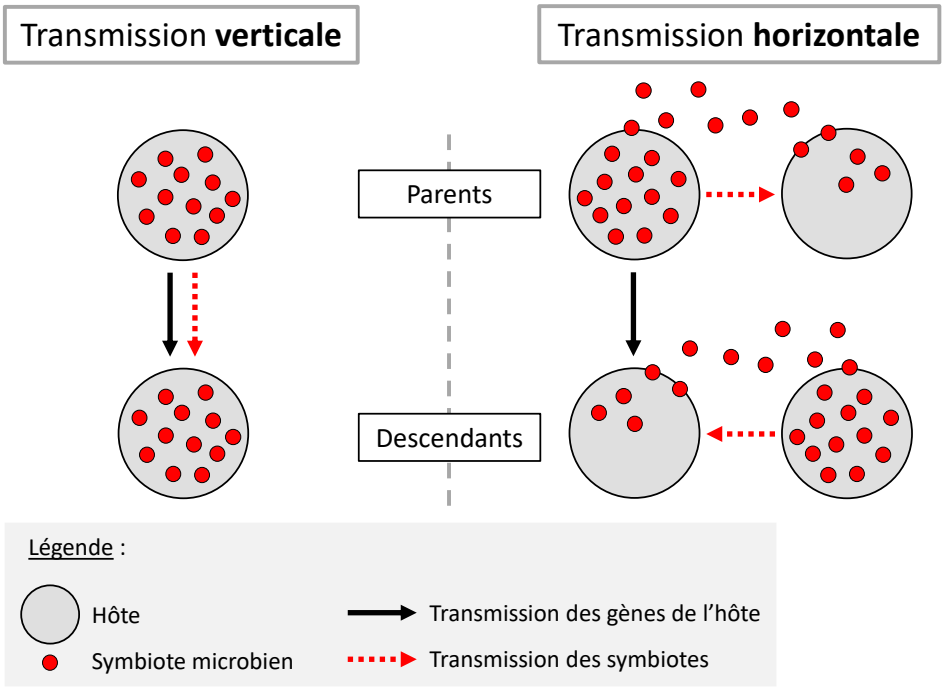


Figure 4 : Mode de transmission des symbiotes entre les hôtes. La transmission des symbiotes peut être verticale, c'est-à-dire de parents à descendants, ou horizontale, c'est-à-dire entre individus de la même espèce apparentés ou non ou entre individus d'espèces différentes.

1.5.2. Mode de transmission et mécanisme de stabilisation

Pour pouvoir être transmis, les symbiotes doivent se répliquer dans l'hôte. La présence des symbiotes dans l'hôte peut induire un coût sur la valeur sélective de l'hôte puisqu'ils consomment des ressources produites par l'hôte, ce coût lié à la présence du symbiote dans l'hôte est appelé virulence (Ebert & Herre, 1996 ; Ewald, 1994 ; Frank, 1996). La virulence d'un symbiote serait fortement liée à sa densité dans l'hôte. En effet, les coûts augmentent avec la multiplication symbiotique nécessaire à leur transmission, la virulence est donc une conséquence inévitable de la transmission des symbiotes (Alizon, Hurford, Mideo, & Van Baalen, 2009 ; Anderson & May, 1982). Cependant, les bénéfices potentiels apportés par les symbiotes à l'hôte peuvent aussi être liés à la densité symbiotique (Martinez *et al.*, 2014 ; Osborne, San Leong, O'Neil, & Johnson, 2009). Les pressions de sélection exercées sur les symbiotes microbiens peuvent converger vers une optimisation de leur transmission à de nouveaux hôtes, et donc de leur valeur sélective, qui ne serait pas toujours avantageuse pour l'hôte et pourrait mener à des conflits d'intérêts entre les partenaires symbiotiques. Des pressions de sélection seraient ainsi exercées sur l'hôte pour la mise en place des mécanismes

de stabilisation de l'association qui est fortement dépendante du mode de transmission des symbiotes.

1.5.2.1. Transmission horizontale et choix de partenaire

Lorsque la transmission des symbiotes est horizontale, elle ne dépend pas de la reproduction de l'hôte mais de la capacité du symbiote à se répliquer et à se transmettre dans la population de l'hôte. Les valeurs sélectives de l'hôte et des symbiotes ne sont pas nécessairement corrélées, une augmentation de la virulence peut donc être attendue dans le système symbiotique (Bull, 1994 ; Ewald, 1983 ; Fine, 1975 ; Sachs & Wilcox, 2005). Il existerait cependant un compromis entre la transmission et la virulence d'un symbiote dans l'hôte (Anderson & May, 1982 ; Ewald, 1983). Cette hypothèse suppose qu'une forte réplication dans l'hôte serait associée à une forte transmission à un instant donné. La transmission étant un paramètre direct de la valeur sélective du symbiote, un fort taux de réplication pourrait être sélectionné au niveau inter-hôte. Mais une forte réplication du symbiote entrainerait aussi une forte virulence, diminuant la valeur sélective de l'hôte, dont sa survie, et donc diminuant la durée d'exploitation de l'hôte. Une virulence modérée pourrait donc être sélectionnée afin de maximiser la transmission du symbiote sur l'ensemble de la durée de l'interaction (Ewald, 1983). La virulence optimale sélectionnée sera propre à chaque association et pourra être dépendante d'autres paramètres comme les défenses immunitaires de l'hôtes ou les conditions environnementales (Anderson & May, 1982 ; Bull, 1994 ; Ebert & Bull, 2007 ; Ebert & Herre, 1996). Puisque la transmission horizontale des symbiotes n'induit pas nécessairement des interactions répétées entre les partenaires symbiotiques, la fidélité entre partenaires ne peut donc pas être un mécanisme de stabilisation dans ces systèmes. Des études théoriques et empiriques proposent que les symbioses mutualistes présentant un mode de transmission horizontale persistent au cours des générations hôtes grâce à des mécanismes de choix de partenaire qui consistent en une régulation de la population symbiotique permettant de forcer la coopération (Bull *et al*., 1991 ; Johnstone & Bshary, 2002 ; McFall-Ngai, 2014 ; Noë & Hammerstein, 1994 ; West *et al*., 2002).

1.5.2.2. Transmission verticale

1.5.2.2.1. Fidélité intergénérationnelle

Dans le cas d'une transmission verticale des symbiotes, leur transmission dépend directement de la reproduction de l'hôte, il est attendu que les symbiotes mutualistes soient

favorisés (Ewald, 1987 ; Fine, 1975 ; Yamamura, 1993). En effet, la transmission verticale est un mécanisme assurant la fidélité intergénérationnelle entre les partenaires symbiotiques (Bull & Rice, 1991 ; Fine, 1975 ; Sachs *et al*., 2004). Procurer des bénéfices va directement augmenter la valeur sélective de l'hôte et donc la reproduction des symbiotes. La stabilité de la fidélité entre partenaire est fortement dépendante de la réciprocité sur la valeur sélective entre les partenaires. Lorsque la transmission verticale des symbiotes est efficace, c'est-à-dire lorsque tous les descendants héritent du symbiote présent chez le(s) parent(s), elle procure un mécanisme pouvant assurer le maintien du mutualisme symbiotique en défavorisant les tricheurs et en réduisant les conflits d'intérêts (Bennett & Moran, 2015 ; Ewald, 1987 ; Herre, Knowlton, Mueller, & Rehner, 1999). Le cas certainement le plus commun de transmission verticale efficace est celui des mitochondries et chloroplastes chez les organismes eucaryotes (Birky, 1995). Ces symbiotes intracellulaires dérivés de bactéries fournissent notamment l'énergie nécessaire à l'activité métabolique des cellules de leur hôte (Kennedy & Lehninger, 1949 ; Rochaix, 1985 ; Tzagoloff, 1982). Ils sont transmis verticalement de génération en génération de manière efficace (Birky, 1995 ; Yaffe, 1999), la fidélité de transmission est donc intergénérationnelle.

Cependant, les symbiotes peuvent présenter un mode de transmission mixte, la nature de la virulence des symbiotes va exercer des contraintes sur la forme du compromis transmission-virulence, ce qui va impacter la dynamique du mode de transmission des symbiotes (Ferdy & Godelle, 2005). Lorsque la virulence augmente la mortalité de l'hôte, la forme du compromis transmission-virulence est concave et un seul point d'équilibre existe, un niveau intermédiaire de virulence serait alors sélectionné comme nous venons de le voir (Ferdy & Godelle, 2005 ; Lipsitch *et al*., 1995 ; Stewart, Logsdon, & Kelley, 2005). Lorsque les symbiotes induisent une baisse de fécondité de l'hôte, la forme du compromis transmission-virulence est convexe induisant deux points d'équilibre dans la population. La population symbiotique se scinderait alors en deux, une partie présenterait une stratégie de faible transmission horizontale associée à une faible virulence, et l'autre une stratégie de forte transmission horizontale associée à une forte virulence (Ferdy & Godelle, 2005). La compétition pour la transmission entre les symbiotes permettrait ensuite la sélection inter-hôte des symbiotes à transmission verticale (et donc à faible virulence), ce qui stabiliserait le système (Ferdy & Godelle, 2005). Même si le mode de transmission des symbiotes peut être un bon prédicteur de la coopération des symbiotes avec l'hôte, il n'est pas le seul mécanisme à entrer en jeu.

1.5.2.2.2. Coopération entre symbiotes

Les symbiotes microbiens vivent ensemble dans un espace restreint que constitue l'hôte. Or, ces microorganismes peuvent entrer en compétition pour les ressources limitées de l'hôte et pour la transmission à un nouvel hôte. Les symbiotes les plus compétitifs pourraient exclure les autres et ainsi être sélectionnés au niveau intra-hôte (Frank, 1996). Les symbiotes les plus compétitifs présentent souvent un plus fort taux de réplication et donc une plus forte densité dans l'hôte. Cependant, une plus forte densité induisant une plus forte virulence, les symbiotes sélectionnés dans l'hôte seraient aussi les plus virulents, ce qui pourrait déstabiliser le mutualisme avec l'hôte. Le lien de parenté entre les symbiotes pourrait être un facteur majeur de résolution des conflits (Leeks, dos Santos, & West, 2019).

Généralement, lors de la transmission verticale, un goulot d'étranglement symbiotique se produit. En effet, il a notamment été montré que, lorsque les symbiotes vivent dans les cellules de l'hôte, la taille de la population symbiotique est fortement réduite lors de la transmission dans les œufs puisque seule une fraction de la population de symbiotes présents dans la mère est retrouvée dans ses œufs (Buchner, 1965 ; Jansen & de Boer, 1998 ; Mira & Moran, 2002). Cette réduction du nombre de symbiotes lors de la transmission verticale (*i.e.*, goulot d'étranglement) n'a pas uniquement lieu pour des symbiotes intracellulaires, mais peut se produire pour des symbiotes vivant en dehors des cellules hôtes. Par exemple, les punaises de la famille des Plataspidae vivent en association nutritionnelle avec la bactérie *Ishikawaella capsulata* présente dans leurs caeca gastriques (Fukatsu & Hosokawa, 2002). Chez la punaise *Megacopta punctatissima*, les nymphes nouvellement nées acquièrent en moyenne 2×10^7 bactéries alors qu'une femelle adulte en possède environ 4.4×10^9, le goulot d'étranglement symbiotique serait de 1/220e (Hosokawa, Kikuchi, & Fukatsu, 2007). Cette forte réduction symbiotique constitue un goulot d'étranglement génétique pouvant induire une réduction de la diversité génétique entre les symbiotes dans les hôtes et donc pouvant renforcer l'homogénéité symbiotique. Ce goulot d'étranglement assurerait à la descendance des symbiotes proches phylogénétiquement qui auraient un intérêt évolutif à ne pas tricher ni entrer en compétition pour ne pas défavoriser les symbiotes qui leur sont apparentés, les symbiotes coopéreraient mieux entre eux et ainsi apporteraient plus de bénéfices à l'hôte (Foster & Wenseleers, 2006 ; Frank, 1994, 1996 ; Hamilton, 1964a, 1964b ; Herre *et al*., 1999 ; West *et al*., 2002). En plus d'aligner les intérêts évolutifs des partenaires, le mode de transmission vertical influencerait le lien de parenté entre les symbiotes dans l'hôte ce qui pourrait réduire la compétition entre symbiotes au sein des hôtes et favoriser la coopération hôte-symbiote. Une étude théorique récente suggère que le degré d'apparentement entre les symbiotes serait un meilleur indicateur

du niveau de coopération des symbiotes avec l'hôte que le mode de transmission lui-même (Leeks *et al*., 2019).

1.6. Conséquences populationnelles et évolutive de la transmission verticale

1.6.1. A court terme

Certains symbiotes transmis verticalement sont fixés dans les populations hôtes, c'est-à-dire que leur prévalence (*i.e.*, la fréquence d'individus possédant le symbiote dans la population) est totale. Des études ont mis en avant une fixation des symbiotes dans les populations hôtes dans des symbioses où l'hôte ne peut pas survivre sans le symbiote, c'est-à-dire que le degré de dépendance de l'hôte envers le symbiote est total (Darby & Douglas, 2003 ; Douglas, 2008). Des prévalences élevées ont également été trouvées dans d'autres systèmes dans lesquels le degré de dépendance de l'hôte vis-à-vis du symbiote est variable (Clay, 1990 ; Fine, 1975 ; Fine & Sylvester, 1978 ; Gundel *et al*., 2008 ; Lipsitch *et al*., 1995 ; Zchori-Fein, Geden, & Rutz, 1992). Deux facteurs principaux peuvent expliquer la prévalence d'un symbiote strictement transmis verticalement dans une population d'hôtes : (i) l'efficacité de transmission des symbiotes et (ii) le degré de dépendance de l'hôte envers les symbiotes (Gundel *et al*., 2008, 2009). Une prévalence totale des symbiotes dans la population pourrait être expliquée par une transmission verticale parfaite, c'est-à-dire que tous les descendants acquièrent le symbiote par leur(s) parent(s). Si l'efficacité de transmission verticale des symbiotes n'est pas parfaite mais que le degré de dépendance de l'hôte est total, de la sélection négative au niveau inter-hôte pourrait s'exercer et la prévalence des symbiotes serait alors totale dans la population. Le plus souvent, il y a une variation de la fréquence d'hôtes portant les symbiotes et les prévalences de symbiotes transmis verticalement dans la population hôte sont élevées mais non totale (Darby & Douglas, 2003 ; Davidson & Stahl, 2006 ; Dykstra *et al*., 2014 ; Gundel *et al*., 2009 ; Iannone, Novas, Young, De Battista, & Schardl, 2012 ; Jaenike, Stahlhut, Boelio, & Unckless, 2010 ; Kaltenpoth *et al*., 2014 ; Rudgers *et al*., 2009 ; Tsuchida, Koga, Shibao, Matsumoto, & Fukatsu, 2002 ; Weldon, Strand, & Oliver, 2013).

1.6.2. A long terme

A une échelle de temps évolutive, une fidélité importante entre partenaires sur plusieurs générations pourrait mener à une codiversification évolutive des lignées hôtes et symbiotiques

par des événements successifs de cospéciation, pouvant résulter, à terme, à un patron de cocladogenèse, c'est-à-dire une congruence parfaite entre la phylogénie des hôtes et celle des symbiotes (Figure 5A) (Herre *et al*., 1999 ; Salem, Florez, Gerardo, & Kaltenpoth, 2015). Des événements de transferts horizontaux entre les lignées hôtes, de pertes de symbiote ou de duplications de symbiote peuvent arriver au cours de la diversification évolutive des associations (Figure 5B et C) (Ebert, 2013 ; Herre *et al*., 1999). Des études phylogénétiques ont ainsi montré une transmission verticale exclusive (ou quasiment exclusive) dans des mutualismes où les symbiotes vivent dans ou à l'extérieur des cellules de l'hôte (Bandi *et al*., 1995 ; Baumann, 2005 ; Hosokawa, Kikuchi, Nikoh, Shimada, & Fukatsu, 2006 ; Kaltenpoth *et al*., 2014 ; Kikuchi *et al*., 2009 ; Moran *et al*., 2008 ; Moran, Munson, Baumann, & Ishikawa, 1993). L'association entre les aphides et leurs bactéries nutritionnelles du genre *Buchnera* est un cas très intéressant à mettre en avant puisque l'acquisition de ces bactéries aurait été faite par l'ancêtre commun des aphides il y a 160 à 280 millions d'années et que la fidélité de transmission intergénérationnelle aurait conduit à une diversification hôte-symbiote (Baumann, 2005 ; Moran *et al*., 1993). Cette fidélité intergénérationnelle entre partenaires peut également conduire à une interdépendance mutuelle entre l'hôte et les symbiotes. En effet, les symbiotes peuvent permettre aux hôtes de s'adapter à de nouvelles niches écologiques avec pour conséquences des changements morphologiques ou métaboliques. Les symbiotes peuvent à leur tour devenir dépendants de leurs hôtes en s'adaptant à eux, avec certaines conséquences comme une réduction de leur génome puisque la sélection sur certaines fonctions redondantes avec celles de l'hôte seraient levée (pour revues : Moran, 2007 ; Moran *et al*., 2008 ; Salem, Florez, Gerardo, & Kaltenpoth, 2015).

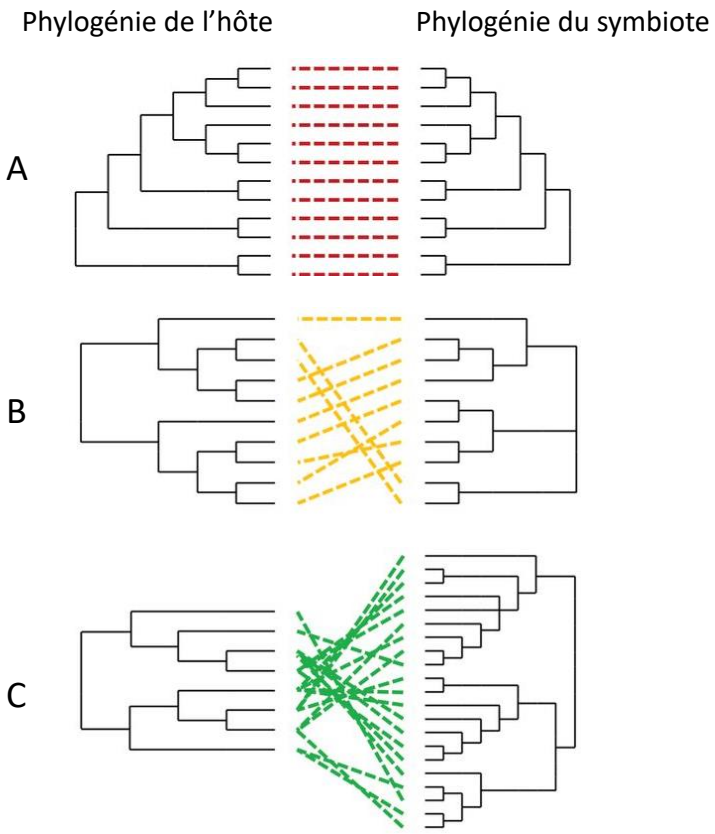


Figure 5 : Illustration de comparaison des relations évolutives entre hôtes et symbiotes. (A) Cocladogenèse stricte entre la phylogénie hôte et celle des symbiotes suggérant une transmission verticale exclusive des symbiotes. (B) Cas d'une incongruence phylogénétique faible et (C) cas d'une forte incongruence entre les phylogénies hôte et symbiotique suggérant des transferts horizontaux et/ou des pertes de symbiotes. D'après Salem *et al*., 2015.

2. Diversité des routes de transmission verticale

Les routes et mécanismes de transmission verticale sont variées, elles peuvent être intra- ou extracellulaires (pour revues : Bright & Bulgheresi, 2010 ; Funkhouser & Bordenstein, 2013 ; Onchuru, Javier Martinez, Ingham, & Kaltenpoth, 2018 ; Russell *et al*., 2019 ; Salem *et al*., 2015). Peu de cas de transmission biparentale sont connus et l'efficacité de transmission n'est pas nécessairement égale entre les deux parents (Shukla, Vogel, Heckel, Vilcinska, & Kaltenpoth, 2018 ; Usher, Sutton, Toze, Kuo, & Fromont, 2005 ; Watanabe, Yukuhiro, Matsuura, Fukatsu, & Noda, 2014). De plus, il n'existe à ma connaissance que de ponctuels cas de transmission uniquement paternelle décrits dans les symbioses mutualistes (exemple : Johnson, 1981). Cette partie se focalisera principalement sur les insectes puisqu'ils ont été particulièrement bien étudiés.

2.1. Routes intracellulaires

La plupart des organismes eucaryotes unicellulaires et pluricellulaires portent des symbiotes mutualistes dans leur cytoplasme en plus de leurs organites (Archibald, 2012 ; Arora, 2013 ; Bonfante & Anca, 2009 ; Buchner, 1965 ; Dubilier, Bergin, & Lott, 2008 ; Fujishima, 2009 ; Moran *et al*., 2008). Les mécanismes impliqués dans cette route de transmission de ces symbiotes ont bien été étudiés. La transmission est généralement prénatale et se fait de façon transovarienne lors des premiers stades d'ovogenèse ou d'embryogenèse (Table 1) (Bright & Bulgheresi, 2010). Les symbiotes sont donc directement transmis par la mère lors du processus de développement de l'hôte (Braendle *et al*., 2003 ; Buchner, 1965 ; Fukatsu & Nikoh, 2000 ; Gier, 1936 ; Herren, Paredes, Schüpfer, & Lemaitre, 2013 ; Koga, Meng, Tsuchida, & Fukatsu, 2012 ; Luan *et al*., 2016). Dans ce cas, la transmission des symbiotes est pré-ponte et la phase aposymbiotique de l'embryon est donc très courte voire inexistante.

Un cas très bien étudié est celui de l'association entre les aphides et la bactérie nutritionnelle du genre *Buchnera*. Les *Buchnera* produisent les acides aminés et la riboflavine essentiels à la nutrition de l'hôte qu'il ne trouve pas dans son alimentation et l'aident dans le recyclage de l'azote (Douglas, 1989 ; Douglas & Prosser, 1992 ; Hansen & Moran, 2011 ; Lai, Baumann, & Baumann, 1994 ; Shigenobu, Watanabe, Hattori, Sakaki, & Ishikawa, 2000). Ces bactéries sont intracellulaires et se limitent dans l'hôte à la colonisation de bactériocytes dans un organe spécialisé qu'est le bactériome. L'introduction des *Buchnera* dans les œufs sexués se fait avant leur fertilisation (Blackman, 1987) alors que pour les embryons parthénogénétiques ce transfert est réalisé juste après l'étape de cellularisation qui conduit au stade blastula (Miura *et al*., 2003). Dans tous les cas, que ce soit pour le mode de reproduction sexué ou asexué, même si les mécanismes sous-jacents sont assez différents, les *Buchnera* sont transmises par exocytose des bactériocytes de la mère et endocytose dans l'œuf par de nombreuses ouvertures de l'épithélium foliaire postérieur ou par une seule ouverture postérieure dans la blastula (Figure 6) (Lu, Chang, & Wilson, 2016 ; Miura *et al*., 2003). Les bactéries sont ensuite réparties dans des cellules de leur nouvel hôte qui formeront le bactériome (Braendle *et al*., 2003 ; Lu *et al*., 2016 ; Miura *et al*., 2003).

Table 1 : Routes de transmission de symbiotes mutualistes intracellulaires chez les insectes.

Hôte	Symbiote	Retour du bénéfice pour l'hôte	Localisation des symbiotes	Route de transmission	Références
Aleurodes	*Portiera aleyrodidarum*	Nutrition	Bactériocytes	Maternelle, transovarienne	Campbell, 1993 ; Clark *et al*., 1992
	Hamiltonella defensa	Protection, nutrition	Bactériocytes	Maternelle, transovarienne	Zchori-Fein & Brown, 2002
Aphides	*Buchnera aphidicola*	Nutrition	Bactériocytes	Maternelle, transovarienne	Koga *et al*., 2012 ; Moran *et al*., 1993 ; Munson *et al*., 1991
	H. defensa, Serratia symbiotica, Regiella insecticola	Protection	Bactériocytes	Maternelle, transovarienne	Michalik *et al*., 2014 ; Moran & Dunbar, 2006 ; Oliver *et al*., 2003 ; Rock *et al*., 2018
Blattes et termites du genre *Mastotermes*	*Blattabacterium cuenoti*	Nutrition	Bactériocytes	Maternelle, transovarienne	Bandi *et al*., 1994, 1995 ; Sacchi *et al*., 1985
Charançons	'SOPE', 'SZPE'	Nutrition	Bactériocytes	Maternelle, transovarienne	Grenier *et al*., 1994 ; Nardon, 1971
Cicadelles	*Sulcia muelleri, Nasuia deltocephalinicola*	Nutrition	Bactériocytes	Maternelle, transovarienne	Noda *et al*., 2012
	Rickettsia sp.	Nutrition	Cytoplasme et noyau de nombreuses cellules	Biparentale, transovarienne et intrasperme	Mitsuhashi & Kono, 1975 ; Watanabe *et al*., 2014
Cochenilles diaspidides	*Uzinura diaspidicola*	Nutrition	Bactériocytes	Maternelle, transovarienne	Gruwell *et al*., 2007
Cochenilles farineuses	*Tremblaya princeps*	Nutrition	Bactériocytes	Maternelle, transovarienne	Baumann, 2005
Eucaryotes	Mitochondrie	Nutrition	Cytoplasme des cellules	Maternelle, transovarienne	Birky, 1995 ; Kennedy & Lehnnger, 1949
Fourmis charpentières	*Blochmannia* sp.	Nutrition	Bactériocytes	Maternelle, transovarienne	Gil *et al*., 2003 ; Sauer *et al*., 2000
Mouches tsé-tsé	*Wigglesworthia glossinidia*	Nutrition	Bactériocytes	Maternelle, glandes à lait	Aksoy *et al*., 1995 ; Attardo *et al*., 2008 ; Balmand *et al*., 2013 ; Nogge, 1981
	Sodalis glossinidius	Nutrition	Cytoplasme des cellules	Maternelle, glandes à lait	Aksoy *et al*., 1997 ; Balmand *et al*., 2013
Poux	*Riesia pediculicola*	Nutrition	Bactériocytes	Maternelle, transovarienne	Eberle & McLean, 1983 ; Perotti *et al*., 2007
Punaises de lit	*Wolbachia* sp.	Nutrition	Bactériocytes	Maternelle, transovarienne	Hosokawa *et al*., 2010
Psocoptères	*Rickettsia* sp.	Nutrition	Bactériocytes	Maternelle, transovarienne	Perotti *et al*., 2006
Psyllidés	*Carsonella ruddii*	Nutrition	Bactériocytes	Maternelle, transovarienne	Nakabachi *et al*., 2006

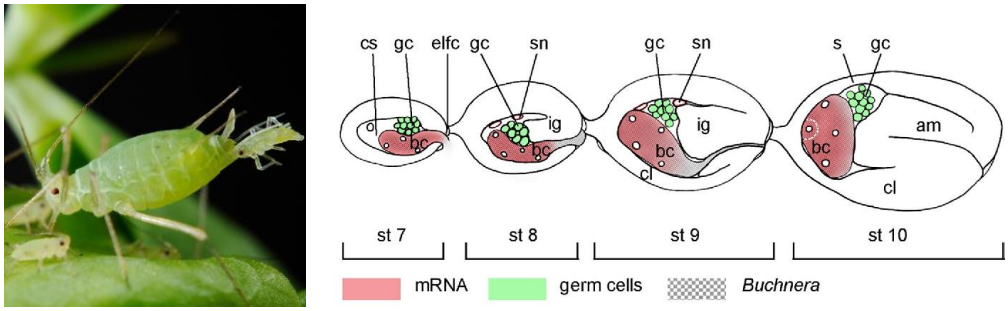


Figure 6 : Route de transmission des bactéries nutritionnelles intracellulaires dans l'embryon *d'Acyrthosiphon pisum*. A gauche : photographie d'une femelle donnant naissance à une nymphe. Crédits photographiques : Shipher Wu, National Taiwan University. A droite : illustration de l'invasion des bactéries intracellulaires *Buchnera* (bc) dans l'embryon pendant son développement dans la femelle (d'après Lu *et al*. (2016)). Au stade 7, l'embryon incorpore les bactéries maternelles par une ouverture postérieure. Les bactéries sont ensuite réparties dans les cellules hôtes qui migrent pour former le bactériome. cl : lobe céphalique. cs : syncytium ventral. elfc : cellules folliculaires élargies. gc : cellules germinales. ig : bande germinale invaginée. s : tissu séreux. sn : noyau syncytial. st : stade.

Une route de transmission particulière de symbiotes intracellulaires est celle des bactéries nutritionnelles du genre *Wigglesworthia* chez la mouche tsé-tsé. Ces bactéries apportent la vitamine B essentielle à l'hôte et sont hébergées dans des bactériocytes (Aksoy, 1995 ; Nogge, 1981). Cependant, cette bactérie n'est pas présente dans les ovaires de la femelle, ni dans les ovocytes, ni même lors des premiers stades de développement embryonnaire. Seules des bactéries du genre *Wolbachia* y sont retrouvées (Aksoy, Chen, & Hypsa, 1997 ; Attardo *et al*., 2012 ; Balmand, Lohs, Aksoy, & Heddi, 2013). Chez la mouche tsé-tsé, le développement des embryons est vivipare, un seul œuf éclot dans le tractus génital et la larve s'y développe entièrement (Buxton, 1955). Elle est nourrie par du lait sécrété par des glandes maternelles spécialisées, les glandes à lait (Denlinger & Ma, 1974). En plus des bactériocytes, les *Wigglesworthia* sont retrouvées dans le lumen de ces glandes à lait et dans le liquide qu'elles sécrètent, les bactéries seraient ainsi transmises à la larve en développement dans le tractus génital après éclosion de l'œuf (Figure 7) (Aksay *et al*., 1997 ; Attardo *et al*., 2012 ; Balmand *et al*., 2013).

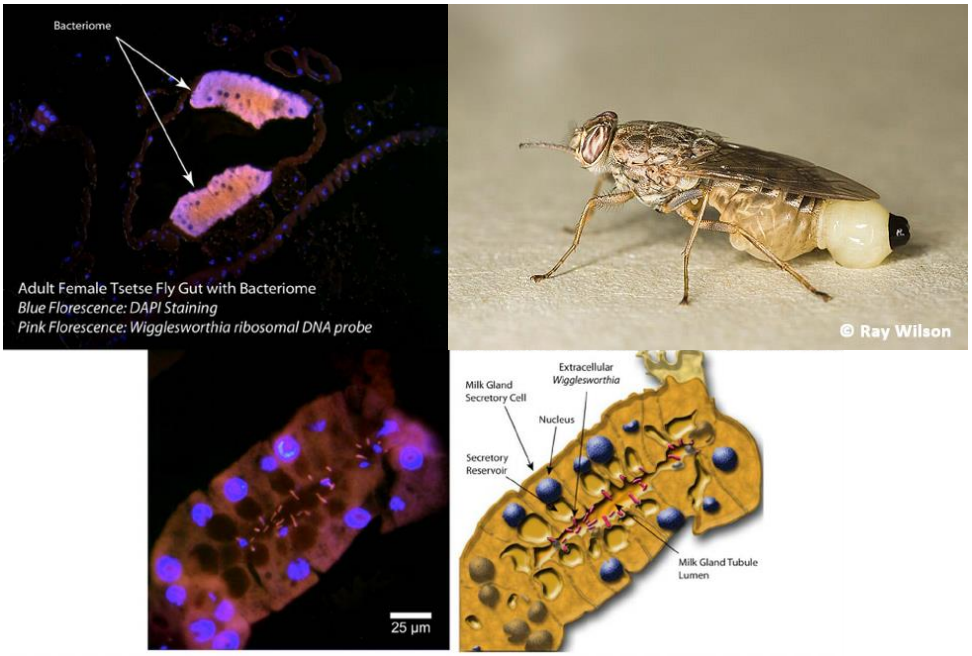


Figure 7 : Route de transmission des bactéries nutritionnelles intracellulaires chez *Glossina morsitans*. En haut à droite : femelle donnant naissance à une larve. Crédits photographiques : R. Wilson. En haut à gauche : présence des bactéries *Wigglesworthia* détectées par FISH dans les bactériomes d'une femelle. En bas : photographie en FISH et illustration des bactéries *Wigglesworthia* dans le lumen des glandes à lait d'une femelle. D'après Rio *et al*., (2012).

2.2. Routes extracellulaires

Les symbiotes intracellulaires représentent au final des cas particuliers d'association très intégrée. Les individus peuvent également vivre en interaction avec des symbiotes qui se trouvent en dehors de leurs cellules sur leur tégument ou dans leur tube digestif. Les routes de transmission extracellulaires connues sont d'ailleurs généralement liées à des symbiotes intestinaux. Ces routes de transmission consistent en des soins parentaux qui ont lieu juste après la ponte chez les insectes solitaires ou après la naissance des jeunes chez les insectes sociaux (*i.e.*, des congénères interagissant et vivant ensemble en dehors des périodes de reproduction et/ou de soins parentaux (Wilson, 1975)).

2.2.1. Chez les insectes solitaires

Chez les insectes solitaires, les routes mises en place au cours de l'évolution pour assurer la transmission de symbiotes extracellulaires sont très variées et impliquent de nombreuses adaptations anatomiques et physiologiques (Table 2). La transmission des symbiotes est généralement assurée par des structures contenant les symbiotes déposées par la mère pendant

ou juste après la ponte des œufs, ou par l'inoculation de la surface des œufs ou du site de ponte avec les symbiotes (pour revue : Salem *et al*., 2015). Les symbiotes sont donc capables de survivre au moins quelques temps en dehors de leurs hôtes. L'acquisition des symbiotes par les descendants se fait alors après éclosion et généralement par ingestion des structures contenant les symbiotes, les jeunes individus sont donc aposymbiotiques au tout début de leur vie (Bright & Bulgheresi, 2010 ; Salem *et al*., 2015).

Un exemple de route de transmission très spécialisée est celui des punaises de la famille des Plataspidae associées à la bactérie nutritionnelle *I. capsulata*. Ces bactéries sont localisées dans des caeca gastriques au niveau de l'intestin moyen et sont indispensables pour un bon développement de leur hôte (Fukatsu & Hosokawa, 2002). Lorsque la mère pond ses œufs sur la plante hôte, elle dépose également des petites particules marrons sous les masses d'œufs qui sont des capsules contenant les symbiotes (Figure 8A-B) (Fukatsu & Hosokawa, 2002). Les hôtes ont développé des organes propres aux femelles au niveau postérieur de l'intestin moyen qui permettent de produire les capsules symbiotiques et de les stocker avant leur expulsion pendant la ponte (Hosokawa, Kikuchi, Meng, & Fukatsu, 2005). Quelle que soit la taille de la ponte, les femelles *M. punctatissima* pondent en moyenne une capsule pour trois à quatre œufs assurant que chaque nymphe soit à proximité d'une capsule symbiotique à son éclosion (Hosokawa *et al*., 2007). Les capsules contiennent 1.2 x 10^8 bactéries en moyenne qui sont partagées entre plusieurs nymphes (Hosokawa *et al*., 2007). Dès l'éclosion, les nouveau-nés sondent ces capsules symbiotiques avec leur proboscis et ingèrent les bactéries stockées à l'intérieur qui colonisent ensuite leurs nouveaux hôtes (Figure 8C) (Fukatsu & Hosokawa, 2002 ; Hosokawa *et al*., 2005).

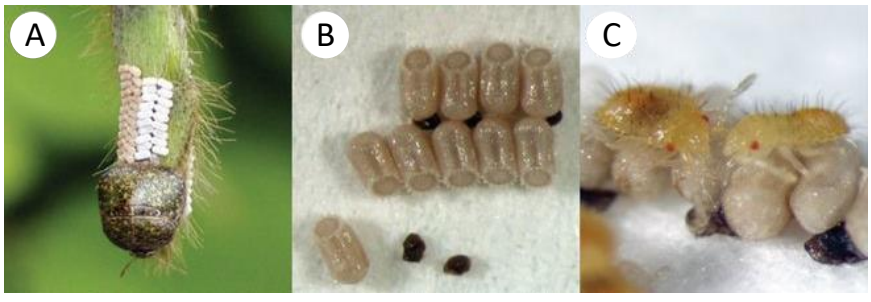


Figure 8 : Route de transmission des bactéries nutritionnelles extracellulaire chez *Megacopta punctatissima*. (A) Femelle déposant ses œufs en rangées avec des capsules symbiotiques en dessous. (B) Œufs (clairs) et capsules symbiotiques (marrons). (C) Nymphes néonates ingérant les symbiotes contenus dans les capsules. Photographies d'après Salem *et al.* (2015).

Table 2 : Routes de transmission de symbiotes mutualistes extracellulaires chez les insectes solitaires.

Hôte	Symbiote	Retour du bénéfice pour l'hôte	Localisation des symbiotes	Route de transmission	Références
Guêpes solitaires Philanthini	*Streptomyces philanthi*	Protection	Glandes antennaires	Maternelle, inoculation des cellules de couvée	Kaltenpoth *et al*., 2005 ; Kaltenpoth, Goettler *et al*., 2010 ; Kaltenpoth, Schmitt *et al*., 2010
Punaises Acanthosomatidae	Gammaproteobacteria	Nutrition	Cryptes gastriques scellées	Maternelle, inoculation des œufs	Kikuchi *et al*., 2009 ; Rosenkranz, 1939
Punaises Pentatomidae	Gammaproteobacteria	Nutrition	Caeca gastriques	Maternelle, inoculation des œufs	Glasgow, 1914 ; Prado *et al*., 2006 ; Rosenkranz, 1939
Punaises Plataspidae	*Ishikawaella capsulata*	Nutrition	Caeca gastriques	Maternelle, capsules symbiotiques	Fukatsu & Hosokawa, 2002 ; Hosokawa *et al*., 2005
Punaises Urostylididae	*Tachikawae gelatonisa*	Nutrition	Caeca gastriques	Maternelle, gelée symbiotique	Kaiwa *et al*., 2014
Pyrrhocororidae	*Coriobacterium glomerans*	Nutrition	Caeca gastriques	Maternelle, inoculation des œufs	Haas & König, 1987, 1988 ; Kaltenpoth *et al*., 2009
Scarabées Lagriinae	*Burkholderia* sp.	Protection	Glandes accessoires proches de l'ovipositeur	Maternelle, inoculation des œufs	Flórez *et al*., 2017 ; Stammer, 1929
Scarabées tortues Cassidinae	*Stammera* sp.	Nutrition	Caeca gastriques	Maternelle, capsules symbiotiques	Salem *et al*., 2017 ; Stammer, 1936

2.2.2. Transmission liée à la socialité

Chez les animaux, il existe différents degrés de socialité qui évoluent le long d'un continuum allant du grégarisme, où des congénères vivent en groupe et interagissent, à l'eusocialité, où des individus apparentés vivent en colonies avec une organisation sociale répartie selon des castes dont une spécialisée dans la reproduction, une superposition des générations et une coopération pour le soin aux jeunes (Hamilton, 1964a, 1964b ; Wilson, 1975 ; Wilson & Hölldobler, 2005). Une des premières caractéristiques de la socialité est le soin aux jeunes. Chez les espèces sociales, la transmission des symbiotes extracellulaires d'une génération à une autre serait possible *via* ces soins parentaux.

Il n'existe cependant pas de définition claire de la transmission verticale chez les espèces eusociales qui est un point important à clarifier. Puisque les individus vivent ensemble, interagissent notamment pour se nourrir, et coopèrent dans le soin aux jeunes, il est parfois difficile de savoir si l'acquisition des symbiotes est réellement verticale ou s'il s'agit de transferts horizontaux entre les membres du groupe social. Les colonies d'insectes eusociaux reposent sur la division du travail avec des castes stériles, en général les ouvriers et les soldats, et des castes fertiles, les reproducteurs fondant de nouvelles colonies. Chez les espèces eusociales, il faut considérer le microbiote intestinal à l'échelle coloniale et non à l'échelle individuelle. En effet, l'événement de transmission verticale des symbiotes intestinaux aurait lieu lors de la fondation d'une nouvelle colonie par un reproducteur produit dans une colonie mature. Ces reproducteurs transmettraient leurs symbiotes aux premiers ouvriers qui prendraient ensuite le relais dans le soin aux jeunes, et donc dans la transmission de ces symbiotes (Figure 9). Les reproducteurs seraient alors le seul moment au cours du cycle de vie des colonies où le microbiote intestinal doit être évalué à l'échelle des individus puisque ce sont eux qui fondent le microbiote de la colonie. Si la transmission des symbiotes est verticale, ces reproducteurs sont les seuls à pouvoir les transmettre aux groupes sociaux de la prochaine génération, ils doivent donc porter les symbiotes lorsqu'ils quittent leur colonie parentale. Les cycles de vie des colonies et des symbiotes sont liés, il faut alors considérer la transmission verticale des symbiotes d'une colonie parentale à une colonie fille, des transferts entre les membres de la colonie ont ensuite lieu pour maintenir l'association symbiotique au sein du groupe (Nalepa, 2017 ; Onchuru *et al*., 2018).

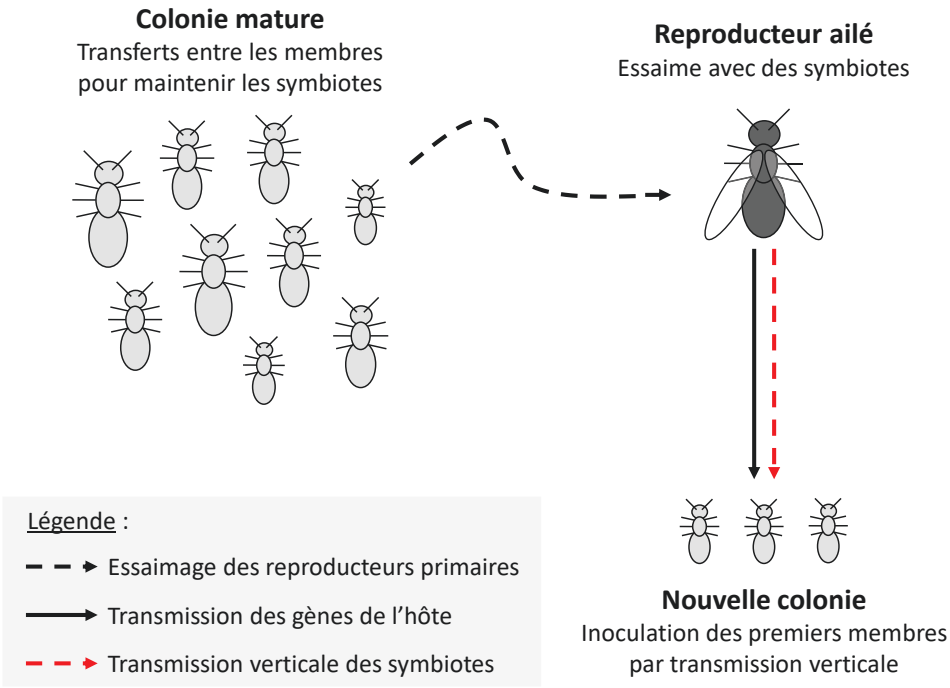


Figure 9 : Cycles de vie liés de colonies d'insectes eusociaux et de leur microbiote intestinal. Au sein d'une colonie mature, les membres maintiennent les symbiotes intestinaux en se les transmettant. Lorsque les reproducteurs essaiment, ils partent avec un pool de symbiotes de la colonie parentale qu'ils vont transmettre à leurs premiers descendants durant la fondation d'une nouvelle colonie.

Chez les espèces sociales, des comportements particuliers pourraient assurer la transmission des symbiotes intestinaux d'une génération à une autre (Table 3). L'acquisition des symbiotes intestinaux par la descendance est en général due à l'ingestion de ceux-ci et dépend de la route de transmission utilisée. La première route de transmission verticale chez les insectes sociaux est l'inoculation du site de développement des descendants par les microorganismes intestinaux (Figure 10A) (Koch, Abrol, Li, & Schmid-Hempel, 2013 ; Powell, Martinson, Urban-Mead, & Moran, 2014 ; Shukla *et al*., 2018 ; Wang & Rozen, 2017). Ce moyen de transmission a été suggéré chez les nécrophores où les deux parents déposent des symbiotes intestinaux sur la carcasse qu'ils préparent pour nourrir leurs jeunes (Figure 11A) (Shukla *et al*., 2018 ; Vogel *et al*., 2017). Les larves se nourrissent de cette carcasse et ingèrent ainsi les symbiotes, et dans cet exemple la transmission est biparentale (Shukla *et al*., 2018 ; Wang & Rozen, 2017). Une autre route potentielle de transmission verticale chez les nécrophores est la trophallaxie stomodéale (*i.e.*, le transfert de fluide riche en symbiotes de la bouche du parent à celle du descendant) dont nous parlerons après.

Table 3 : Routes de transmission de symbiotes mutualistes extracellulaires chez les insectes sociaux.

Hôte	Degré de socialité	Symbiote	Retour du bénéfice pour l'hôte	Localisation des symbiotes	Route de transmission	Références
Abeilles sociales	Eusocial	Bactéries	Nutrition, protection	Intestins	Maternelle, inoculation + coprophagie + trophallaxies proct. et stom.	Cox-Foster *et al*., 2007 ; Koch & Schmid-Hempel, 2011 ; Martinson *et al*., 2011 ; Powell *et al*., 2014 ; Vásquez *et al*., 2012
Blattes Cryptocercidae	Subsocial	Bactéries, protistes Parabasalia et Oxymonadida	Nutrition, protection	Intestins	Biparentale, coprophagie, trophallaxie proct.	Cleveland *et al*., 1934 ; Inoue *et al*., 2000 ; Nalepa *et al*., 2001
Fourmis Attini champignonnistes	Eusocial	Basidiomycètes	Nutrition, protection	Jardin dans le nid	Maternelle, inoculation	Chapela *et al*., 1994 ; Hölldobler & Wilson, 1990
		Pseudonocardia sp.	Protection	Cryptes cuticulaires et plaques prothoraciques	Maternelle, inoculation	Cafaro & Currie, 2005 ; Currie *et al*., 2006 ; Currie *et al*., 1999 ; Marsh *et al*., 2014
Nécrophores	Communal	Bactéries et levures	Nutrition	Intestins	Biparentale, inoculation + trophallaxie stom.	Shukla *et al*., 2018 ; Vogel *et al*., 2017 ; Wang & Rozen, 2017
Termites 'inférieurs'	Eusocial	Archées, bactéries, protistes Parabasalia et Oxymonadida	Nutrition, protection	Intestins	Biparentale, coprophagie + trophallaxie proct.	Grassé, 1952 ; Leidy, 1881 ; Nalepa *et al*., 2001 ; Ohkuma & Brune, 2011
Termites 'supérieurs'	Eusocial	Archées, bactéries	Nutrition, protection	Intestins	Biparentale, coprophagie + trophallaxie proct.	Nalepa *et al*., 2001 ; Ohkuma & Brune, 2011
		Termitomyces sp. (uniquement chez les Macrotermitinae)	Nutrition, protection	Jardin dans le nid	Maternelle chez les *Microtermes*, paternelle chez les *Macrotermes*, inoculation. Horizontale pour les autres genres.	Johnson, 1981 ; Johnson, Thomas *et al*., 1981 ; Rouland-Lefèvre, 2000

Proct. : proctodéale.

Stom. : stomodéale.

La deuxième route de transmission est la coprophagie, c'est-à-dire l'ingestion de fèces produit par un autre individu. D'une manière générale, la coprophagie est un moyen d'acquérir des symbiotes, mais lorsqu'elle est filiale cette transmission peut être considérée comme verticale suivant la définition que nous avons choisie (Figure 10C) (Fine, 1975 ; Koch & Schmid-Hempel, 2011 ; Nalepa *et al*., 2001 ; Salem *et al*., 2015). Cependant, la transmission de symbiotes par coprophagie ne fonctionne uniquement que si les symbiotes sont capables de survivre au moins un minimum de temps en dehors de leur hôte ou de produire des formes de résistance. L'évolution de la trophallaxie (*i.e.*, l'échange de fluides par contact direct) est notamment liée à cette incapacité de certains symbiotes à survivre à l'extérieur de l'hôte (Nalepa *et al*., 2001). C'est d'ailleurs une des hypothèses pour expliquer l'évolution de formes sociales complexes, la promiscuité des individus permettant de facilement transmettre les symbiotes par contacts directs récurrents (Nalepa, 2015). Les trophallaxies peuvent être stomodéales, comme vu précédemment avec les nécrophores, mais aussi proctodéales, dans ce cas le fluide contenant les symbiotes est transmis de l'anus du parent à la bouche du descendant (Koch *et al*., 2013 ; Koch & Schmid-Hempel, 2011 ; Lombardo, 2008 ; Martinson *et al*., 2011 ; Powell *et al*., 2014 ; Shukla *et al*., 2018 ; Wang & Rozen, 2017). Les trophallaxies constituent les deux autres routes potentielles de transmission verticale liée à la socialité (Figure 10C-D). De la coprophagie et des trophallaxies ont lieu chez les abeilles, les forficules ou encore les blattes xylophages, ces comportements pourraient constituer des moyens d'acquisition verticale des symbiotes intestinaux (Figure 11B-D) (Körner, Diehl, & Meunier, 2016 ; Maekawa, Matsumoto, & Nalepa, 2008 ; Martinson *et al*., 2011 ; Powell *et al*., 2014 ; Staerkle & Kölliker, 2008).

Il existe donc une grande diversité de routes de transmission des symbiotes du ou des parents à la descendance. La persistance des symbioses, mutualistes ou non, dépend des effets qu'ont les symbiotes sur leur hôte, de leur route de transmission mais également de l'efficacité de cette transmission (Darby & Douglas, 2003 ; Douglas, 2008 ; Fine, 1975 ; Gundel, Rudgers, & Ghersa, 2011 ; Herre *et al*., 1999 ; Rock *et al*., 2018). Bien que la transmission de symbiotes de parents à descendants *via* les soins parentaux puisse être suspectée dans de nombreux cas, peu d'études n'en ont fait à ce jour la démonstration. De plus, aucune étude n'a visé à étudier l'efficacité de ces voies de transmission verticale. Ce travail de thèse porte sur le mode et l'efficacité de transmission des symbiotes composant le microbiote intestinal d'un insecte eusocial, le termite xylophage *Reticulitermes grassei*. Le prochain chapitre va présenter la biologie de ce modèle et le suivant portera sur la problématique et les questions spécifiques de ma thèse.

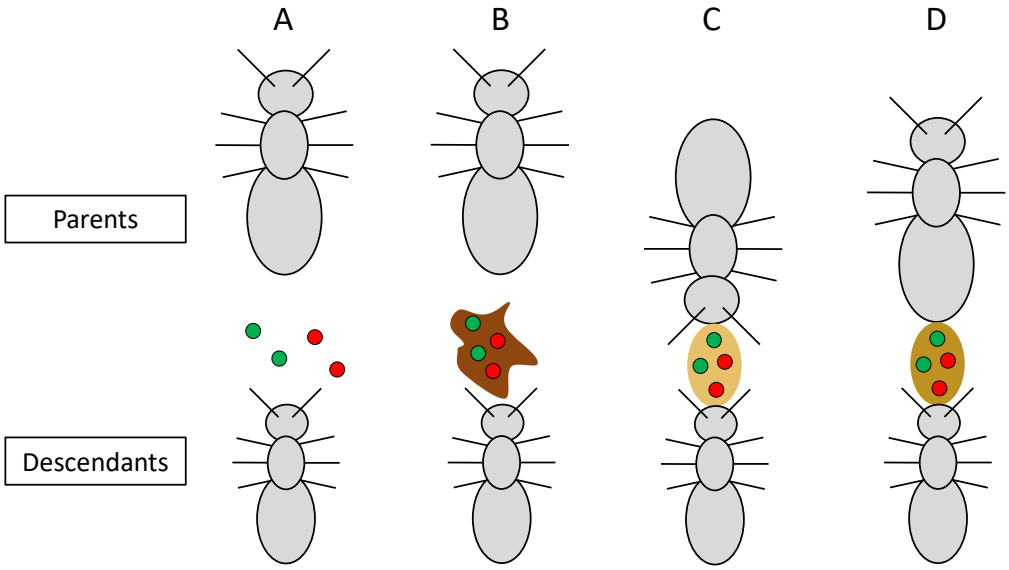


Figure 10 : Routes de transmission verticale chez les insectes sociaux. (A) Inoculation du site de développement commun aux parents et descendants. (B) Coprophagie filiale. (C) Trophallaxie stomodéale. (D) Trophallaxie proctodéale. Les cercles rouges et verts représentent les symbiotes intestinaux transmis. Repris de Onchuru *et al.* (2018).

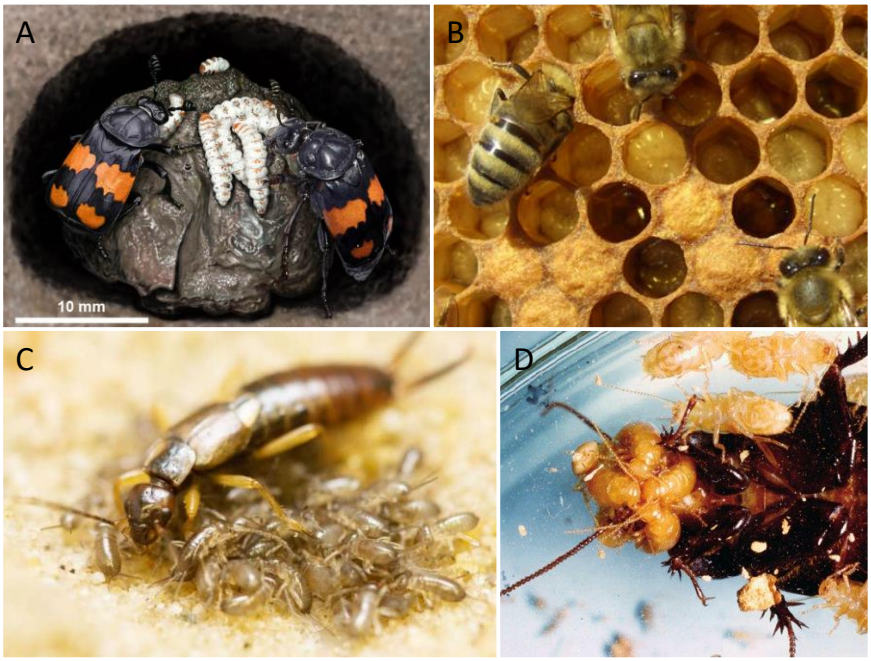


Figure 11 : Photographies d'insectes sociaux procurant des soins à leurs jeunes. (A) Couples de nécrophores s'occupant de leurs larves. (B) Abeilles mellifères nourrissant des larves. (C) Femelle forficule gardant ses nymphes. (D) Nymphes d'une blatte xylophage se nourrissant des fluides stomodéaux de leur mère (notez la présence des antennes de la femelle). Crédits photographiques : (A) V. A. Timokhanov, (C) J. Meunier, (D) Maekawa et al. (2008).

Chapitre II :

Présentation du modèle d'étude



© Paride Bertolin (JAB) 2013

1. Généralités sur les termites

Les termites (Blattoidea : Termitoidae) (Evangelista, Thouzé, Kohli, Lopez, & Legendre, 2018) sont des insectes présents sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique. Leur biomasse est la plus importante dans les écosystèmes terrestres tropicaux et subtropicaux où ils sont les principaux décomposeurs de la matière organique (Sugimoto, Bignell, & MacDonald, 2000). Ils jouent un rôle très important dans les écosystèmes principalement en dégradant et recyclant la lignocellulose, et en participant à l'aération des sols lors de la recherche de nourriture et de la construction des nids. Environ 3 000 espèces de termites ont été décrites jusqu'à ce jour (Krishna, Grimaldi, Krishna, & Engel, 2013), et peu d'entre elles causent des dégâts aux constructions humaines.

Les termites constituent une lignée au sein des Dictyoptères ; ils se sont différenciés il y a environ 150 millions d'années lors de la radiation évolutive des blattes (Inward, Beccaloni, & Eggleton, 2007 ; Legendre *et al*., 2015). Ils forment un groupe monophylétique dont le groupe frère sont les blattes subsociales et xylophages du genre *Cryptocercus* (Cryptocercidae) (Figure 12) (Bourguignon *et al*., 2015 ; Evangelista *et al*., 2018 ; Inward *et al*., 2007). Comme chez les hyménoptères eusociaux (fourmis, abeilles, guêpes), les populations de termites sont organisées en colonies présentant une structure eusociale où la division du travail est basée sur un système de castes. Contrairement aux hyménoptères, l'eusocialité est apparue une seule fois chez les termites (Crozier & Pamilo, 1996 ; Thorne, 1997). Plusieurs caractéristiques distinguent les termites des hyménoptères sociaux. En effet, les termites ont un système diplo-diploïdes, ils présentent un développement hémimétabole (*i.e*., les individus muent une grande partie de leur vie), et chaque caste peut être composée de femelles et de mâles (Howard & Thorne, 2011 ; Thorne, 1997).

Les termites comptent huit familles divisées en deux groupes (Figure 12) : les termites dits 'inférieurs', lesquels incluent les familles Mastotermitidae, Stolotermitidae, Hodotermitidae, Archotermopsidae, Kalotermopsidae, Serritermitidae et Rhinotermitidae, et les termites dits 'supérieurs' représentés par la famille des Termitidae (Bourguignon *et al*., 2015). Les appellations 'inférieur' et 'supérieur' dépendent respectivement de la présence ou de l'absence de protistes flagellés dans l'intestin postérieur de l'hôte, des procaryotes intestinaux (archées et bactéries) étant retrouvés chez tous les termites. Les protistes flagellés ont été acquis par l'ancêtre commun du groupe formé par les blattes du genre *Cryptocercus* et les termites ; ils ont été perdus secondairement chez les termites supérieurs (Figure 12) (Brune

& Dietrich, 2015 ; Ikeda-Ohtsubo & Brune, 2009 ; Ohkuma, Noda, Hongoh, Nalepa, & Inoue, 2009).

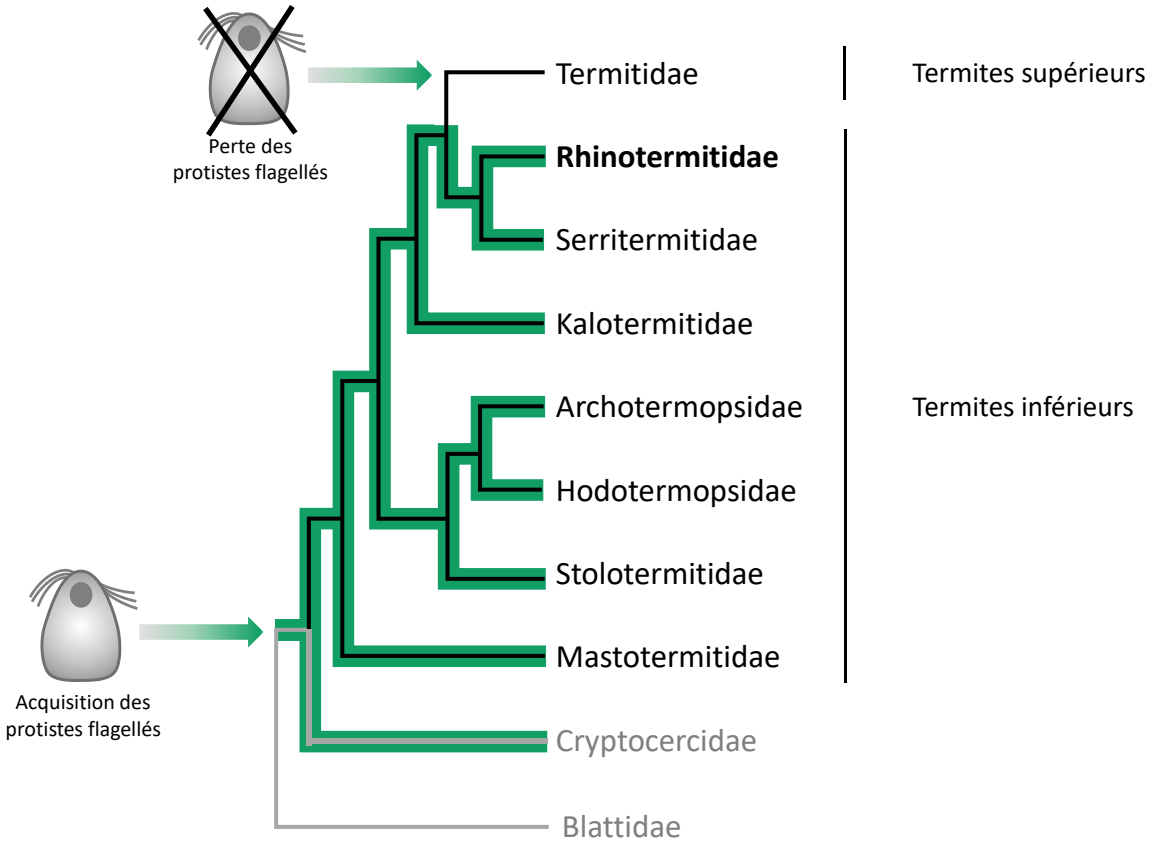


Figure 12 : Arbre phylogénétique schématique des familles de termites et de leur groupe frère les blattes Cryptocercidae. Phylogénie d'après Bourguignon *et al.* (2015), basée sur les analyses moléculaires des gènes 12S, 16S et COII. En gris : Blattoidea n'appartenant pas aux Termitoidae. Les branches soulignées de vert représentent les lignées portant des protistes flagellés intestinaux. En gras : la famille des termites du genre *Reticulitermes*, le modèle d'étude de cette thèse.

L'acquisition des flagellés cellulolytiques a constitué un événement clé dans l'évolution des termites puisqu'ils ont permis la digestion de la lignocellulose et ainsi l'exploitation d'une ressource très abondante dans la biosphère, le bois mort (Bignell & Eggleton, 2000). Les termites inférieurs se nourrissent exclusivement de bois, tandis que les termites supérieurs présentent des sources d'alimentation plus diversifiées parmi lesquelles on trouve, en plus du bois, l'humus, le sol, la litière, l'herbe ou encore les champignons (Bignell & Eggleton, 2000 ; Eggleton, 2011). Cette forte diversification alimentaire se traduit par une radiation évolutive importante des termites supérieurs qui représentent environ 75 % des espèces de termites (Krishna *et al.*, 2013).

Les travaux de cette thèse ont été menés sur les termites inférieurs strictement xylophages du genre *Reticulitermes* (Rhinotermitidae) (Figure 12) (Bourguignon *et al*., 2015). Tous les *Reticulitermes* ont un mode de vie souterrain. La diversification de ce genre est estimée à 18.4 millions d'années, avec pour origine le continent Nord-Américain (Dedeine *et al*., 2016). Les termites du genre *Reticulitermes* vivent principalement dans les régions tempérées, 138 espèces ont été décrites et sont réparties en quatre lignées en fonction de leur origine biogéographique : la lignée Nord-Américaine, la lignée Ouest-Européenne, la lignée Est-Européenne et la lignée Est-Asiatique (Dedeine *et al*., 2016 ; Krishna *et al*., 2013). La suite de cette présentation portera principalement sur les termites inférieurs, en particulier les Rhinotermitidae du genre *Reticulitermes*.

2. Cycle de vie des termites *Reticulitermes*

Les populations de termites sont organisées en colonies. Le fonctionnement et l'efficacité de ces colonies reposent sur la division du travail basée sur une répartition des tâches (*i.e*., polyéthisme) et un système de castes morphologiques (*i.e*., polyphénisme). Les ouvriers (Figure 13A) sont spécialisés dans la recherche de nourriture et le nourrissage des autres castes, dans le soin aux jeunes et dans la construction du nid, et les soldats (Figure 13E) assurent la défense de la colonie (Crosland, Lok, Wong, Shakarad, & Traniello, 1997). Les reproducteurs assurent quant à eux la reproduction. Il existe deux types de reproducteurs chez les termites : les reproducteurs primaires, également appelés ailés ou alates (Figure 13F), et les reproducteurs secondaires, aussi nommés néoténiques (Lainé & Wright, 2003). Les reproducteurs primaires sont pigmentés, ils possèdent des yeux et des ailes et ils vont essaimer et se disperser au printemps pour fonder de nouvelles colonies en couple royal (Figure 13B et F). Les reproducteurs secondaires sont non pigmentés, ils ne possèdent pas d'yeux ni d'ailes et ils vont rester dans la colonie (*i.e.*, philopatrie) et remplacer ou compléter la reproduction des reproducteurs primaires dans les colonies matures.

A la naissance, les individus se dirigent par mues successives soit vers la lignée ouvrière qui donnera des ouvriers, des soldats et des reproducteurs secondaires aptères, soit vers la lignée nymphale qui donnera deux types de nymphes : des nymphes à courts fourreaux alaires (Figure 13C) et des nymphes à longs fourreaux alaires (Figure 13D et Figure 14) (Lainé & Wright, 2003). Les nymphes à courts fourreaux alaires mueront en reproducteurs secondaires

brachyptères et celles à longs fourreaux alaires donneront les reproducteurs primaires ailés après une mue imaginale (Figure 14) (Lainé & Wright, 2003).

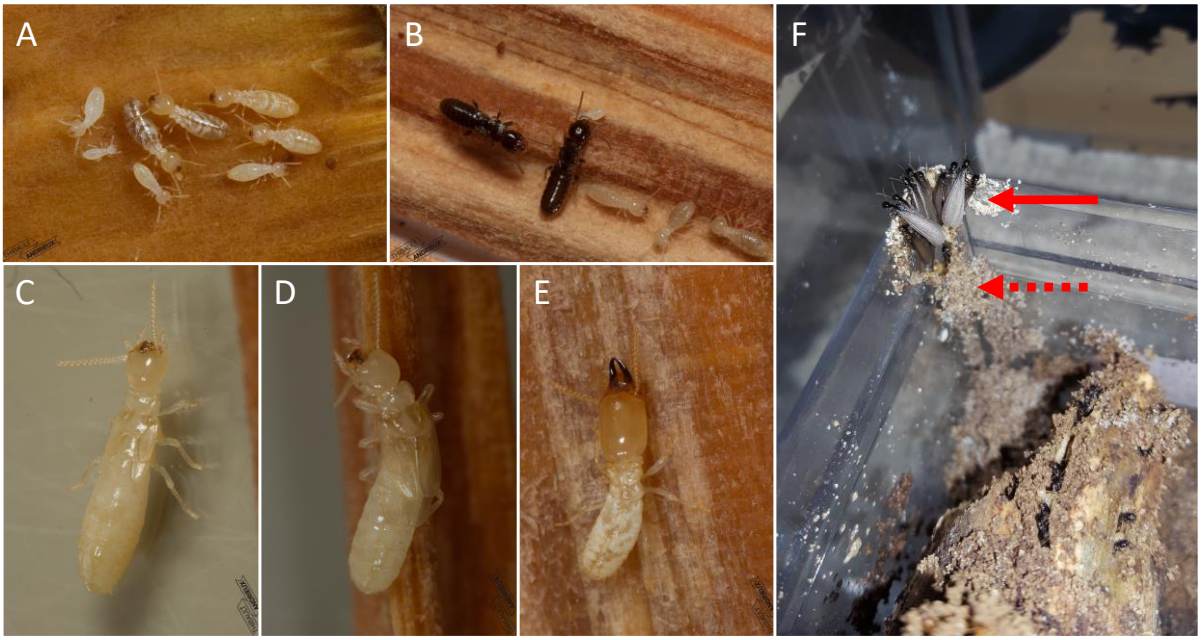


Figure 13 : Photographies des différentes castes chez les termites du genre *Reticulitermes*. (A) Ouvriers et larves. (B) Reine et roi avec leurs descendants. (C) Nymphe à courts fourreaux alaires. (D) Nymphe à longs fourreaux alaires. (E) Soldat. (F) Alates prêts à essaimer de la colonie parentale (flèche pleine) par un tunnel d'envol (flèche en pointillé). Crédits photographiques : T. Andrieux (A-E) et C. Michaud (F).

Les facteurs et mécanismes impliqués dans la différenciation des castes restent encore largement méconnus chez les termites. Elles seraient déterminées par des interactions complexes entre des facteurs génétiques et environnementaux. Chez les *Reticulitermes*, il a été montré qu'une forte augmentation de l'hormone juvénile dans les ouvriers induisait une différenciation en reproducteur secondaire et qu'une dose encore plus forte induisait la différenciation en pré-soldat puis soldat (Elliott & Stay, 2007, 2008 ; Miura, 2001 ; Park & Raina, 2004 ; Scharf, Ratliff, Hoteling, Pittendrigh, & Bennett, 2003). L'hormone juvénile jouerait donc un rôle important dans la différenciation des castes, mais les facteurs modulant cette expression d'hormones ne sont pas encore clairement identifiés. La plasticité développementale menant aux ouvriers, soldats et reproducteurs à partir d'un background génétique proche pourrait être liée à des facteurs externes comme la nourriture, les interactions sociales ou encore la saison (Lenz, 1976 ; Matsuura, Himuro, Yamamoto, Vargo, & Keller, 2010 ; Miura & Scharf, 2011 ; Scharf, Buckspan, Grzymala, & Zhou, 2007 ; Smith, Anderson, Tillberg, Gadau, & Suarez, 2008). Cependant, il a été montré chez les *Reticulitermes* que le

phénotype des parents (lignée nymphale ou lignée ouvrière) avait une influence sur la future caste de leurs descendants, suggérant l'implications de facteurs héritables dans la détermination des castes (Hayashi, Lo, Miyata, & Kitade, 2007 ; Kitade *et al*., 2010). Une étude menée sur *Reticulitermes speratus* a récemment montré que des facteurs épigénétiques pourraient également être impliqués (Matsuura *et al*., 2018).

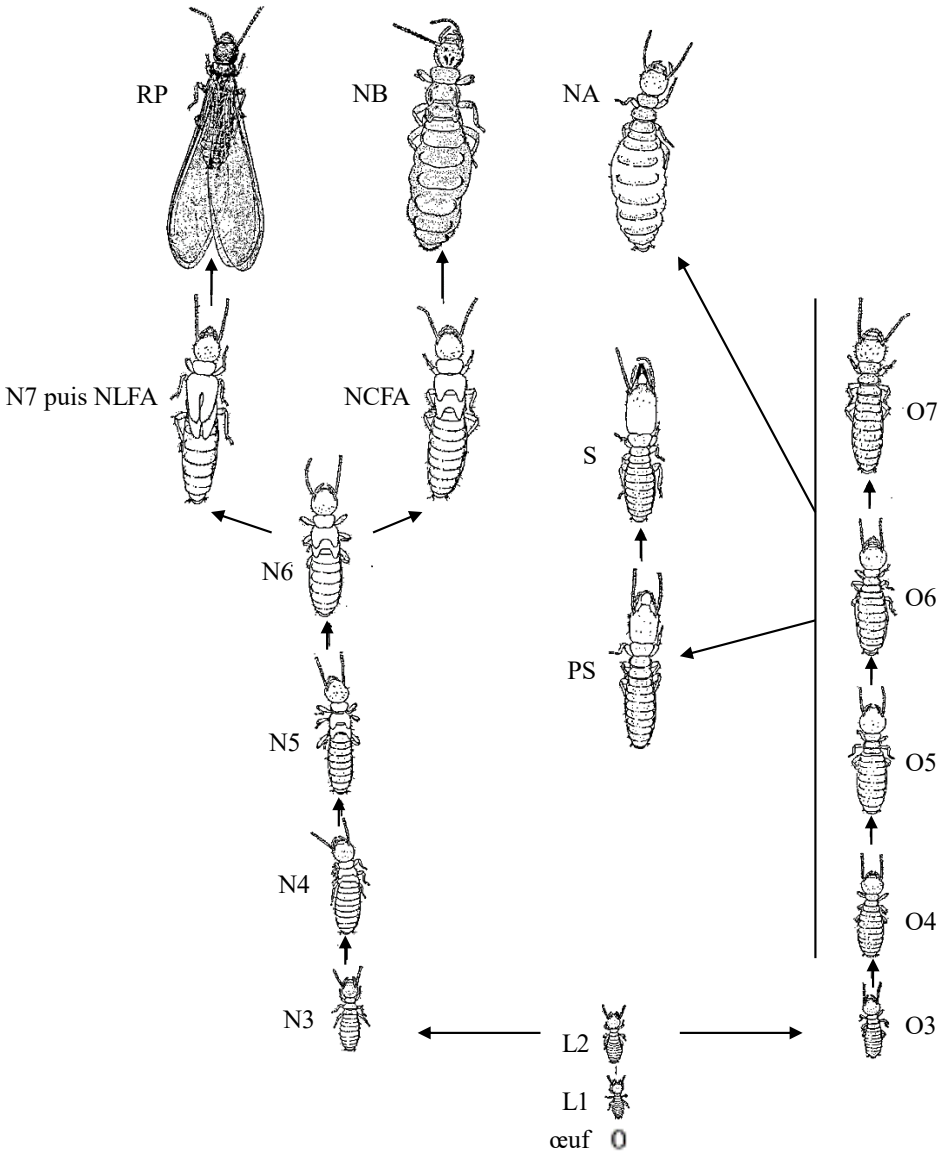


Figure 14 : Cycle de vie des termites du genre *Reticulitermes*. A gauche la lignée nymphale et à droite la lignée ouvrière. Les individus muent successivement au cours de leur vie (flèches), les chiffres à côté des abréviations représentent le nombre de mues. L : larve. N : nymphe. NCFA : nymphe à courts fourreaux alaires. NB : néoténique brachyptère. NLFA : nymphe à longs fourreaux alaires. RP : reproducteur primaire. O : ouvrier. PS : pré-soldat. S : soldat. NA : néoténique aptère. Dessin de Buchli (1958), modifié d'après Lainé & Wright, 2003.

3. Microbiote intestinal chez les termites inférieurs

Le système intestinal des termites est le lieu d'une symbiose multiple impliquant des membres appartenant aux trois domaines de la vie (*i.e.*, Archées, Eubactéries et Eucaryotes) (Brune & Stingl, 2005). Pour accueillir cette diversité microbienne, la partie P3 de l'intestin postérieur des termites inférieurs constitue une poche très large, la panse rectale, qui est un environnement microoxique en périphérie et anoxique et riche en dihydrogène dans le lumen (Figure 15) (Ebert & Brune, 1997). Le bois est composé de fibres de lignocellulose (*i.e.*, complexe de lignine, cellulose et hémicellulose), laquelle est particulièrement récalcitrante aux attaques enzymatiques, mais les termites sont capables de rapidement la minéraliser (Brune, 1998 ; Brune & Dietrich, 2015). Les intestins de termites abritent une grande diversité de taxa microbiens incluant de nombreuses bactéries, quelques archées et, chez les termites inférieurs, une communauté d'eucaryotes unicellulaires unique (*i.e.* des protistes flagellés parabasaliens et oxymonades) (Ohkuma & Brune, 2011). Ces protistes aident l'hôte à dégrader la lignocellulose (Cleveland, 1923), tandis que les procaryotes sont impliqués dans des fonctions plus spécialisées comme la fixation de l'azote atmosphérique, l'acétogénèse ou encore la synthèse d'acides aminés (pour revue : Brune, 2014 ; Brune & Dietrich, 2015). Cette symbiose nutritionnelle est obligatoire puisque, même s'ils continuent à ingérer du bois, les termites privés de leurs protistes meurent aussi vite que des termites non nourris (Cleveland, 1923).

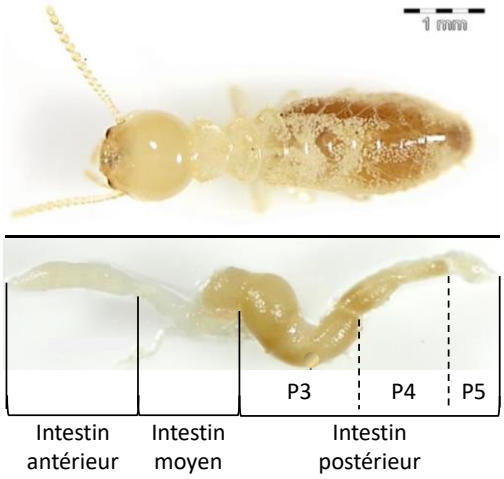


Figure 15 : Photographies d'un ouvrier (au-dessus) et d'un intestin d'ouvrier (en-dessous) de *Reticulitermes grassei*. Chez les termites inférieurs, l'intestin postérieur est divisé en trois compartiments proctodéaux (P3-P5). Le compartiment P3 correspond à la panse rectale contenant les symbiotes intestinaux. Photographies d'après Duarte, Nunes, *et al*. (2017).

3.1. Diversité symbiotique

3.1.1. Les protistes flagellés

C'est à la fin de XIXe siècle que Leidy identifie la présence de 'parasites' dans les intestins de termites mais conclut que « leur infection est si habituelle et constante qu'elle apparait comme leur condition normale » (1881). Ces 'parasites' sont en réalité des protistes mutualistes qui sont maintenant bien connus. Les protistes flagellés présents chez les termites et blattes Cryptocercidae font partie des phyla Parabasalia et Preaxostyla (ordre Oxymonadida) appartenant au supergroupe des Excavata (Adl *et al*., 2019 ; Čepička, Dolan, & Gile, 2016 ; Hampl, 2016). Environ 450 espèces distinctes de protistes flagellés ont été décrites chez les termites inférieurs et blattes subsociales (revue dans : Kitade & Matsumoto, 1998 ; Yamin, 1979). Historiquement, ces espèces ont été décrites et classifiées selon des critères morphologiques, bien que l'approche moléculaire ait récemment permis d'améliorer nos connaissances sur leurs relations phylogénétiques (Boscaro *et al*., 2017 ; Gile *et al*., 2018 ; Keeling, 2002 ; Noda *et al*., 2012 ; Strassert, Desai, Brune, & Radek, 2009). Une grande partie de ces protistes sont spécifiques aux intestins de termites, on ne les retrouve pas chez d'autres hôtes ni sous forme libre dans l'environnement (Inoue *et al*., 2000 ; Ohkuma & Brune, 2011 ; Yamin, 1979).

La plupart des protistes flagellés présents dans les intestins de termites sont des parabasaliens (Ohkuma & Brune, 2011). Les genres de parabasaliens retrouvés chez les termites du genre *Reticulitermes* sont *Cthylla*, *Hexamastix*, *Holomastigotes*, *Microjoenia*, *Monocercomonas*, *Spironympha*, *Spirotrichonympha*, *Teranympha*, *Trichomitus* et *Trichonympha* (Figure 16 sauf a, b, g et h) (Kitade & Matsumoto, 1998 ; Lewis & Forschler, 2004 ; Yamin, 1979). Les flagellés parabasaliens sont généralement de larges cellules de un à plusieurs dizaines de microns possédant de multiples flagelles et un appareil parabasal probablement impliqué dans la production d'énergie métabolique. Les parabasaliens sont capables de phagocyter des particules de bois et produisent de nombreuses cellulases. Les protistes oxymonades ne sont pas retrouvés chez tous les termites inférieurs (Brune & Dietrich, 2015). Contrairement aux autres genres de la famille des Rhinotermitidae, les *Reticulitermes* portent également dans leurs intestins des protistes oxymonades du genre *Dinenympha* et *Pyrsonympha* (Figure 16a, b, g et h). Les *Pyrsonympha* ont la capacité de s'attacher à la paroi intestinale, les autres sont motiles dans le fluide intestinal (Brugerolle & Lee, 1985).

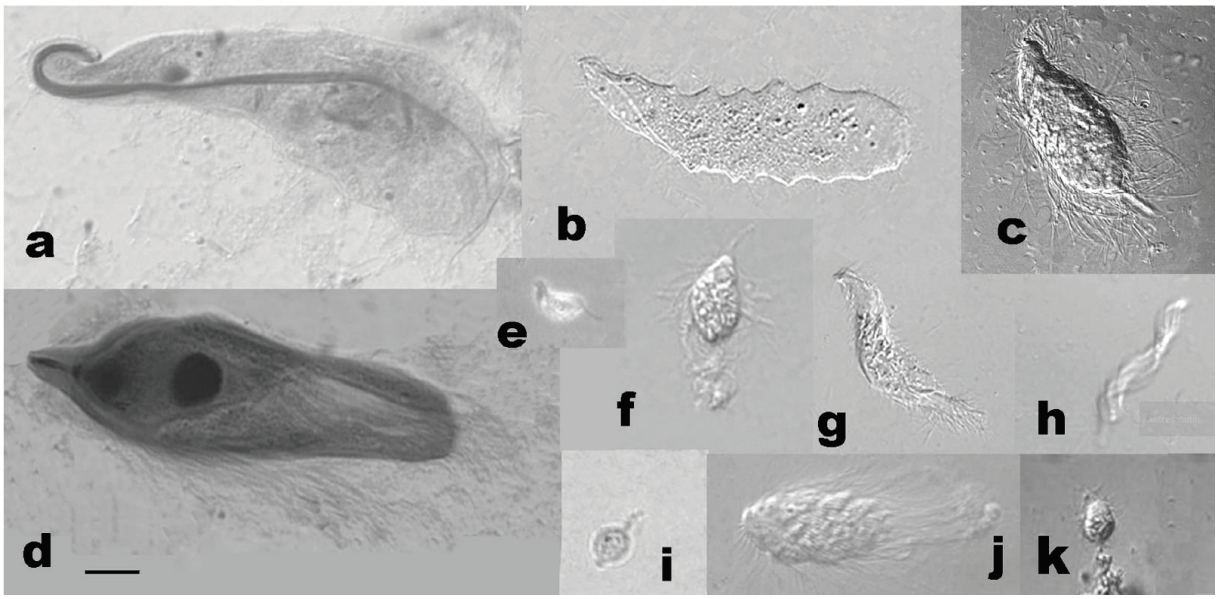


Figure 16 : Microscopie optique des espèces de protistes présentes chez *Reticulitermes flavipes*. (a) Pyrsonympha vertens. (b) Pyrsonympha major. (c) Spirotrichonympha flagellata. (d) Trichonympha agilis. (e) Trichomitus trypanoides. (f) Spironympha kofoidi. (g) Dinenympha fimbriata. (h) Dinenympha gracilis. (i) Monocercomonas sp. (j) Holomastigotes elongatum. (k) Microjoenia fallax. La barre représente 10 µm. D'après Lewis & Forschler (2004).

3.1.2. Les procaryotes

Plus de 15 phyla bactériens ont été recensés sur l'ensemble des termites et des blattes (Ohkuma & Brune, 2011). Chez les *Reticulitermes*, les phyla bactériens les plus abondants de leur communauté intestinale sont au nombre de cinq : les Spirochaetes, les Elusimicrobia, les Firmicutes, les Proteobacteria et les Bacteroidetes (Figure 17) (Dietrich, Köhler, & Brune, 2014).

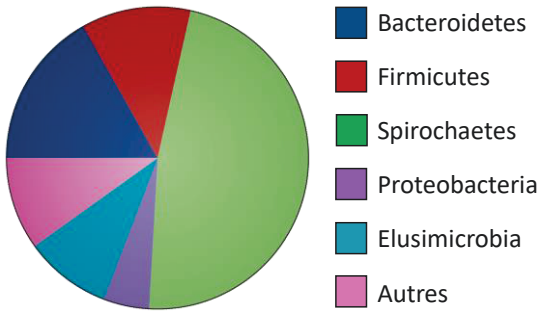


Figure 17 : Abondance relative et diversité bactérienne dans les intestins de *Reticulitermes speratus*. D'après Brune, 2014.

On distingue deux types de procaryotes dans les intestins de termites : (i) ceux vivant librement dans le fluide intestinal ou accrochés à la paroi intestinale des termites (Brugerolle, 2004 ; Brune & Stingl, 2005 ; Carpenter *et al*., 2013 ; Cleveland & Grimstone, 1964 ; Tamschick & Radek, 2013), et (ii) ceux qui vivent eux-mêmes en symbiose avec les protistes. Ces derniers pourraient d'ailleurs représenter plus de 85 % du nombre de cellules procaryotes ; ils montrent un fort niveau d'interaction avec leurs hôtes puisqu'on les retrouve attachés à la surface des protistes, dans leur cytoplasme ou encore dans leur nucléoplasme (Berchtold *et al*., 1999 ; Dolan, 2001 ; Lee, Schreurs, Messer, & Zinder, 1987 ; Noda, Hongoh, Sato, & Ohkuma, 2009 ; Ohkuma, 2008 ; Sato *et al*., 2014 ; Stingl, Radek, Yang, & Brune, 2005 ; Strassert, Desai, Radek, & Brune, 2010 ; Tai *et al*., 2015). Ces symbioses secondaires jouent un rôle fonctionnel très important dans la symbiose nutritionnelle avec le termite puisque, dans un même protiste, les procaryotes peuvent présenter des fonctions complémentaires voire synergétiques (*i.e.*, syntrophie).

Les Spirochaetes sont des membres caractéristiques de toutes les communautés intestinales de termites (Breznak & Leadbetter, 2006 ; Hongoh, 2011), elles représentent généralement plus de la moitié de la communauté bactérienne des termites du genre *Reticulitermes* (Dietrich *et al*., 2014). Elles sont diversifiées phylogénétiquement et présentent des lignées spécifiques aux intestins de termites, dont les *Treponema* clusters I et II (Bourguignon *et al*., 2018 ; Hongoh *et al*., 2005 ; Ohkuma *et al*., 2015). Ces bactéries peuvent être libres dans les intestins de termites mais elles sont plus fréquemment ectosymbiotiques de plusieurs espèces de protistes (Iida, Ohkuma, Ohtoko, & Kudo, 2000 ; Inoue, Noda, Hongoh, Ui, & Ohkuma, 2008 ; Noda, Ohkuma, Yamada, Hongoh, & Kudo, 2003 ; Ohkuma & Brune, 2011 ; Wenzel, Radek, Brugerolle, & König, 2003).

Pendant longtemps, la nature et l'identité des endosymbiotes associés aux larges protistes intestinaux de *Reticulitermes* étaient inconnues du fait notamment qu'ils ne sont pas cultivables. Les clones de ces bactéries étaient assignés au '*Termite Group 1'* (Hongoh, Ohkuma, & Kudo, 2003 ; Ohkuma & Kudo, 1996 ; Yang, Schmitt-Wagner, Stingl, & Brune, 2005). Ces bactéries représentent un genre à part entière, *Endomicrobium*, dans le phylum Endomicrobia (Stingl *et al*., 2005). Les *Endomicrobia* sont exclusivement retrouvées chez les termites inférieurs et les blattes du genre *Cryptocercus*, les seuls insectes en symbiose nutritionnelle avec des flagellés oxymonades et parabasaliens (Stingl *et al*., 2005). La perte secondaire des flagellés chez les termites supérieurs se serait accompagnée de la perte des *Endomicrobia* (Stingl *et al*., 2005).

Les Firmicutes sont représentées par des lignées communes aux environnements intestinaux dont les genre *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae*, ou alors elles peuvent être spécialisées à la cuticule de l'intestin postérieur d'arthropodes (Thompson, Vier, Mikaelyan, Wienemann, & Brune, 2012). Les Proteobacteria présentent également des lignées plutôt généralistes. Cependant, le clade Rs-K70 du genre *Desulfovibrio* est souvent associé aux protistes des intestins de termites (Rosenthal *et al*., 2013 ; Sato *et al*., 2009 ; Strassert *et al*., 2012). Les Bacteroidetes présentent beaucoup de taxa généralistes dans la colonisation des intestins d'animaux (Pramono, Sakamoto, Iino, Hongoh, & Ohkuma, 2015 ; Sakamoto & Ohkuma, 2013), mais certaines lignées sont spécifiques aux intestins de termites dont certaines *Bacteroidales* (Noda *et al*., 2009 ; Schauer, Thompson, & Brune, 2012). Les *Bacteroidales* peuvent être endo- ou ectosymbiotiques de différentes espèces de protistes (Hongoh *et al*., 2007 ; Noda *et al*., 2009 ; Noda, Kawai, Nakajima, Kudo, & Ohkuma, 2006 ; Noda *et al*., 2007 ; Noda, Iida, *et al*., 2005 ; Noda, Inoue, *et al*., 2005 ; Stingl, Maass, Radek, & Brune, 2004 ; Strassert *et al*., 2010 ; Wenzel *et al*., 2003). Des archées méthanogènes sont également présentes chez les termites inférieurs et sont généralement endosymbiotiques de plusieurs espèces de protistes (Tokura, Ohkuma, & Kudo, 2000).

3.2. Système cellulolytique double, fermentation et nutrition

Chez les termites inférieurs, la digestion de la lignocellulose implique l'activité cellulolytique à la fois de l'hôte et de ses protistes flagellés, ainsi que la fermentation des bactéries. Les particules de bois ingérées par les termites sont mélangées à des enzymes produites dans leurs glandes salivaires au niveau de l'intestin antérieur (Nakashima, Watanabe, Saitoh, Tokuda, & Azuma, 2002 ; Ni & Tokuda, 2013). Ces enzymes vont permettre en partie la dégradation du bois et la libération de molécules de glucose qui seront absorbées par l'épithélium au niveau de l'intestin moyen. Lorsque les particules de bois partiellement digérées passent dans l'intestin postérieur, elles sont phagocytées par les protistes flagellés (Nakashima *et al*., 2002 ; Ni & Tokuda, 2013). Les protistes sont des usines à cellulases et hémicellulases. La grande diversité de cellulases présente dans les protistes (exoglucanases, endoglucanases, β-glucosidases) permet une dégradation très efficace de la lignocellulose avec la conversion de 74 à 99 % de la cellulose et 65 à 87 % de l'hémicellulose, des taux de conversion inégalés même chez les ruminants (Breznak & Brune, 1994 ; Dedeine *et al*., 2015 ; Watanabe & Tokuda, 2010). L'hydrolysation des polysaccharides phagocytés permet la production de sucres stockés sous

forme d'acétates qui seront majoritairement transformés grâce à la fermentation bactérienne dans les protistes en acides gras à chaines courtes, une forme assimilable par l'hôte (Figure 18) (Breznak & Brune, 1994 ; Nakashima *et al*., 2002 ; Ni & Tokuda, 2013).

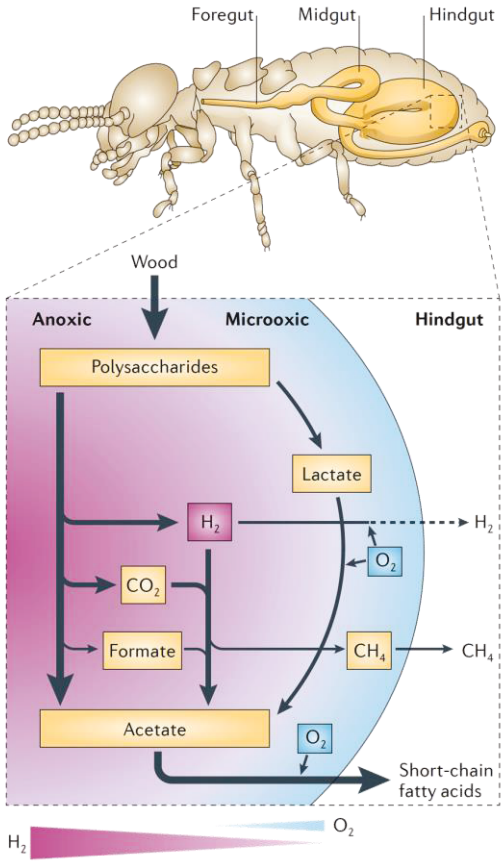


Figure 18 : Procédés microbiens majeurs dans la panse des termites inférieurs. Les protistes cellulolytiques hydrolysent les polysaccharides du bois en sucres qui sont transformés en acides gras assimilables par l'hôte grâce à la fermentation bactérienne. D'après Brune (2014).

La dépolymérisation du bois produit de l'hydrogène comme composant intermédiaire qui est notamment responsable de l'environnement anoxique dans le lumen de la panse des termites (Ebert & Brune, 1997). Cet hydrogène provoque la méthanogenèse et l'acétogénèse réductive (Figure 18) (Breznak, 2000). Un des rôles les plus importants des bactéries est de supplémenter les hôtes en azote qui est très pauvre dans la lignocellulose. Les bactéries fixent, recyclent et rendent assimilable l'azote pour les termites (Brune, 2014 ; Hongoh, 2011). La biomasse bactérienne riche en nutriments est produite dans les intestins des individus avant d'être transmise aux autres membres de la colonie par trophallaxie proctodéale (Breznak, 2000). Alors que cette biomasse est digérée par les enzymes de l'hôte, les acides aminés et vitamines qu'elle contenait sont assimilés au niveau de l'intestin moyen (Figure 19) (Fujita, 2004). Les

déchets produits par l'hôte sont majoritairement de l'acide urique. Ils passent du corps gras à la panse par les tubes de Malpighi où ils sont rapidement transformés en ammoniac (Figure 19) (Breznak, 2000). Les bactéries ectosymbiotiques des protistes flagellés assimilent l'ammoniac voire fixent l'azote atmosphérique, elles sont ensuite phagocytées et digérées (Figure 19) (Brune, 2014 ; Hongoh, 2011). Les bactéries endosymbiotiques des protistes flagellés peuvent fixer l'azote atmosphérique et recycler l'acide urique en acides aminés et vitamines (Figure 19) (Brune, 2014 ; Hongoh, 2011).

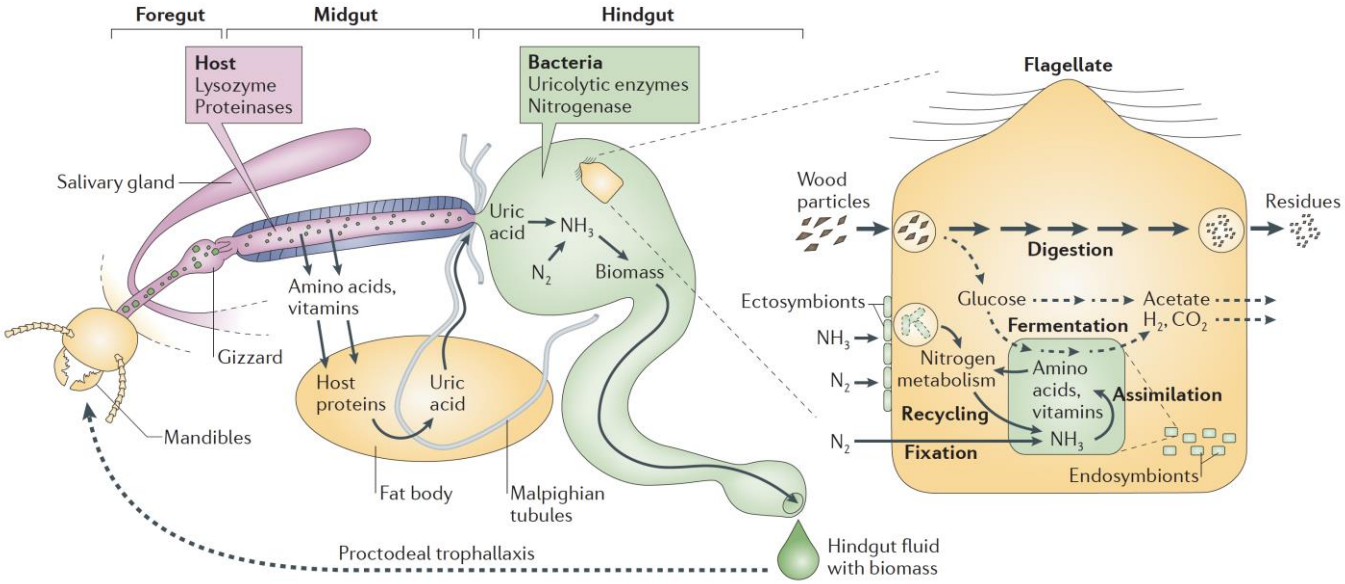


Figure 19 : Cycle de l'azote chez les termites inférieurs. Les fluides échangés entre les membres de la colonie sont riches en microorganismes qui ont synthétisés des nutriments. Ces nutriments sont absorbés par l'hôte dans l'intestin moyen et les déchets azotés produits par le métabolisme de l'hôte sont recyclés par les bactéries à l'intérieur des protistes dans l'intestin postérieur. D'après Brune (2014).

4. Maintien des symbiotes dans les colonies

Dans les colonies de termites, les symbiotes intestinaux sont présents chez une grande partie des différentes castes, mais la majorité de la communauté symbiotique est portée par les ouvriers puisque ce sont eux qui mangent le bois, le dégradent et nourrissent les autres castes (Benjamino & Graf, 2016 ; Nalepa, 2017, p. 201 ; Shimada, Lo, Kitade, Wakui, & Maekawa, 2013). Dans une colonie mature, il ne faut pas considérer la communauté symbiotique au niveau individuel des membres de la colonie, mais à l'échelle globale de cette colonie (Nalepa, 2017). En effet, les individus perdent leur microbiote à chaque fois qu'ils muent. Chez les termites, les

protistes meurent et sont exclus des intestins avant la mue de leur hôte (Andrew, 1930 ; Cleveland, 1925b, 1960 ; Grassé, 1952 ; Nutting, 1956). Chez certaines espèces, ces protistes sont perdus une semaine avant la mue de l'individu (Lüscher, 1960 ; Raina, Park, & Gelman, 2008). Une augmentation du taux d'ecdysone dans l'hôte qui arrête de se nourrir avant de muer induirait cette perte (Cleveland, 1949 ; Cleveland & Nutting, 1955). Les fèces des termites ne contiennent aucune forme vivante de protistes, active ou résistante (Andrew, 1930 ; Cleveland, 1949 ; Cleveland *et al*., 1934 ; Kirby, 1949), le seul moyen de réacquérir des symbiotes est donc par trophallaxie proctodéale avec d'autres membres de la colonie (Nalepa, 2015). A un instant donné, un ouvrier ne porte pas forcément tous les symbiotes circulants dans la colonie, il faut donc prendre les individus dans leur ensemble pour pouvoir estimer la diversité symbiotique présente dans une colonie.

5. Modes de transmission des symbiotes

Les modes de transmission des symbiotes intestinaux chez les termites sont peu connus. Il est souvent admis dans la communauté termitologue que le microbiote intestinal est transmis verticalement par les deux parents lors de la fondation d'une nouvelle colonie, Des analyses phylogénétiques menées sur les termites et certaines lignées de protistes ont mis en avant des patterns de cocladogenèse entre leurs phylogénies, avec parfois des événements de transferts horizontaux ou encore de pertes de symbiotes, suggérant que la transmission verticale des protistes serait efficace d'une génération de termite à une autre et serait un facteur majeur ayant participé à la diversification de ces associations (Desai *et al*., 2010 ; Kitade, 2004 ; Noda *et al*., 2007 ; Radek *et al*., 2018 ; Taerum, De Martini, Liebig, & Gile, 2018). Cependant, aucune étude n'a directement mesuré cette transmission.

5.1. Transmission verticale biparentale

5.1.1. Transmission sociale par trophallaxie proctodéale

Chez les termites inférieurs, la fondation de nouvelles colonies à généralement lieu une fois par an. Elle est assurée par les reproducteurs primaires suite à l'essaimage. C'est également suite à la fondation de nouvelles colonies que les symbiotes intestinaux pourraient être transmis aux descendants (Figure 20) (Diouf *et al*., 2018 ; Nalepa *et al*., 2001 ; Ohkuma *et al*., 2009 ; Shimada *et al*., 2013). Une fois différenciés, les alates quittent leur colonie parentale par des

tunnels d'envol construits par les ouvriers (Figure 13F page 64) pour un vol nuptial, ils dispersent puis trouvent un partenaire sexuel. Une fois au sol, les individus perdent leurs ailes, les femelles se mettent en position d'appel et émettent des phéromones sexuelles tandis que les mâles sont en recherche active de femelles (Buchli, 1960b ; Goetsch, 1933 ; Nutting, 1969). Lorsqu'un mâle trouve une femelle, ils se palpent mutuellement, se reconnaissent et, s'ils se choisissent, un tandem femelle-mâle se crée (Buchli, 1960b). En général, les couples formés proviennent de colonies non apparentées (Vargo & Husseneder, 2011). La femelle, suivie du mâle en tandem, cherche ensuite un site de ponte. Les deux partenaires creusent un copularium où les premiers œufs seront pondus (Buchli, 1960b ; Weesner, 1956). Les deux parents sont alors la reine et le roi d'une colonie nouvellement fondée (Figure 13B page 64). Ce sont eux qui vont s'occuper des œufs et procurer les soins à leur première cohorte de descendants (Figure 21A) (Goetsch, 1936 ; Grassé, 1952 ; Nalepa *et al.*, 2001 ; Ohkuma *et al.*, 2009). La transmission verticale serait alors biparentale car la reine et le roi peuvent effectuer des trophallaxies proctodéales envers leurs descendants (Figure 21B).

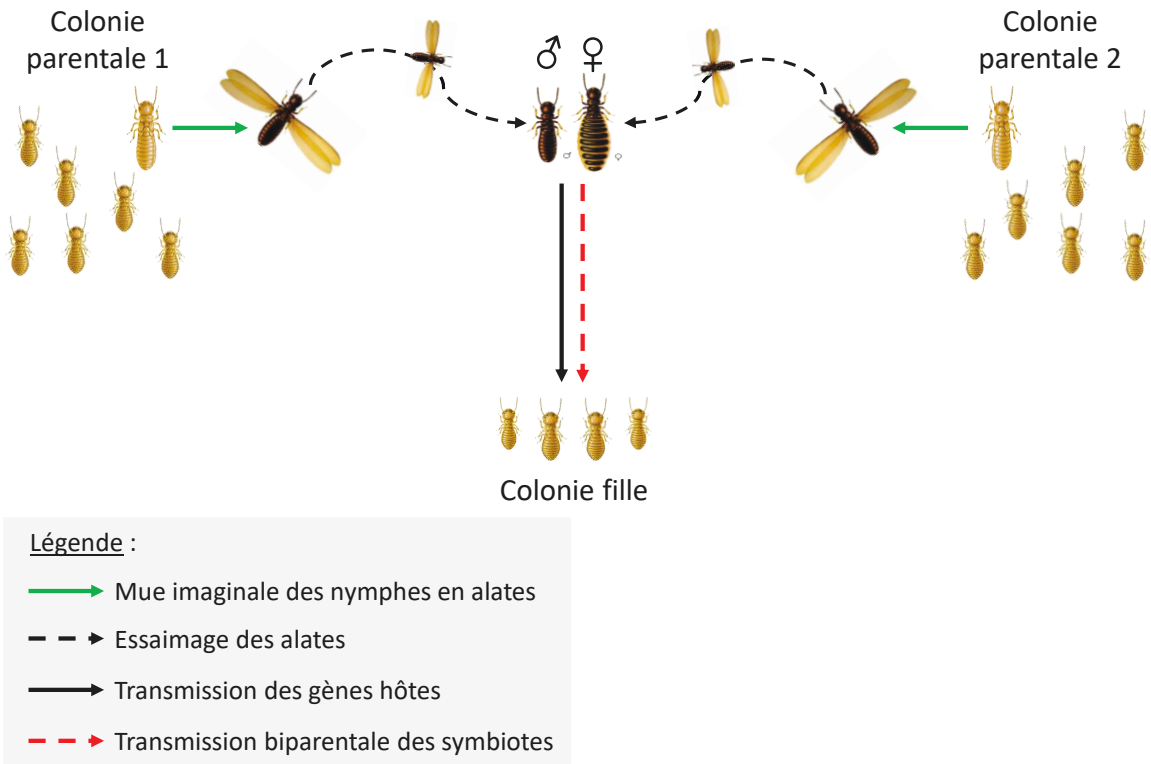


Figure 20 : Fondation d'une nouvelle colonie de termites. Des reproducteurs ailés essaiment de leur colonie parentale après la mue imaginale pour trouver un partenaire sexuel et fonder une nouvelle colonie de termites. C'est lors de la fondation de cette colonie que la reine et le roi transmetteraient leurs symbiotes intestinaux à leurs larves par trophallaxie proctodéale.



Figure 21 : Dessins d'observation (A) de reine et roi s'occupant de leurs œufs et (B) d'une reine procurant une trophallaxie proctodéale à une larve. Ces observations ont été réalisées chez le termite *Kalotermes flavicollis* (Kalotermitidae). D'après Goetsch (1936).

5.1.2. Goulot d'étranglement de la communauté microbienne

Une étude a montré une diminution de plus de 90 % du nombre total de protistes dans les intestins des alates par rapport aux nymphes (Lewis & Forschler, 2004). Cette mue imaginale pourrait induire un fort goulot d'étranglement symbiotique. Lorsque les alates partent de la colonie parentale pour aller en fonder une nouvelle, ils sont seuls (en couple) pour transmettre leurs symbiotes intestinaux à la descendance et c'est le seul moment au cours du cycle de vie des termites où le pool symbiotique peut être considéré au niveau individuel, notamment pour pouvoir estimer s'ils quittent la colonie parentale avec tout le pool symbiotique disponible dans cette dernière. Dès la formation du copularium, le nombre de protistes intestinaux augmente fortement dans les intestins de la reine et du roi, certainement pour leur permettre de transmettre les symbiotes aux premiers ouvriers (Shimada *et al*., 2013). Après 50 jours de fondation, correspondant au temps de développement des premiers ouvriers, le nombre de symbiotes intestinaux de la reine et du roi commence à diminuer jusqu'à leur disparition après un an de fondation (Shimada *et al*., 2013). La première cohorte d'ouvriers prend le relai pour le nourrissage des nouveaux membres de la colonie et pour la transmission des symbiotes, laissant au couple royal l'opportunité de se consacrer uniquement à la reproduction (Shimada *et al*., 2013). L'apport de symbiotes, s'il est vertical, serait donc bien réalisé d'une colonie parentale à une colonie fille *via* la transmission des symbiotes d'un reproducteur primaire à sa descendance.

5.2. Transmission horizontale

Il est surtout admis chez les termites que les symbiotes seraient acquis par les deux parents et présenteraient donc un mode de transmission verticale, surtout les protistes. Or, les études phylogénétiques ont également montré des événements de changements d'hôtes au cours

de la diversification évolutive des associations termites-protistes (Desai *et al*., 2010 ; Noda *et al*., 2007 ; Radek *et al*., 2018 ; Taerum *et al*., 2018). Les symbiotes seraient donc occasionnellement transmis horizontalement, ils présenteraient donc un mode de transmission mixte. Il reste cependant à savoir à quel point ces événements sont rares ou récurrents. Les protistes ne pouvant pas survivre en dehors de leurs hôtes, ils pourraient uniquement être transférés par contacts directs entre espèces hôtes (Andrew, 1930 ; Cleveland, 1949 ; Cleveland *et al*., 1934 ; Kirby, 1949). Ceci est probable puisque dans la nature plusieurs espèces de termites peuvent coexister sur un même morceau de bois (F. Dedeine, communication personnelle). De plus, au laboratoire, des études pilotes ont montré l'acquisition de protistes par prédation entre deux espèces de *Reticulitermes* (Guyot *et al*., données non publiées). Des transferts horizontaux de protistes sont donc possibles entre les lignées hôtes de termites mais ne sembleraient pas nécessairement fréquents.

Pour les bactéries, notamment celles ecto- et endosymbiotes de protistes, leur transmission était considérée uniquement verticale jusqu'à récemment. Cependant, Bourguignon et collaborateurs (2018) ont montré à l'échelle macro-évolutive des termites que la plupart des lignées de bactéries présentes dans les intestins de termites se sont spécialisées pour une ou plusieurs (sous-)familles de termites et présentaient une radiation évolutive significative dans ces hôtes, mais elles ne forment généralement pas de groupes monophylétiques, des bactéries généralistes d'intestins d'animaux voire environnementales sont phylogénétiquement nichées entre ces lignées. Ces résultats suggèrent que des transferts horizontaux récurrents de bactéries ont eu lieu entre les lignées hôtes voire même des acquisitions secondaires par l'environnement (Bourguignon *et al*., 2018).

Il semblerait donc y avoir une transmission verticale biparentale des protistes chez les termites, mais est-ce que celle-ci est efficace ? Concernant les bactéries, la question se pose de savoir quel est leur mode de transmission à chaque génération hôte.

Chapitre III :

Problématique

& Objectifs



© Paride Bertolin (JAB) 2013

1. Problématique générale de la thèse

Les symbioses microbiennes mutualistes sont ubiquistes et jouent un rôle majeur dans le fonctionnement des écosystèmes (Bosch & Miller, 2016 ; Douglas, 2018 ; McFall-Ngai *et al*., 2013 ; Moran *et al*., 2019). Leur stabilité au cours du temps reste cependant une problématique mal comprise (Frank, 1998 ; Jones *et al*., 2015 ; Maynard Smith, 1989 ; Sachs *et al*., 2011). En effet, des symbiotes tricheurs acquis par mutation ou par migration pourraient bénéficier des ressources de l'hôte sans en produire en retour, ils seraient ainsi avantagés et pourraient être sélectionnés dans la population symbiotique. La transmission verticale des symbiotes serait un mécanisme possible assurant le maintien de ces associations. En effet, lorsqu'elle est efficace, elle assurerait une fidélité entre les partenaires symbiotiques ce qui alignerait leurs intérêts évolutifs et défavoriserait les tricheurs (Sachs *et al*., 2004). Cette hypothèse a été testée dans quelques systèmes simples, c'est-à-dire entre un hôte et sa population symbiotique composée par une ou quelques espèces de symbiotes (Douglas, 1989 ; Hosokawa *et al*., 2006 ; Moran *et al*., 2008 ; Russell *et al*., 2019).

Dans de nombreux cas, il semblerait qu'un hôte héberge non pas une population mais une communauté symbiotique composée de plusieurs espèces de symbiotes (*i.e.*, un microbiote) comme les microbiotes intestinaux chez les animaux (Bosch & Miller, 2016 ; Douglas, 2018 ; McFall-Ngai *et al*., 2013 ; Moran *et al*., 2019). Ces microbiotes intestinaux sont impliqués dans des fonctions essentielles de leurs hôtes (Gilbert *et al*., 2018 ; Leitão-Gonçalves *et al*., 2017 ; Onchuru *et al*., 2018 ; Salem *et al*., 2015). Lorsqu'un hôte porte non pas une espèce de symbiote mais plusieurs, les différentes souches ou espèces microbiennes qui composent ces communautés symbiotiques coexistent et interagissent. Elles peuvent coopérer entre elles mais également entrer en compétition pour les ressources limitées de l'hôte et la transmission. Les variants microbiens avec un taux de réplication important pourraient être favorisés en supplantant leurs compétiteurs. Cependant, la sélection des symbiotes les plus compétiteurs pourrait augmenter la virulence dans l'hôte sans pour autant compenser ce coût par suffisamment de bénéfices, ce qui déstabiliserait le mutualisme (Frank, 1995, 1996, 1997).

Ces interactions antagonistes pourraient également entrainer l'exclusion de symbiotes pourtant bénéfiques pour l'hôte. Il a été montré chez le puceron que la présence de compétiteurs pouvait limiter la transmission de certains symbiotes à la descendance (Moran & Dunbar, 2006). Or, si les différents symbiotes présents dans un hôte apportent des effets complémentaires voir synergiques sur la production de bénéfices pour l'hôte, une diminution

de la diversité symbiotique dans la descendance constituerait une transmission verticale imparfaite, ce qui serait une limite au mutualisme selon le modèle de fidélité entre partenaire et donc à la persistance de certains symbiotes dans la population hôte (Sachs *et al*., 2004). Dans un contexte de mutualisme où les symbiotes sont uniquement transmis verticalement, la sélection au niveau inter-hôte pourrait limiter l'exclusion des symbiotes en compétition (Frank, 1996, 1997). Cependant, dans les communautés microbiennes, dont celles en symbiose mutualiste avec un hôte, il peut y avoir des redondances fonctionnelles entre les espèces de microorganismes, notamment lorsque celles-ci sont proches phylogénétiquement (Louca *et al*., 2018). Dans ce cas, la perte d'un taxon microbien ne sera pas nécessairement associée à la perte d'une capacité métabolique si celle-ci est compensée par un autre taxon de la communauté produisant cette fonction ou une équivalente. Ceci pose encore plus la question de la stabilité de ces symbioses mutualistes au cours du temps puisque la perte d'un taxon n'aura pas de conséquence directe sur le système symbiotique.

Nous avons vu précédemment dans le chapitre I que la transmission verticale des symbiotes était souvent associée à des goulots d'étranglement (Buchner, 1965 ; Hosokawa *et al*., 2007 ; Jansen & de Boer, 1998 ; Kaltenpoth, Goettler, *et al*., 2010 ; Mira & Moran, 2002). Dans des symbioses entre un hôte et une espèce symbiotique, ces goulots d'étranglement peuvent réduire la diversité génétique au sein de la population symbiotique, ce qui augmenterait leur lien de parenté et pourrait réduire les conflits entre eux, contribuant ainsi au maintien du mutualisme (Foster & Wenseleers, 2006 ; Frank, 1994, 1996 ; Hamilton, 1964a, 1964b ; Herre *et al*., 1999 ; Leeks *et al*., 2019). Si un tel goulot d'étranglement lié à une réduction de la diversité symbiotique existe lors de la transmission verticale d'une communauté microbienne, il pourrait exacerber la compétition entre les différentes espèces pour l'accès à un nouvel hôte. Ceci pourrait favoriser d'autant plus des variants symbiotiques se répliquant vite, même si cela affecte le fonctionnement du mutualisme avec l'hôte.

Tout cela constitue une question intéressante sur le maintien des associations hôtes-microbiotes et des études empiriques sont requises pour mieux le comprendre. Mais connait-on des cas de symbioses où les hôtes hébergent une communauté microbienne se transmettant principalement de manière verticale ? Chez les insectes sociaux, il semblerait que les soins parentaux aux jeunes puissent être un mécanisme pouvant assurer la transmission de nombreux microorganismes à la génération suivante (pour revue : Onchuru *et al*., 2018). Dans ce contexte, les termites constituent un modèle intéressant pour plusieurs raisons. Les termites xylophages vivent en association nutritionnelle avec une communauté intestinale composée de procaryotes et de protistes (Brune, 2014 ; Brune & Dietrich, 2015). Dans ces systèmes complexes, la

communauté symbiotique dans son ensemble permet la digestion de la lignocellulose et la synthèse de nutriments pour l'hôte, mais le rôle exact de chaque espèce de symbiote n'est pas connu (Brune, 2014 ; Brune & Dietrich, 2015). Il est possible que beaucoup de complémentarités, de synergies ou encore de redondances fonctionnelles existent entre les microorganismes, bien que ces éléments n'aient été que peu décrits. Chez les termites, il semblerait que les symbiotes soient transmis verticalement du couple fondateur aux descendants d'une nouvelle colonie. Cependant, aucune étude n'a spécifiquement évalué le mode de transmission des symbiotes dans ces systèmes. Lors de la mue imaginale permettant la différenciation de nymphes en reproducteurs primaires, un fort goulot d'étranglement a lieu sur la communauté symbiotique (Lewis & Forschler, 2004). De plus, il existe peut-être de la transmission biparentale chez les termites car à la fois la reine et le roi procurent des trophallaxies proctodéales à leurs descendants (Brossette, Meunier, Dupont, Bagnères, & Lucas, 2019 ; Shimada *et al*., 2013). Les lignées symbiotiques maternelle et paternelle seraient mélangées dans la nouvelle colonie ce qui augmenterait l'hétérogénéité génétique entre les symbiotes. Ces caractéristiques pourraient d'avantage renforcer la compétition entre eux et déstabiliser le mutualisme hôte-microbiote.

La problématique de ce travail de thèse vise à **décrire les modes et l'efficacité de transmission de la communauté microbienne intestinale du termite xylophage *R. grassei*. Sous l'hypothèse d'une transmission verticale parfaite dans ces systèmes, ce projet avait pour objectifs (i) d'évaluer si les symbiotes présentent effectivement un mode de transmission verticale, (ii) d'estimer l'efficacité de transmission verticale des différents symbiotes composant la communauté intestinale, (iii) d'étudier la prévalence des symbiotes dans les populations hôtes et (iv) d'évaluer les relations entre efficacité de transmission verticale et prévalence.**

2. Objectifs spécifiques de la thèse

Quatre objectifs principaux ont été définis. Nous avons pu y répondre grâce à l'étude de la diversité symbiotique dans les intestins de termites.

1er objectif : La transmission des symbiotes intestinaux est-elle verticale ?

Chez les insectes eusociaux, le pool symbiotique d'un groupe social doit être considéré à l'échelle de ce groupe, notamment à cause des mues régulières des individus chez les termites (Nalepa, 2017). Dans ces systèmes, nous considérerons la transmission verticale des symbiotes comme le passage des microorganismes d'une colonie parentale à une colonie fille. Pour être transmis verticalement, un symbiote doit passer deux étapes cruciales. Tout d'abord, il doit être présent dans tous les reproducteurs primaires essaimant de la colonie parentale (étape 1) et il doit ensuite être transmis par chacun de ces reproducteurs primaires à la descendance (étape 2). Si un symbiote n'est pas présent dans les alates, il ne peut théoriquement pas être transmis verticalement. **Nous avons souhaité tester l'hypothèse d'un mode de transmission verticale des symbiotes en étudiant leur présence dans les alates essaimant de colonies de termites.**

2e objectif : Quelle est l'efficacité de transmission verticale du microbiote intestinal ?

L'efficacité de transmission verticale d'un symbiote d'une colonie parentale à une colonie fille pourrait être définie comme la probabilité qu'un symbiote présent dans une colonie parentale soit également présent dans la colonie fondée par un reproducteur primaire provenant de cette colonie parentale (probabilité θ) (Figure 22) (Michaud *et al*., 2020). Si on considère (i) la probabilité α qu'un symbiote passe avec succès l'étape 1 (*i.e.*, qu'il soit présent dans les alates quand ils quittent la colonie) et (ii) la probabilité β qu'il passe l'étape 2 (*i.e.*, qu'il soit transmis aux descendants), alors l'efficacité de transmission verticale peut être écrite comme $\theta = \alpha \cdot \beta$, avec les valeurs de θ, α et β comprises entre 0 et 1 (Figure 22) (Michaud *et al*., 2020).

Nous avons voulu **tester l'hypothèse selon laquelle la transmission verticale est parfaite chez les termites**, c'est-à-dire que tous les taxa microbiens présents dans une colonie parentale le seraient dans toutes les colonies filles. Dans une première expérience, nous avons fondé 630 couples en laboratoire afin d'**estimer directement l'efficacité de transmission verticale des symbiotes.** Cependant, nos résultats ont montré des taux de survie et de reproduction de ces colonies très faibles, et ce même après 92 semaines de fondation. A l'échelle de cette thèse, il n'était finalement pas envisageable d'estimer ce paramètre. Ces travaux toujours en cours sont tout de même présentés dans le chapitre V.

Dans un deuxième temps, nous avons donc choisi d'**estimer la composante α du taux de transmission.** Dans ce cas, c'est au niveau individuel que le pool symbiotique des alates

essaimants doit être caractérisé puisque ces individus représentent la source des symbiotes intestinaux d'un groupe social donné (Nalepa, 2017). Nous avons donc étudié la composition en symbiotes des alates essaimant d'une colonie afin d'estimer la probabilité α de chaque symbiote.

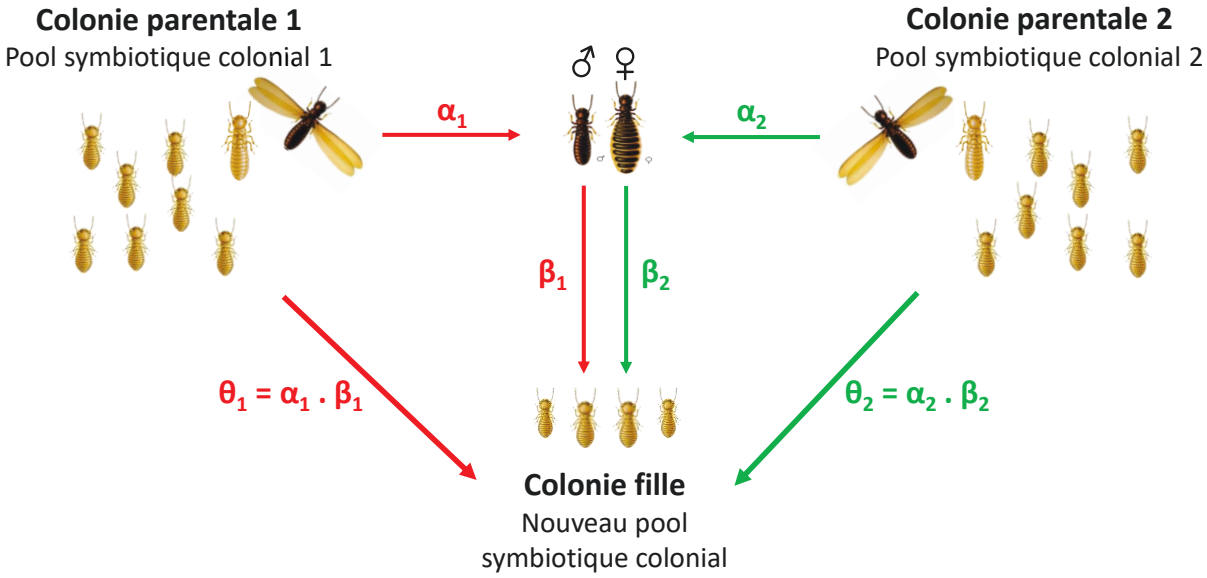


Figure 22 : Transmission verticale du pool symbiotique des deux colonies parentales à une colonie fille chez les termites. Le taux total de transmission verticale θ représente la probabilité qu'un symbiote présent dans une colonie parentale le soit également dans la colonie fille. Cette probabilité θ peut être calculée par le produit des deux composantes de transmission α et β qui représente chacune la probabilité du symbiote d'être présent dans les alates essaimant de la colonie parentale et la probabilité du symbiote d'être transmis à la descendance lorsque l'alate fonde une nouvelle colonie avec un partenaire sexuel.

3e objectif : Quelle est la variation de composition des communautés symbiotiques intestinales entre les colonies de termites ?

Les communautés symbiotiques ont souvent été décrites comme étant stables au sein d'une espèce de termite (Inoue *et al*., 2000 ; Yamin, 1979). Cependant, une étude a montré que la composition microbienne intestinale pouvait être variable au sein des populations (Waidele *et al*., 2017). Nous avons alors étudié les compositions des pools symbiotiques de différentes colonies de termites provenant de deux populations pour déterminer **la prévalence des symbiotes intestinaux dans les populations de *R. grassei* et la variabilité de composition des microbiotes au sein et entre ces populations.**

4e objectif : Quelle est la relation entre le taux de transmission verticale et la prévalence des symbiotes dans les populations hôtes ?

Nous avons souhaité **tester l'hypothèse que le taux de transmission verticale serait un bon facteur expliquant la distribution et la prévalence des symbiotes intestinaux dans les populations de termites.** Le lien entre le taux de transmission verticale et la prévalence des symbiotes dans les populations hôtes n'est pas toujours direct, d'autres facteurs peuvent en effet entrer en jeu (Gundel *et al*., 2008, 2009).

Ces quatre objectifs ont été étudiés séparément pour les protistes et les bactéries présents dans les intestins de termites. Les résultats sont présentés dans les chapitres VI et VII.

Chapitre IV :

Méthodologie développée



© Paride Bertolin (JAB) 2013

Ce chapitre vise à exposer la méthodologie développée et utilisée au cours de ce projet de thèse. Ce projet a été mené sur l'étude de la diversité et de la composition des communautés microbiennes pour réaliser des analyses comparatives entre microbiotes intestinaux de termites. Nous avons étudié les communautés microbiennes d'alates et d'ouvriers provenant de colonies de *R. grassei* fraichement collectées sur la côte atlantique française. Quelques colonies du termite américain *R. flavipes*, que l'on retrouve en sympatrie avec *R. grassei* notamment dans la région de l'île d'Oléron, ont également été étudiées. Les analyses menées au cours de ce projet de thèse reposent principalement sur une approche de séquençage à haut-débit, le métabarcoding, qui nous a permis de séquencer la diversité bactérienne et de protistes dans les intestins d'alates et d'ouvriers. Nous avons également développé une approche de PCR quantitative (PCRq) pour valider certains résultats de métabarcoding. Les protocoles mis en place et utilisés au cours de ce travail de thèse sont développés dans ce chapitre, de la collecte des colonies de termites à l'utilisation des outils moléculaires et les méthodes d'analyses. Les statistiques propres aux études menées au cours de ce projet de thèse sont présentées en Annexe 1.

1. Préparation des échantillons

1.1. Collecte de colonies et essaimage

Les modèles d'étude utilisés lors de cette thèse sont les termites souterrains *R. grassei* Clément et *R. flavipes* Kollar. *Reticulitermes grassei* est natif d'Europe et originaire de la péninsule ibérique (Kutnik, Uva, Brinkworth, & Bagnères, 2004). Suite à la dernière glaciation, il est remonté dans toute la péninsule ibérique et en France où on le trouve dans le sud et le long de la côte ouest (Figure 23). En France, *R. grassei* est plutôt situé en forêts ou en zones péri-urbaines. Il vit en sympatrie dans le sud-ouest de la France avec *R. flavipes*, notamment dans la région d'Oléron et de la forêt de la Coubre (Charente-Maritime, 17) (Figure 23) (Bagnères *et al*., 1990 ; Clément *et al*., 2001 ; Perdereau *et al*., 2013). *Reticulitermes flavipes* est originaire d'Amérique du Nord, il a été introduit en France probablement à partir de la région de la Nouvelle-Orléans (Perdereau *et al*., 2013). On retrouve ce termite plutôt en zones urbaines ou péri-urbaines en France (Bagnères *et al*., 1990 ; Baudouin *et al*., 2017 ; Perdereau *et al*., 2015).

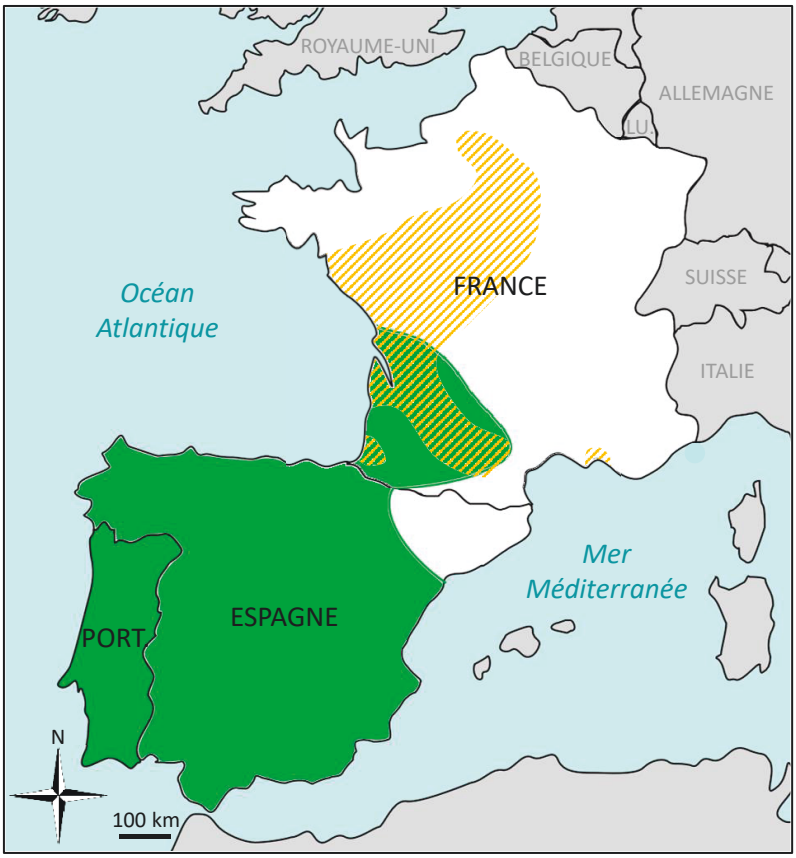


Figure 23 : Carte schématisant la distribution de *Reticulitermes grassei* et *R. flavipes* en Europe. Le termite *R. grassei* est originaire de la péninsule ibérique d'où il est remonté jusque le long de la côte atlantique française depuis la dernière glaciation, son aire de répartition est représentée en vert. *Reticulitermes flavipes* est originaire d'Amérique et a été introduit en France où il est invasif, son aire de répartition est représentée en orange hachuré. La présence de ces deux termites n'a pas été détectée dans les pays en gris. LU. : Luxembourg. PORT. : Portugal.

Afin de réaliser l'essaimage au laboratoire, les colonies de termites ont été collectées début avril car, en France, c'est à cette période que les nymphes à longs fourreaux alaires muent en reproducteurs ailés chez *R. flavipes* et *R. grassei* (Vieau, 2001). Les différentes colonies ont été échantillonnées sur des fragments de bois mort, le pin maritime (*Pinus pinaster*), contenant au moins 500 individus dont des nymphes à longs fourreaux alaires. Les points de collecte sont distants d'au moins 50 m assurant d'avoir des colonies différentes (Perdereau, Bagnères, Dupont, & Dedeine, 2010). Les fragments de colonies ont directement été placés dans des boites en plastique (24 x 18 x 10 cm) contenant du sable humide et stérile. L'identité de l'espèce de termite des colonies a été confirmée en séquençant le gène cytochrome oxydase II (COII) d'un ouvrier par colonie et en comparant les séquences avec des séquences de référence disponibles sur Genbank, comme réalisé précédemment au laboratoire (Dedeine *et al*., 2016).

De retour au laboratoire, entre un et quatre jours après la date de collecte, les boites contenant les colonies de termites ont été maintenues dans des conditions standards à 26 °C ±1 ; 80 % d'humidité relative et un cycle 13.5 h jour/10.5 h nuit, afin de permettre aux alates d'essaimer. Pour cela, les boites contenant les colonies ont été placées sans couvercle dans des boites en plastique plus grandes (36 x 24 x 14 cm) contenant du sable humide et stérile. Ce dispositif expérimental a permis aux alates de sortir de leur boite initiale en volant et en atterrissant dans la seconde (Figure 24). Dans les 12 h suivant l'essaimage, les alates ont été collectés, sexés et placés par colonie et par sexe dans une boite de Pétri en plastique (50 mm de diamètre) contenant du sable humide et stérile jusqu'à leur utilisation, en veillant à retirer les ailes des boites pour ne pas qu'elles moisissent. En fonction des études, les alates ont soit été utilisés vivants et ont été mis en couple (étude 1), soit leurs intestins ont été prélevés pour en séquencer la diversité symbiotique (études 2 et 3).

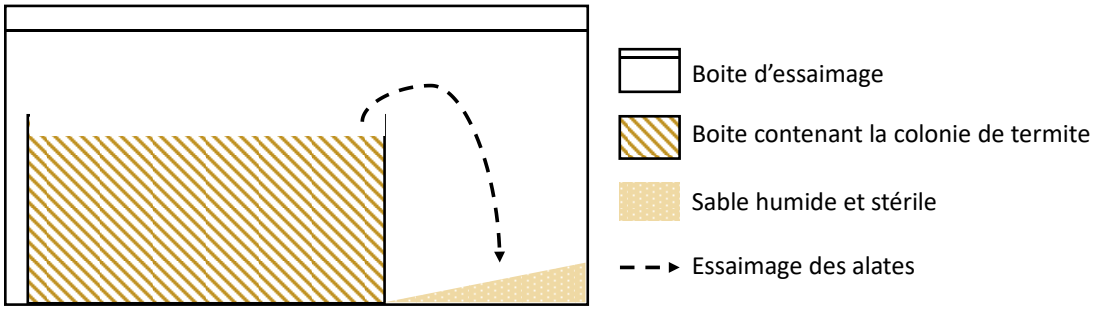


Figure 24 : Dispositif expérimental d'essaimage des alates au laboratoire.

1.2. Fondation et suivi des colonies filles (étude 1)

Les couples ont été formés une fois que tous les alates avaient essaimés, c'est-à-dire entre quatre et neuf jours après essaimage pour les alates de *R. flavipes* et entre un et deux jours pour les alates de *R. grassei*. Pour chaque modalité de croisement, les mâles et les femelles ont été mis en couple de manière aléatoire. Chaque couple a été placé dans une boite en plastique (50 mm de diamètre) contenant 4 g de sable sec stérile humidifié avec 900 µL d'eau ultra pure et 1.536 g ±0.075 de sciure de pin humide et stérile pour leur permettre de fonder une nouvelle colonie. Les boites contenant les fondations ont été maintenues à 26 °C dans le noir complet avec 80 % d'humidité relative pendant le développement des nouvelles colonies. Vingt semaines après la fondation des colonies, un morceau de pin de 2 x 2 x 0.5 cm (=1.006 g ±0.276) stérile et humide a été ajouté dans chaque colonie restante.

Les fondations ont été maintenues 92 semaines en laboratoire en conditions standards. Le suivi des colonies a été réalisé régulièrement afin d'évaluer la survie des colonies. Les colonies étaient considérées vivantes lorsque les deux membres du couple royal (*i.e.*, la reine et le roi) étaient en vie. Lorsqu'un seul des deux mourait, il était sexé et la survie de l'autre était suivie jusqu'à sa mort (données non montrées). Lors des trois premiers mois de la fondation, le suivi de survie des colonies a été réalisé de façon hebdomadaire. Le suivi de survie a ensuite été bimensuel. Ces suivis permettaient également d'ajouter deux ou trois gouttes d'eau ultra pure pour humidifier la sciure de pin.

Un suivi de reproduction de la colonie a également été réalisé après 14, 65 et 92 semaines de fondation en estimant le nombre de descendants (larves L1 et L2, ouvriers et soldats) présents dans la colonie. Les œufs n'ont pas pu être comptés puisqu'ils étaient souvent pondus sur le sable ou dans la sciure, leur présence a tout de même été reportée lorsqu'ils étaient détectés (données non montrées).

1.3. Dissection des individus (études 2 et 3)

Les alates utilisés pour les études 2 et 3 ont été disséqués au maximum 24 h après essaimage. Les intestins des alates femelles et mâles ont été prélevés individuellement à l'aide de pinces fines stériles puis placés dans 80 µL de tampon d'extraction T1 (Nucleo-Spin Tissue XS, Macherey-Nagel) avant d'être conservés à -80 °C jusqu'à l'extraction d'ADN. Pour chaque colonie, un échantillon comprenant 10 intestins d'ouvriers a également été préparé. Dix larges ouvriers de stade L6 ou L7 ont tout d'abord été choisis aléatoirement par colonie et placés dans des boites de Pétri en plastique contenant du sable humide et stérile pendant 48 h. Cette étape permet de limiter la présence de bactéries transitoires dans les intestins de termites. Les 10 individus ont ensuite été disséqués et leurs intestins ont été poolés dans 80 µL de tampon d'extraction T1 (Nucleo-Spin Tissue, Macherey-Nagel) puis placés à -80 °C jusqu'à l'étape d'extraction d'ADN. Ces deux types d'échantillons ont été utilisés pour le métabarcoding. Pour certaines colonies, les intestins individuels d'ouvriers ont également été disséqués de la même façon que les intestins d'alates après avoir été isolés 48 h. Ces échantillons d'ouvriers individuels ont été utilisés pour la PCRq.

2. Étude du microbiote intestinal

2.1. Approche du métabarcoding

2.1.1. Principe général et outils développés

Le barcoding moléculaire est l'utilisation de fragment d'ADN pour déterminer de façon rapide et fiable la taxonomie moléculaire d'un échantillon (Arnot, Roper, & Bayoumi, 1993 ; Hebert, Ratnasingham, & De Waard, 2003). Il permet aussi bien de classer des échantillons dont l'espèce est déjà identifiée que des échantillons dont l'espèce est inconnue grâce à l'utilisation de marqueurs génétiques standardisés pour l'identification des espèces (Hebert *et al*., 2003). Après extraction d'ADN, amplification PCR du marqueur génétique et séquençage de l'échantillon, la différenciation entre les séquences obtenues permet de déterminer l'espèce de l'échantillon. Le métabarcoding est une extension du barcoding ADN, il permet d'étudier l'ensemble de la communauté (diversité et composition) présente dans un échantillon grâce à l'utilisation d'un fragment d'ADN cible et d'une technologie de Séquençage Nouvelle Génération (NGS) (Taberlet, Coissac, Pompanon, Brochmann, & Willerslev, 2012). Après extraction ADN de l'échantillon, un marqueur génétique standardisé est amplifié par PCR. Les amplicons, représentatifs des ADN de l'ensemble de la communauté, sont séquencés à haut-débit. Les *reads* (*i.e.*, les séquences du fragment d'ADN) obtenus sont analysés par des outils bioinformatiques standards afin d'obtenir les OTUs (*Operational Taxonomic Units*) présents dans chaque échantillon et de les assigner à des taxons microbiens de référence. Des outils statistiques permettent ensuite de réaliser des analyses comparatives entre les échantillons.

Une approche de séquençage à haut-débit des gènes ribosomaux 16S et 18S a été développée au début de ce projet de thèse afin de décrire la diversité et la composition des communautés microbiennes de colonies de termites (pool symbiotique colonial) et/ou d'individus (pool symbiotique individuel). Trois régions génomiques de microorganismes procaryotes et eucaryotes ont été séquencées : la région V3-V4 du gène ribosomal 16S afin de caractériser les bactéries symbiotiques, et deux régions V3-V4 du gène ribosomal 18S pour caractériser de façon indépendante les protistes symbiotiques oxymonades et parabasaliens.

Pour déterminer le pool symbiotique circulant dans les colonies, des extractions ADN ont été réalisées à partir de 10 intestins d'ouvriers. Pour déterminer le pool symbiotique porté par un seul individu, des extractions ADN ont été réalisées à partir d'intestins individuels. Les amplifications PCR des trois régions (la région 16S et les deux régions 18S) ont été réalisées

au laboratoire, et les amplicons (≈450 pb pour les trois régions amplifiées) ont été séquencés par la plateforme Genotoul (Toulouse, France) avec un séquenceur Illumina MiSeq utilisant une chimie 2x250 pb en *paired-end*. Le pipeline bioinformatique de traitement des séquences et les outils statistiques associés ont été développés en collaboration avec l'équipe du Dr. Andreas Brune à l'Institut Max Planck pour la Microbiologie Terrestre (Marbourg, Allemagne) grâce à un séjour de recherche de cinq mois dans leur laboratoire.

2.1.1. Extraction d'ADN, amplification PCR et séquençage à haut-débit

L'ADN génomique des intestins individuels d'alates et des intestins poolés d'ouvriers ont respectivement été extraits avec les kits d'extraction Nucleo-Spin Tissue XS et Nucleo-Spin Tissue (Macherey-Nagel) en suivant les instructions du fournisseur. Le broyage des échantillons a été réalisé à l'aide d'un Tissue-Lyser II (Qiagen) 30 sec à 30 Hz avec une bille en acier inoxydable stérile (5 mm, Qiagen) préalablement placée dans chaque tube. Les échantillons individuels d'alates et d'ouvriers ont été élués dans 30 µL de tampon d'élution. Toutes les élutions d'ADN ont été conservées à -20 °C jusqu'à utilisation.

Pour chaque échantillon, trois types de PCR ont ensuite été réalisées afin d'amplifier trois portions de 450 pb de gènes ribosomaux : la région bactérienne V3-V4 de la sous-unité ribosomale 16S (Bac_16S-F : 5'-CTA CGG RAG GCA GCA G-3', Bac_16S-R : 5'- TAC CAG GGT ATC TAA TC-3'), la région oxymonade V3-V4 de la sous-unité ribosomale 18S (Oxy_18S-F : 5'-ATC AGA WAC CGY CGT AGT C-3', Oxy_18S-R : 5'-GGG CAT MAC RGA CCT GTT A-3') et la région parabasalienne V3-V4 de la sous-unité ribosomale 18S (Par_18S-F : 5'-GCA GCA GGC GYG AAA C-3', Par_18S-R : 5'-CCT ACT CTC GCY CTT GAT CG-3'). Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 30 µL. Pour chacune, 3 µL de MTP Taq buffer 10X (Merck), 0.6 µL de dNTP mix 10 mM (Merck), 0.6 µL de chaque amorce à 20 µM et 0.3 µL de MTP Taq Polymérase (Merck) ont été ajoutés à 1 µL (pools d'ouvriers) ou 2 µL (alates individuels) d'ADN. Pour la région bactérienne, les amplifications PCR ont été réalisées avec une étape de 1 min à 94 °C suivie de 30 cycles de 1 min à 94 °C, 1 min à 65 °C et 1 min à 72 °C, et une étape finale de 10 min à 72 °C. Pour les régions oxymonade et parabasalienne, le même protocole d'amplification a été suivi, sauf l'étape d'hybridation qui était de 30 sec à 55 °C.

Après avoir vérifié que chaque échantillon avait bien été amplifié et que les témoins négatifs de dissection, d'extraction d'ADN et d'amplification PCR ne soient pas contaminés,

50 µL de produit PCR des échantillons d'alates individuels et de pools d'ouvriers ont été envoyés à la plateforme génomique GeT-PlaGe (GenoToul, Toulouse) qui a réalisé la préparation des librairies et le séquençage des échantillons avec une technologie 2x250 en *paired-end* Illumina Miseq.

2.1.2. Traitement des séquences du métabarcoding

Les séquences envoyées par la plateforme GeT-PlaGe étaient déjà démultiplexées. Le traitement des séquences obtenues pour les trois jeux de données métabarcoding a été réalisé à l'aide du logiciel *mothur* v1.41.1 (Schloss *et al*., 2009) en suivant principalement la procédure d'opération standard pour les données Miseq (Kozich, Westcott, Baxter, Highlander, & Schloss, 2013). Le pipeline bioinformatique consiste en trois grandes étapes : (1) une étape de nettoyage des séquences, (2) la normalisation des données et (3) la création des OTUs ainsi que leur classification taxonomique (Figure 25).

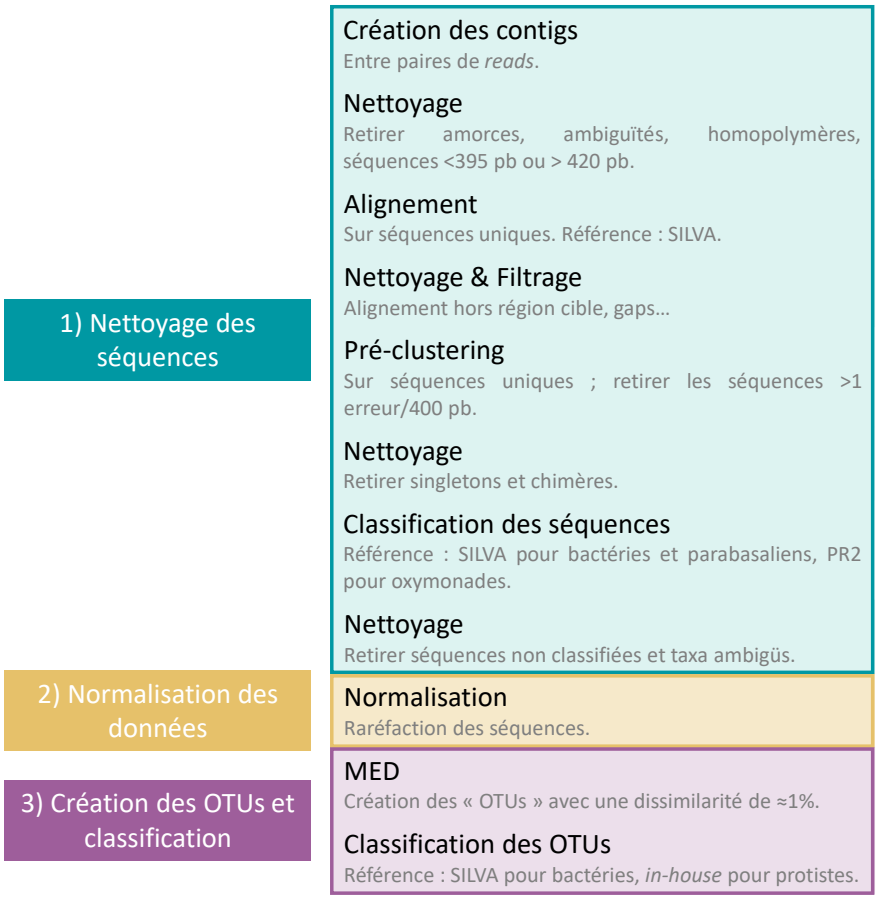


Figure 25 : Pipeline bioinformatique utilisé pour le traitement des séquences des trois jeux de données du métabarcoding. MED : Minimum Entropy Decomposition.

2.1.2.1. Nettoyage des séquences

La première étape est le nettoyage des séquences qui permet d'éliminer du jeu de données les biais de PCR, les chimères formées par PCR (5 à 30 % du jeu de données), les erreurs de PCR (~1 toutes les 10^5 à 10^6 bases) et les erreurs de séquençage (~1%) par des outils bioinformatiques. Ces outils consistent à identifier et retirer du jeu de données les mauvaises séquences (*e.g.*, avec des erreurs dans les amorces), celles de mauvaise qualité (*e.g.*, avec des homopolymères ou des bases ambigües) ainsi que les séquences rares (*i.e.*, singletons), non classifiées, non alignées dans la région ciblée ou encore assignées à des taxa aberrants (*e.g.*, mitochondrie ou chloroplaste pour les bactéries). Pour cela, les contigs (*i.e.*, les séquences reconstruites et utilisées par la suite) ont tout d'abord été assemblés entre paires de *reads* et les amorces ont été retirées des séquences. Les séquences plus petites que 395 pb, plus grandes que 420 pb, contenant des homopolymères de plus de 8 pb ou contenant une base ambigüe ont été enlevées des jeux de données. Les séquences ont ensuite été alignées avec la base de données de référence SILVA v132 pour les trois jeux de données, celles hors région étudiée (16S bactérien, 18S oxymonade ou 18S parabasalien) ont été retirées. Les séquences ont ensuite été pré-clustérisées avec une erreur autorisée pour 400 pb, puis les singletons et chimères ont été retirés en utilisant VSEARCH (Rognes, Flouri, Nichols, Quince, & Mahé, 2016). Les séquences ont été classifiées par un classificateur Bayésien naïf (Wang, Garrity, Tiedje, & Cole, 2007) avec la taxonomie SILVA v132 (Glöckner *et al*., 2017 ; Quast *et al*., 2013 ; Yilmaz *et al*., 2014) comme référence pour les jeux de données bactérien et parabasalien, et avec la taxonomie PR2 v4.11.1 (Guillou *et al*., 2013) comme référence pour le jeu de données oxymonade. Les séquences assignées aux mitochondries et aux bactéries du genre *Wolbachia* ont été retirées du jeu de données bactérien, et seules les séquences assignées aux clades Oxymonadida ou Parabasalia ont été gardées dans les deux autres jeux de données, respectivement.

2.1.2.2. Normalisation des données

La seconde étape de traitement des séquences consiste à normaliser le nombre de séquences entre les échantillons pour que ceux-ci soient comparables entre eux pour les analyses. La normalisation a été réalisée par raréfaction du nombre de séquences par échantillon au plus petit nombre de séquences présentes dans un échantillon du jeu de données. Pour cela, 6 165, 8 167 et 12 366 séquences ont été rééchantillonnées de manière aléatoire par échantillon pour les jeux de données bactérien, oxymonade et parabasalien, respectivement (Weiss *et al*., 2017).

2.1.2.3. Création et classification des OTUs

Enfin, la troisième étape permet de créer les OTUs, les unités de base sur lesquelles les analyses comparatives et statistiques sont ensuite réalisées, puis de les assigner à des taxa grâce à des bases de données de référence. Classiquement, les séquences sont clustérisées en OTUs par un seuil de dissimilarité fixé généralement à 3 %. En effet, Stackebrandt et Goebel (1994) avaient montré une dissimilarité de 3 % sur la longueur totale du gène ribosomal 16S entre différentes espèces bactériennes. Cependant, il n'existe pas à l'heure actuelle de seuil de dissimilarité clair et défini pour clustériser les séquences d'oxymonades et de parabasaliens en OTUs reflétant une identité au niveau de l'espèce (Duarte, Nunes, Borges, & Nobre, 2018). Ce seuil est généralement fixé sans justification entre 1 et 3 % de dissimilarité (Maritz *et al*., 2017 ; Tai *et al*., 2015 ; Venter, Nitsche, & Arndt, 2018) même si le pattern des résultats n'est généralement pas changé en faisant varier le seuil de dissimilarité entre 1 et 3 % (Nagarkar *et al*., 2018). Des tests préliminaires ont été nécessaires pour choisir au mieux la méthode à utiliser afin de créer les OTUs.

2.1.2.3.1. Choix de la méthode de création des OTUs

2.1.2.3.1.1. Méthode par seuil de dissimilarité

Les banques de données et les connaissances sur les protistes en général ne sont pas suffisamment complètes pour pouvoir décider d'un seuil de dissimilarité fiable permettant de discriminer les différentes espèces de protiste. Pour pouvoir appliquer un seuil, nous souhaitions dans un premier temps pouvoir déterminer ce seuil chez des protistes de termites. Pour cela, une banque de séquences de clones appartenant au même genre est nécessaire, nous avons donc utilisé les séquences obtenues lors de l'étude pilote menée sur les *Trichonympha* (Dedeine *et al*., données non publiées).

2.1.2.3.1.1.1. Détermination du seuil de dissimilarité

Pour estimer les seuils de dissimilarité des *Trichonympha* présents chez les termites du genre *Reticulitermes*, nous avons utilisé les 53 séquences de *Trichonympha* de *Reticulitermes* disponibles au laboratoire (Dedeine *et al*., données non publiées). Nous assumons qu'un cluster regroupe au moins une espèce de *Trichonympha*. Cependant, comme les espèces de *Trichonympha* n'ont pas toutes été décrites chez les *Retculitermes*, les seuils de dissimilarité

ont été estimés au niveau intra- et inter-cluster (et non au niveau intra- et inter-espèce), et ce à la fois sur la longueur totale du gène ribosomal 18S, mais également en coupant les séquences à la région V3-V4 étudiée par métabarcoding. Ici, seuls les résultats sur séquences à la taille des amplicons sont présentés, les résultats sur la longueur totale des séquences étant similaires.

Tout d'abord, un alignement multiple des séquences a été réalisé en utilisant MAFFT v7.419 (Katoh & Standley, 2013) puis elles ont été automatiquement filtrées avec TrimAl v1.3 (Capella-Gutiérrez, Silla-Martínez, & Gbaldón, 2009). Les distances entre les séquences ont été calculées sous *mothur* v1.41.1. Les résultats ont montré que les *Trichonympha* n'appartenant pas au même cluster avaient toujours une dissimilarité entre leurs séquences supérieure à 2 %, et cela pour des *Trichonympha* présents dans des hôtes d'espèce différente ou coexistant au sein d'un même hôte (Figure 26A). Les *Trichonympha* appartenant au même cluster présentaient en moyenne un seuil de dissimilarité inférieur à 2 %, avec certaines valeurs supérieures à ce seuil (Figure 26A). Cependant, le détail des dissimilarités entre séquences intra-clusters ont montré que les deux clusters de *Trichonympha* coexistant chez *R. grassei* (clusters A et B) présentaient une dissimilarité intra-cluster de moins de 2 % (Figure 26B). Nous avons donc déterminé le seuil de dissimilarité à 2 % pour la création des OTUs dans les jeux de données métabarcoding.

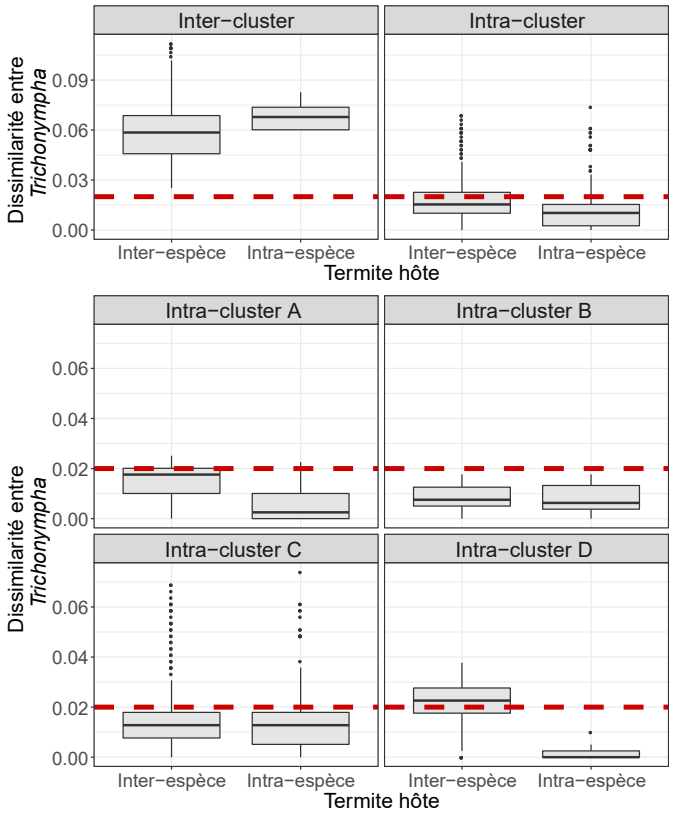


Figure 26 : Dissimilarité entre séquences de *Trichonympha* provenant de termites du genre *Reticulitermes*. (A) Dissimilarité entre *Trichonympha* provenant de tous les clusters. (B) Détail des dissimilarités par cluster de ►

◄ *Trichonympha*. Les analyses ont été menées sur la région V3-V4 du gène ribosomal 18S sur les clusters de *Trichonympha* mis en évidence par Dedeine *et al*. (données non publiées). Les lignes rouges en pointillés représentent une dissimilarité de 2 %.

2.1.2.3.1.1.2. (In)validation de la méthode

La méthode de création des OTUs par clusterisation a été testée sur des sous-jeux de données oxymonade et parabasalien comprenant cinq alates femelles, cinq alates mâles et le pool d'ouvriers de 12 colonies de *R. grassei* avant l'étape de raréfaction (lors de l'utilisation de la méthode de clusterisation, la normalisation des données se fait après). Les OTUs ont été obtenus sous *mothur* v1.41.1 par clusterisation avec un seuil de dissimilarité fixé à 2 % avec l'algorithme *opticlust* qui génère les OTUs à partir d'une matrice de distance pour déterminer la qualité de la clusterisation. Après raréfaction des données respectivement à 9 570 et 11 458 séquences, ces analyses ont permis d'obtenir 3 432 OTUs d'oxymonades et 120 OTUs de parabasaliens. En ne gardant que les OTUs possédant au moins cinq séquences (Tai *et al*., 2015), ces chiffres sont descendus à 1 707 OTUs et 67 OTUs, respectivement. L'obtention de 67 OTUs pour le jeu de données parabasaliens était un nombre plus élevé que celui obtenu dans de précédentes études menées sur les parabasaliens de termites (Tai *et al*., 2015 ; Waidele *et al*., 2017) mais restait raisonnable. Par contre, les 1 707 OTUs d'oxymonades obtenus semblaient totalement aberrants comparés au peu d'espèce d'oxymonades décrites chez les termites. Nous n'avons donc pas validé la méthode de création des OTUs par clusterisation et nous avons testé une autre méthode.

2.1.2.3.1.2. Méthode sans supervision

Nous avons choisi d'utiliser une méthode non supervisée de création des OTUs permettant de s'affranchir d'un seuil de dissimilarité fixé : le '*Minimum Entropy Decomposition*' (MED) (Eren *et al*., 2015).

2.1.2.3.1.2.1. Principe général du *Minimum Entropy Decomposition*

Le MED a été développée par Eren *et al.* (2015) à partir de l'*oligotyping* (Eren *et al*., 2013). C'est une méthode computationnelle non supervisée basée sur le niveau d'entropie des sites variables entre les séquences, c'est-à-dire sur l'incertitude d'une base nucléotidique à une position nucléotidique donnée. Une entropie nulle à un site donné indique alors qu'il y a

toujours la même base entre toutes les séquences à cet endroit. L'algorithme calcule tout d'abord sur le jeu de données global l'entropie de Shannon à chaque site variable, puis décompose de manière itérative le jeu de séquences en 'nœuds' (Figure 27). Plus un site est variable, plus son entropie est élevée, et le MED utilise ces sites à forte entropie pour décomposer un nœud de séquences en plus petits nœuds, diminuant ainsi l'entropie totale des nœuds, et ce jusqu'à ce qu'au sein d'un nœud il n'y ait plus d'entropie à expliquer (Figure 27). Si un nœud ne contient plus d'entropie à expliquer, cela définit la condition d'arrêt de l'algorithme pour le nœud en question qui ne sera alors pas décomposé au cycle suivant. Au contraire, si le profil d'entropie d'un nœud n'est pas uniforme, celui-ci n'a 'pas convergé' et sera donc de nouveau décomposé au cycle suivant. Le MED permet ainsi l'obtention de nœuds de séquences homogènes avec un seuil non fixe de dissimilarité (~1 %) et pertinents au niveau écologique (Apprill *et al*., 2014 ; Eren, Borisy, Huse, & Mark Welch, 2014 ; Eren *et al*., 2011 ; Maignien, DeForce, Chafee, Eren, & Simmons, 2014 ; Reveillaud *et al*., 2014).

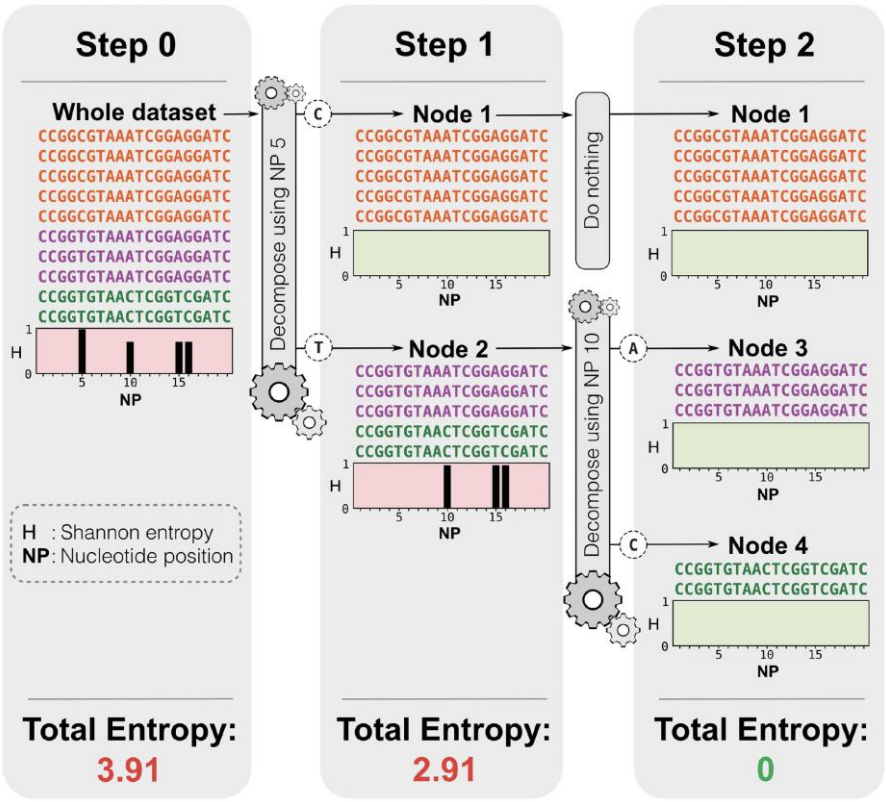


Figure 27 : Principe du *Minimum Entropy Decomposition*. Step 0 : calcul de l'entropie de Shannon à chaque site variable, les entropies non nulles sont représentées par les barres noires. Steps 1 et 2 : décomposition du nœud principal en différents nœuds à partir d'un site avec une forte entropie jusqu'à ce que l'entropie totale du nœud soit nulle. D'après Eren *et al.* (2015).

Afin de filtrer le bruit de fond (Eren *et al*., 2013), le paramètre M est utilisé : si la séquence unique la plus abondante d'un nœud est inférieure au paramètre M, l'algorithme retire ce nœud des analyses. Le paramètre M est fixé par défaut à N/10 000 où N est le nombre de séquences du jeu de données de départ analysé par MED. Les nœuds seront par la suite appelés OTUs par commodité.

2.1.2.3.1.2.2. Validation de la méthode

Les OTUs ont été créés par MED pour des sous-jeux de données représentés par 3 colonies de *R. grassei* composées par cinq alates femelles, cinq alates mâles et un pool d'ouvriers pour les bactéries, et représentés par 12 colonies composées du même nombre d'échantillons pour les oxymonades et parabasaliens. Ces sous-jeux de données ont préalablement été raréfiés à 8 348, 9 570 et 11 458 séquences par échantillon, respectivement. L'algorithme MED ne nécessite pas que les données soient alignées, et pour des données Illumina les séquences doivent avoir la même taille (Eren *et al*., 2015). Les séquences ont donc été désalignées puis coupées à la même longueur sous *mothur* v1.41.1. L'algorithme MED a été utilisé avec le pipeline d'*oligotyping* v2.0, disponible sur http://oligotyping.org, avec les paramètres par défaut pour chaque sous-jeux de données.

Les courbes de raréfaction ont atteint le plateau pour les trois sous-jeux de données montrant que le nombre d'OTUs obtenus par échantillon est représentatif de la réalité (Figure 28). Le nombre total d'OTUs obtenus était de 73 pour les oxymonades et 31 pour les parabasaliens assignés à sept taxa oxymonades et six taxa parabasaliens. La diversité au sein des taxa était donc élevée pour les protistes, mais raisonnable comparée aux résultats obtenus par clusterisation.

Pour les bactéries, 245 OTUs ont été obtenus pour le sous-jeu de données, un chiffre assez peu élevé pour des données bactériennes. De plus, le nombre de séquences présentes dans les trois pools d'ouvriers était fortement inférieur à celui des échantillons d'alates (Figure 28C). Ceci était dû au paramètre M, permettant d'éliminer les OTUs avec peu de séquences, gardé par défaut comme conseillé par les auteurs. Comme les jeux de données finaux étaient composés de 15 échantillons par colonie et que l'objectif principal était d'évaluer l'efficacité de transmission des OTUs, le paramètre M a été fixé à 15 pour le jeu de données bactéries.

La méthode de création des OTUs par MED a donc été validée sur des sous-jeux de données et a été appliquée pour obtenir les OTUs des jeux de données entiers, avec le paramètre

M fixé à 15 pour le jeu de données bactérien et les paramètres par défaut pour les jeux de données protistes.

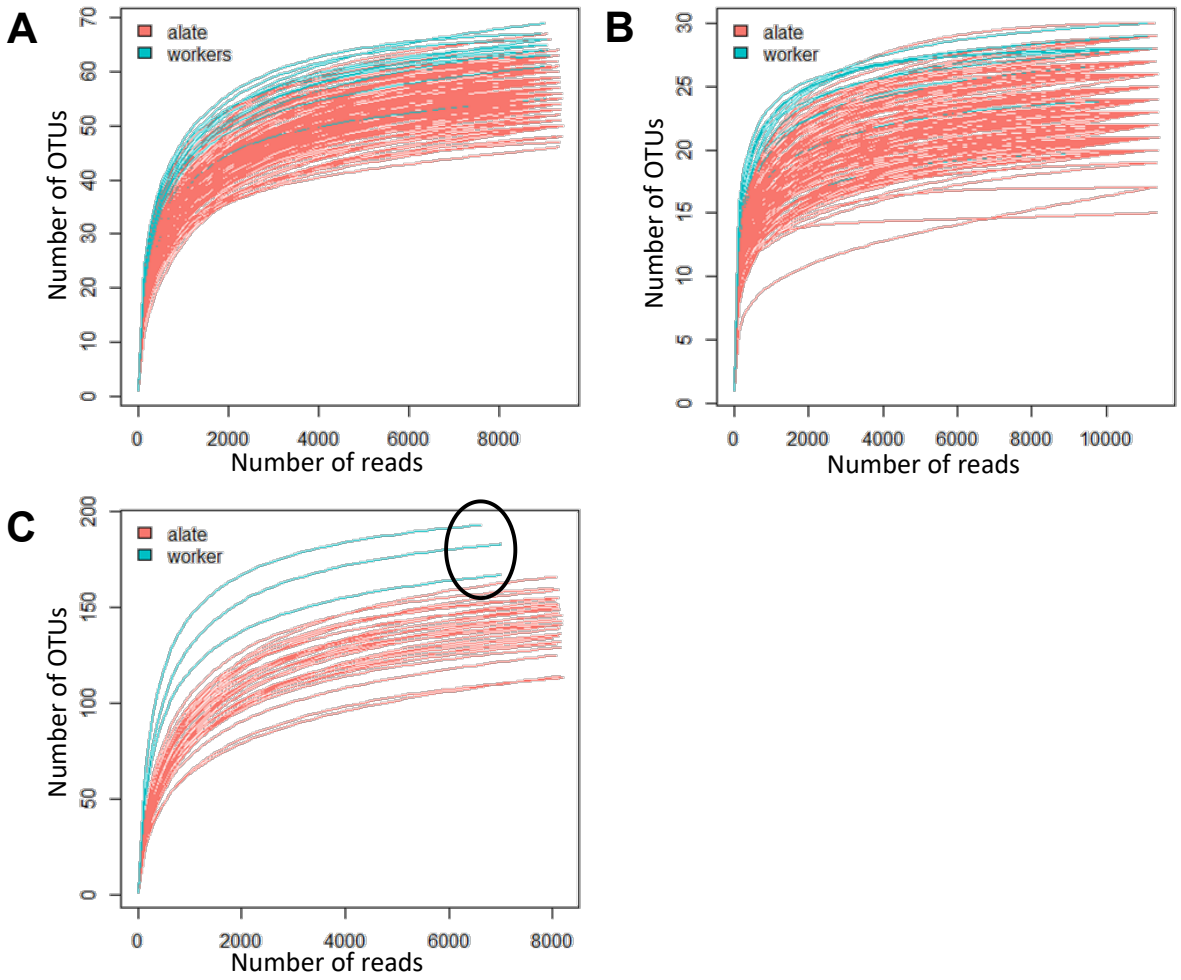


Figure 28 : Courbes de raréfaction des données oxymonades (A), parabasaliennes (B) et bactériennes (C). Données obtenues par *Minimum Entropy Decomposition* avec les paramètres par défaut. Le cercle noir met en évidence l'élimination de nombreuses séquences dans les pools d'ouvriers pour le jeu de données bactérien.

2.1.2.3.2. Assignation taxonomique des OTUs

Les séquences représentatives des OTUs ont été classifiées sous *mothur* v1.41.1 avec un classificateur Bayésien naïf (Wang *et al*., 2007) avec la taxonomie SILVA v132 pour le jeu de données bactérien. Les séquences des OTUs assignées au Betaproteobacteriales, Ruminococcaceae et *Treponema* ont ensuite été reclassifiées avec la base de données DictDB v3 (Mikaelyan, Köhler, *et al*., 2015) qui comporte des séquences dérivées de bactéries spécifiques aux intestins de termites et permet d'être plus précis dans l'assignation des genres. Cependant, cette base de données est moins à jour et donc moins précise que SILVA v132 pour

la classification générale, c'est pourquoi elle n'a pas été utilisée pour l'assignation taxonomique générale des bactéries. Pour les jeux de données oxymonade et parabasalien, des taxonomies internes à l'équipe du Dr. Andreas Brune ont été utilisées, incluant de nombreuses séquences de clones provenant des intestins de Blattoidea.

2.2. Approche de PCR quantitative

2.2.1. Principe général et outils développés

La réaction en chaîne par polymérase en temps réel (PCRq) repose sur la possibilité de suivre en continu le processus d'amplification d'un gène cible dans un échantillon. Cette technique mesure au cours du temps le nombre de copies amplifiées du gène (*i.e.*, amplicons). A chaque cycle de PCR, la quantité d'amplicons est mesurée à l'aide d'un fluorophore dont l'émission fluorescente est proportionnelle au nombre d'amplicons. Le fluorophore utilisé ici est le SYBR green qui fluoresce lorsqu'il se fixe à de l'ADN double brin. Les données de fluorescence sont collectées par cycle de PCR et permettent de distinguer trois phases : une phase de bruit de fond, une phase exponentielle et une phase de plateau. La phase de bruit de fond correspond à celle où le nombre d'amplicons générés n'est pas suffisant pour que la fluorescence dépasse celle du bruit de fond. La seconde phase se caractérise par une augmentation exponentielle du nombre d'amplicons et où la fluorescence émise est significativement plus forte que celle du bruit de fond. Le point où le signal fluorescent est significativement supérieur à la fluorescence seuil est défini comme le Ct (*threshold cycle*) et apparaît en début de deuxième phase. C'est à partir de ce Ct que l'obtention de résultats quantitatifs est possible. Enfin, la dernière phase est celle de plateau où le nombre d'amplicons cesse d'augmenter par cycle de PCR.

Une approche de PCRq a été développée afin d'étudier la prévalence de deux espèces de *Trichonympha* dans des ouvriers individuels de *R. grassei* ainsi que leur abondance relative au sein des individus. Une étude pilote menée sur la diversité sur la longueur totale du gène ribosomal 18S des *Trichonympha* chez les termites du genre *Reticulitermes* a révélé une diversité importante de ces protistes (Figure 29) (Dedeine *et al*., données non publiées). Chez *R. grassei*, deux lignées phylogénétiques de *Trichonympha*, A et B, coexistent au sein d'un même hôte (Figure 29) (Dedeine *et al*., données non publiées). Ces deux lignées de *Trichonympha* seront par la suite nommées *Trichonympha* TgA et TgB. Trois marqueurs ont été mis au point : deux spécifiques aux *Trichonympha* TgA et TgB designés sur la région du

gène ribosomal 18S-ITS, et un spécifique au gène *Orf128* de *Cotesia congregata* (Bézier *et al*., 2009) utilisé comme exogène. Des gammes en cinq logs ont été utilisées pour détecter la présence ou non de ces gènes dans les différents échantillons et les quantifier de manière absolue, même à de très faibles quantités puisque les gammes ont des ordres de grandeur qui englobent ceux des différents Ct des échantillons. Les PCRq ont été réalisées à la plateforme d'Analyse des Systèmes Biologique – département d'Analyse Génomique de l'université de Tours.

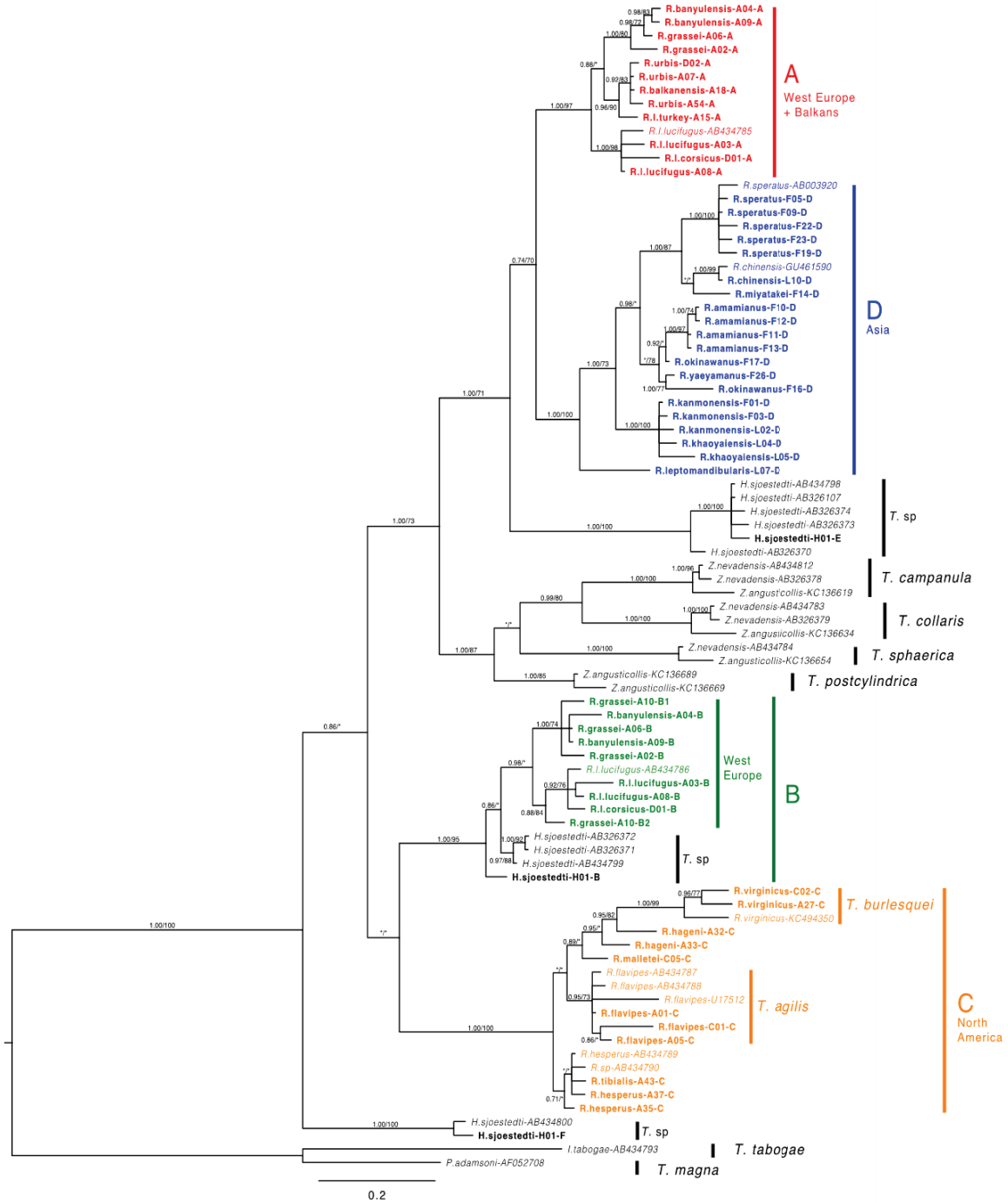


Figure 29 : Arbre phylogénétique des *Trichonympha* de termites. Arbre basé sur des inférences bayésiennes et en maximum de vraisemblance sur le gène ribosomal 18S total. Le nom de l'espèce de termite hôte est dans le ►

◄ nom des séquences. Les séquences en gras ont été obtenue dans l'étude préliminaire menée par Dedeine *et al*. (données non publiées). Le numéro d'accession des autres séquences utilisées est dans leur nom.

2.2.2. Extraction d'ADN et amplification PCR

L'ADN des intestins individuels d'ouvriers a été extrait de la même façon que les intestins individuels d'alates, sauf que 10 ng d'un exogène synthétisé au laboratoire (voir la fin de cette section pour la synthèse de l'exogène), le gène *Orf128* de la guêpe parasitoïde *C. congregata* (Bézier *et al*., 2009), ont été ajoutés à chaque échantillon avant l'étape d'extraction de l'ADN.

Pour chaque échantillon, les abondances relatives des deux *Trichonympha* ont été estimées en amplifiant trois gènes par PCRq : une portion de la région ITS du gène ribosomal 18S spécifique à *Trichonympha* TgA (qPCR_TgA-F : 5'-CCG CCA AAT ATT AGC TRA TRY TA-3', qPCR_TgA-R : 5'-ATT CTT TCG AAG TAT AAA ATA TCC-3'), une portion de la région ITS du gène ribosomal 18S spécifique à *Trichonympha* TgB (qPCR_TgB-F : 5'-TGG AKA CAT GAA TAC TTT AGC G-3', qPCR_TgB-R: 5'-CCC ATA AGY ATG GAC AAT CC-3') et une portion spécifique à *Orf128* (qPCR_Orf128-F : 5'-AGC GAC CAA CCT TCA TTT ACG-3', qPCR_Orf128-R : 5'-TAG CGC GGA AGC TCA GTA ATC-3'). Pour chaque échantillon, trois réactions ont donc été réalisées dans un volume total de 13 µL avec le kit d'analyse SYBR MESA Blue qPCR Mastermix Plus (Eurogentec). Pour chaque réaction, 6.5 µL de mix SYBR green, 1.25 µL de mix de couples d'amorces à 3.125 µM et 2.25 µL d'eau ultra pure ont été ajoutés aux 3 µL d'ADN de l'échantillon (dilué au 1/10e pour la détection des *Trichonympha* et dilué au 1/1000e pour la détection d'*Orf128*). Le mix de réaction et la matrice ADN ont été déposés dans des plaques 384 puits par un automate de pipetage epMotion 5070 (Eppendorf). Les amplifications de PCRq ont été réalisées avec une QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR (Thermo Scientific) en tripliquas et ont été obtenues après 40 cycles composés de 15 sec à 95 °C puis de 1 min à 60 °C.

Des courbes standards en cinq logs ont également été réalisées en tripliquas pour pouvoir vérifier l'efficacité des réactions de PCR puis quantifier chaque gène cible. Pour cela, les régions amplifiées par PCRq ont été synthétisées par amplification PCR classique puis purification. Les amplifications PCR des trois régions ont été réalisées avec le kit DreamTaq DNA Polymerase (Promega) dans un volume final de 25 µL comprenant 12.5 µL de mix DreamTaq, 1.25 µL de chaque amorce PCRq à 10 µM et 1 µL d'ADN d'ouvrier individuel. Les réactions de PCR ont été effectuées avec 2 min à 95 °C, 30 cycles comprenant 30 sec à 94 °C,

30 sec à 60 °C et 1 min à 72 °C, suivis d'une étape finale de 10 min à 72 °C. Les produits PCR obtenus ont ensuite été purifiés sur gel d'agarose avec le kit Nucleo-Spin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) en suivant les instructions du fournisseur, les produits PCR purifiés ont été élués dans 20 µL de tampon NE. Les trois produits PCR purifiés ont ensuite été dosés par Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen) et ont été dilués en série afin d'obtenir des gammes pour la PCRq dont la quantité finale de molécules dans chaque puits de la plaque de PCRq soit de 10^3 à 10^7 molécules d'ADN (A. Bézier, communication personnelle). Les réactions de PCRq pour les gammes ont été réalisées avec le même protocole que précédemment, les produits PCR purifiés servant de matrice ADN.

Les produits PCR purifiés de l'exogène *Orf128* ont également été synthétisés de cette façon sur la longueur totale du gène (1470 pb) (Ccorf128_ATG : 5'-ATG GAA TCA TTT TTT GAT CAA GAA C-3', Ccorf128_STOP : 5'-TTA TAA CTG ATC AAT AAT TGC AAA TTT GT-3') (A. Bézier, données non publiées) avant d'être dosés et ajoutés comme exogène aux échantillons d'ouvriers individuels avant extraction d'ADN.

2.2.3. Traitement des données de PCR quantitative

Les résultats de PCRq obtenus ont été traités sous le logiciel QuantStudio Real-Time PCR v1.1 (Life Technologies Corporation). Les efficacités des réactions de PCRq étaient de 96.1 %, 96.5 % et 101.3 % pour les gènes *Orf128*, *Trichonympha* TgA et TgB, respectivement, et expliquaient plus de 99% de la variance (r^2>0.99) comme recommandé (Figure 30) (Bustin *et al*., 2009 ; Pfaffl, 2004).

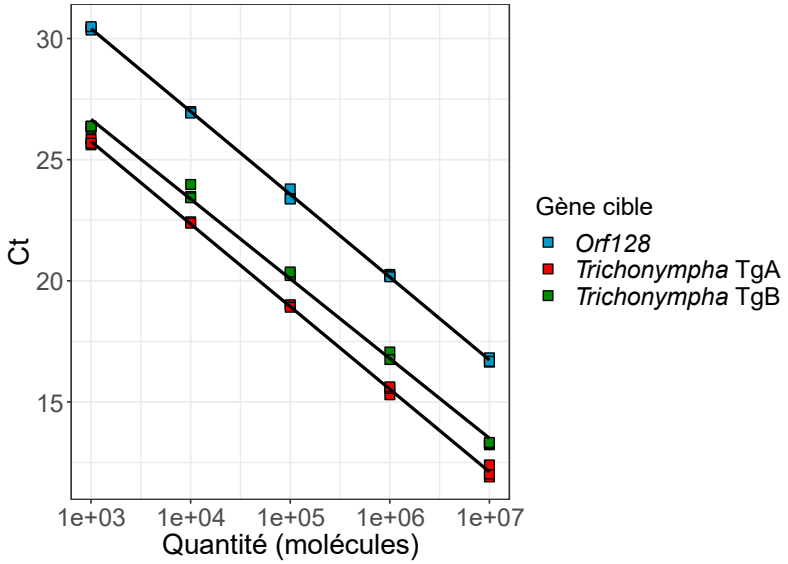


Figure 30 : Courbes standards des trois gènes amplifiés par PCR quantitative. Ct : *threshold cycle*. Equations des droites : y = -3.419x + 40.663 pour *Orf128*, y = -3.409x + 35.983 pour *Trichonympha* TgA et y = -3.290x + 36.536 pour *Trichonympha* TgB.

A la fin des cycles d'amplifications, la fluorescence est mesurée en continu avec un gradient de température allant jusqu'à 95 °C par pallier de 0.1. Cette étape permet d'obtenir la courbe de fusion des produits PCR amplifiés afin de vérifier la spécificité de l'amplification. L'analyse des courbes de fusion a été réalisée pour chaque échantillon afin de vérifier leur unimodalité et donc l'amplification PCR d'un seul produit (Figure 31).

La quantification des échantillons a été réalisée par quantification absolue à l'aide des courbes standards. La quantité du gène cible amplifié dans l'échantillon est proportionnelle à la quantité mise dans le puits pour la PCRq seulement durant la phase exponentielle d'augmentation de la fluorescence (Pfaffl, 2004). Le cycle Ct où la fluorescence dépasse le seuil de détection a été utilisé pour chaque échantillon pour en déduire les quantités de chacun des gènes cibles. Les réactions de PCRq ont été réalisées en tripliquas, seuls les réplicas avec une différence de Ct inférieure à 0.5 cycle entre eux ont été gardés. Les quantités relatives de *Trichonympha* TgA et TgB dans un individu ont été normalisées avec le nombre de molécules d'*Orf128* détectées dans le même échantillon.

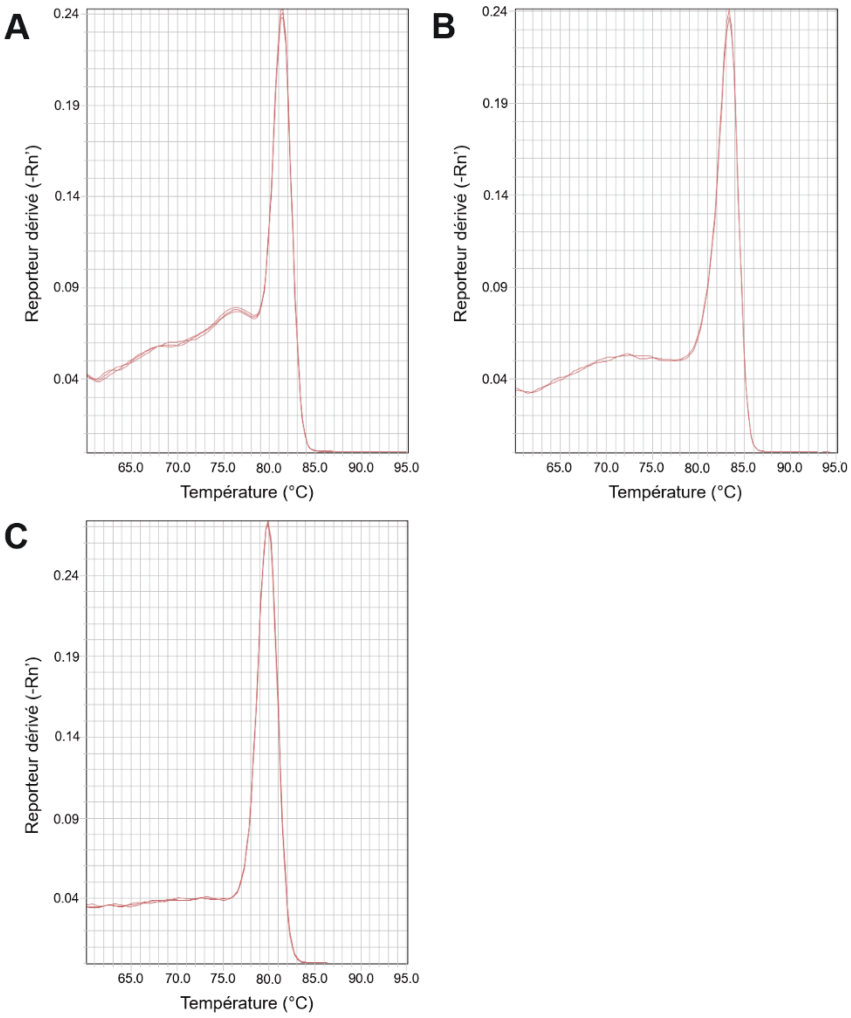


Figure 31 : Courbes de fusion des trois gènes cibles étudiés par PCR quantitative. (A) Trichonympha Tga. (B) Trichonympha TgB. (C) Orf128.

Chapitre V :

Étude 1

Efficacité de transmission verticale par fondation de colonies en laboratoire



© Paride Bertolin (JAB) 2013

1. Introduction

Chez les insectes sociaux, et chez les termites en particulier, la transmission verticale des symbiotes intestinaux est fortement conditionnée par la fondation de nouvelles colonies (Nalepa, 2017 ; Onchuru *et al*., 2018). En effet, ces colonies sont fondées par des reproducteurs ailés dispersant de leurs colonies parentales et apportant les symbiotes à la nouvelle unité sociale. L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'efficacité de transmission des bactéries et des protistes de colonies parentales à colonies filles en fondant des colonies de *Reticulitermes* au laboratoire puis en passant par une approche de métabarcoding. Le second objectif était de déterminer si la transmission des symbiotes intestinaux est bien biparentale chez ces espèces. Pour cela, des colonies des deux espèces *R. grassei* et *R. flavipes* ainsi que des colonies hybrides ont été fondées entre des reproducteurs ailés au laboratoire. En effet, l'étude pilote menée au laboratoire a montré que les espèces de protistes présentes chez ces deux termites n'étaient pas les mêmes (Dedeine *et al*., données non publiées) et permettraient de savoir si les deux parents transmettent leurs symbiotes. Cependant, ces deux objectifs n'ont pas encore abouti, les raisons sont liées au succès de fondation des colonies qui était trop faible. Le suivi de survie et de reproduction des colonies fondées au laboratoire a été réalisé pendant 92 semaines pour évaluer leur succès de fondation. Ces résultats sont présentés dans la suite de ce chapitre. Les raisons expliquant les faibles taux de succès de fondation sont ensuite discutées.

La fondation des colonies de termites en laboratoire a été réalisée avec des alates femelles et mâles provenant de trois colonies parentales de *R. grassei* (appelées G1, G2 et G3[1]) et de deux colonies parentales de *R. flavipes* (nommées F1 et F2[2]). Ces cinq colonies ont été collectées en avril 2017 dans la région de l'île d'Oléron (Charente-Maritime). Les couples ont été formés de manière aléatoire entre alates femelle et mâle provenant des trois colonies de *R. grassei* (croisements intra-*grassei*), des deux colonies de *R. flavipes* (croisements intra-*flavipes*) ainsi que des couples inter-espèce entre alates des colonies G1 et G2 et des colonies F1 et F2 (croisements hybrides) (Table 4). Trente réplicas ont été réalisés par modalité de croisement, un total de 150 alates femelles et de 150 alates mâles ont été utilisés pour les colonies G1 et G2, de 90 alates par sexe pour la colonie G3 et de 120 alates par sexe pour les colonies F1 et F2 pour former les 630 couples.

[1] 17A33, 17A13 et 17A07, respectivement.
[2] 17A08 et 17A18, respectivement.

Table 4 : Modalités de croisement des alates entre les différentes colonies de termites.

		Mâles				
	x	**G1**	**G2**	**G3**	**F1**	**F2**
Femelles	**G1**	G1xG1	G1xG2	G1xG3	G1xF1	G1xF2
	G2	G2xG1	G2xG2	G2xG3	G2xF1	G2xF2
	G3	G3xG1	G3xG2	G3xG3	-	-
	F1	F1xG1	F1xG2	-	F1xF1	F1xF2
	F2	F2xG1	F2xG2	-	F2xF1	F2xF2

G1 à G3 : alates provenant des colonies de *R. grassei*.

F1 et F2 : alates provenant des colonies de *R. flavipes*.

En vert : modalités de croisements intra-*grassei*.

En orange : modalités de croisements intra-*flavipes*.

En gris : modalités de croisements hybrides.

2. Résultats

2.1. Survie des colonies

Un total de 630 couples intra- ou interspécifiques entre les deux espèces de termites ont été effectués en laboratoire en avril 2017. Une analyse a montré que, tout au long des 92 semaines de suivi des fondations, la survie des colonies a significativement été impactée par le type de croisement ($Chi^2=110.609$; $p<10^{-15}$). Les courbes de survie des croisements intra-*grassei* étaient significativement plus faibles que celles des croisements hybrides ($p<10^{-10}$) et intra-*flavipes* ($p<10^{-15}$), toutes modalités confondues (Figure 32). Les croisements hybrides présentaient des courbes de survie significativement plus faibles que celles des croisements intra-*flavipes* ($p=0.012$) (Figure 32).

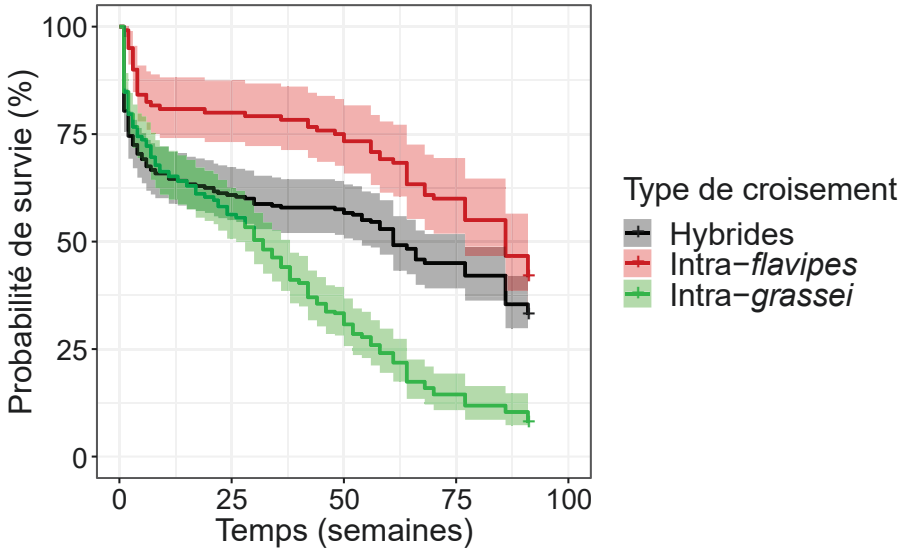


Figure 32 : Courbes de survies des colonies de termites fondées en laboratoire par type de croisement. Courbes basées sur des estimations de Kaplan-Meier.

Un effet significatif du type de croisement a été détecté sur la mortalité des colonies après 14 (Chi^2=8.786 ; p=0.012), 65 (Chi^2=21.685 ; $p<10^{-4}$) et 92 semaines de fondation (Chi^2=21.424 ; $p<10^{-4}$). Après 14 semaines de fondation, les mortalités des colonies hybrides et des colonies intra-*grassei* n'étaient significativement pas différentes (p=0.999), mais elles étaient significativement plus élevées que la mortalité des colonies intra-*flavipes* (p=0.017 et p=0.015, respectivement) (Table 5). Après 65 et 92 semaines de fondation, la mortalité des croisements intra-*grassei* était significativement plus élevée que pour les croisements hybrides ($p<10^{-3}$ pour les deux dates) et intra-*flavipes* ($p<10^{-3}$ pour les deux dates) qui eux n'avaient pas de différence significative entre leurs taux de mortalité aux deux dates (p=0.482 et p=0.807, respectivement) (Table 5). Aucune des fondations impliquant la colonie G3 n'a survécu jusqu'à la 92e semaine.

Table 5 : Pourcentage de mortalité des colonies par type de croisement après 14, 65 et 92 semaines de fondation (S14, S65 et S92).

	Hybrides		**Intra-*flavipes***		**Intra-*grassei***	
Date de suivi	% de mortalité	p-value	% de mortalité	p-value	% de mortalité	p-value
S14	35.8	a	19.2	b	35.9	a
S65	51.7	a	36.7	a	82.6	b
S92	67.1	a	58.3	a	92.2	b

Les p-values ont été ajustées en post-hoc entre les types de croisements par date.

2.2. Reproduction des colonies

La reproduction des colonies a également été évaluée à trois dates. Quatorze, 65 et 92 semaines après la fondation des colonies en laboratoire, les colonies hybrides et intra-*flavipes* possédant au moins une larve ou au moins un ouvrier semblaient plus nombreuses que les colonies intra-*grassei* (Table 6).

Table 6 : Pourcentage de colonies par type de croisement possédant au moins une larve ou un ouvrier parmi les colonies encore vivantes après 14, 65 et 92 semaines de fondation (S14, S65 et S92).

	Hybrides		**Intra-*flavipes***		**Intra-*grassei***	
Date de suivi	Larves	Ouvriers	Larves	Ouvriers	Larves	Ouvriers
S14	82.5	5.2	83.5	20.6	41.6	0
S65	15.5	93.1	22.4	90.8	0	74.5
S92	24.1	89.9	42.0	88.0	0	81.0

Le nombre de larves (ou d'ouvriers) présents dans les colonies en possédant au moins une (ou un) était significativement différent entre les types de croisement avec un effet significatif de l'interaction entre la date et la caste des descendants (Table 7). Le nombre moyen de larves ou d'ouvriers par colonie en possédant était équivalent entre les colonies hybrides et intra-*flavipes* ($p=0.893$) et significativement plus élevé que dans les colonies intra-*grassei* ($p<0.0001$ dans les deux cas) (Figure 33). Tous types de croisements confondus, le nombre de larves était significativement plus élevé que le nombre d'ouvriers à la semaine 14 ($p=0.0006$) alors que l'effet inverse a été révélé à la semaine 65 ($p<0.0001$) (Figure 33).

Table 7 : Analyse de la variance du modèle approprié au nombre de descendants dans les colonies en possédant.

Variable réponse	Variables explicatives	Chisq	Df	Pr(>Chisq)	
Nombre de desc.					
	Type de croisement	41.581	2	**9.35E-10**	***
	Caste des desc.	14.361	1	**0.0001509**	***
	Date	31.964	2	**1.15E-07**	***
	Caste des desc. x Date	63.556	2	**1.58E-14**	***

Desc. : descendants.

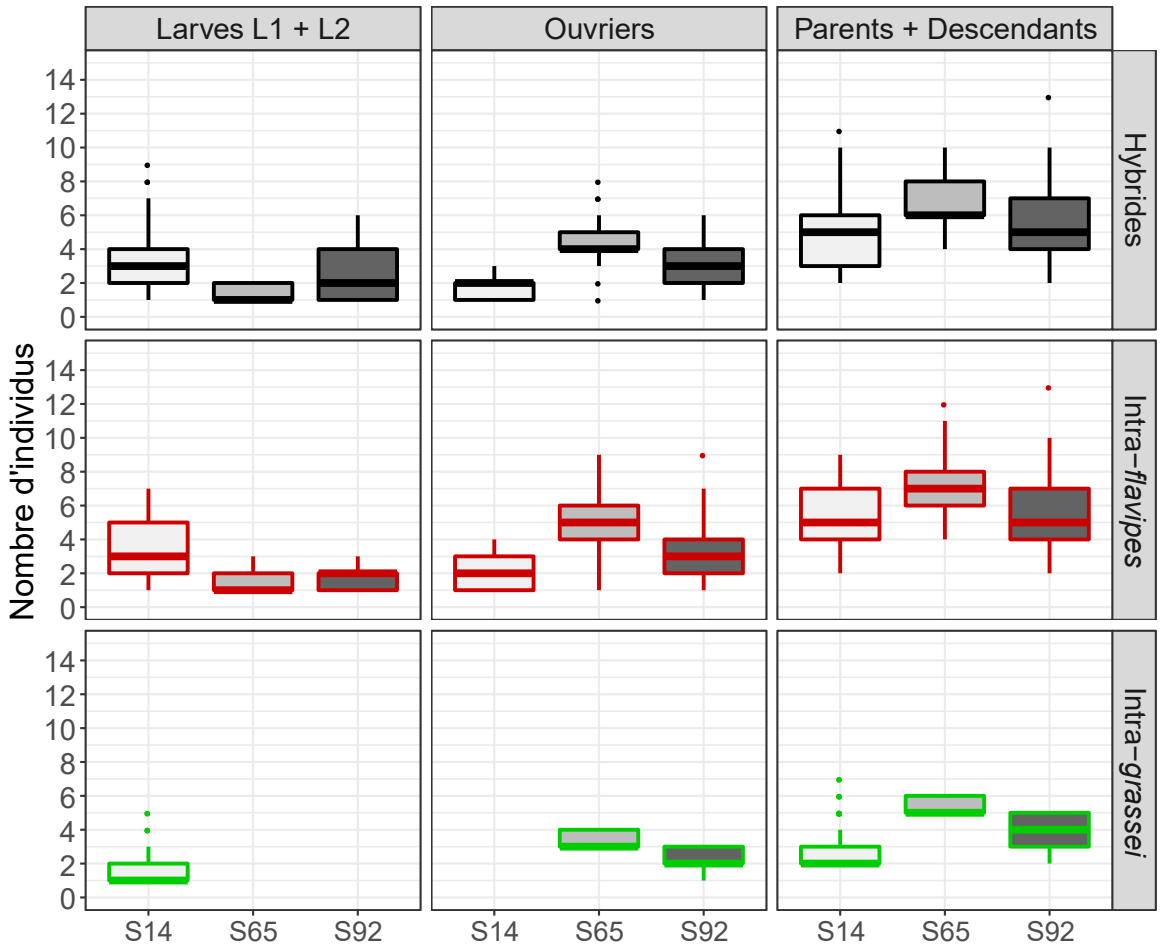


Figure 33 : Nombre de larves ou d'ouvriers par colonie en possédant au moins une ou un et nombre moyen d'individus par colonie après 14, 65 et 92 semaines de fondation (S14, S65 et S92).

3. Discussion

Après 65 semaines de fondation, le nombre d'ouvriers par colonie était faible (en moyenne quatre ouvriers parmi les colonies en possédant). Pour être sûrs que tous les symbiotes soient transmis aux descendants et pour maximiser la détection de tous les symbiotes, nous avons choisi d'attendre le plus longtemps possible à l'échelle de cette thèse pour disséquer l'ensemble des individus présents dans les colonies filles. Les dissections ont donc été réalisées dans les jours suivant la 92e semaine de fondation, même si, au final, le nombre d'individus par colonie était plus faible qu'à la 65e semaine. Les intestins de la reine, du roi et de chaque ouvrier présent dans la colonie ont été disséqués de manière individuelle, ces échantillons seront séquencés plus tard à la suite de ce travail de thèse. Ces échantillons formeront le pool symbiotique de la colonie fille. Ce pool symbiotique sera comparé à celui des deux colonies

parentales pour estimer les taux de transmission de chaque symbiote. Les données permettront également de vérifier que la reine et le roi ont perdu leurs symbiotes intestinaux comme cela a été montré chez les couples royaux de *R. speratus* après une année de fondation (Shimada *et al*., 2013).

Cette étude a tout de même permis d'évaluer le succès de fondation de colonies de *Reticulitermes* en laboratoire en suivant pendant 92 semaines à la fois leur taux de survie et leur taux de reproduction. Les résultats de survie ont globalement suggéré un meilleur taux de survie des jeunes colonies de *R. flavipes* que de celles de *R. grassei*, avec un taux de survie global intermédiaire pour les jeunes colonies hybrides. Après 14 semaines de fondation, les colonies hybrides et de *R. grassei* présentaient un taux de mortalité d'environ 35 % contre environ 20 % pour les colonies de *R. flavipes* (Table 5). Le peu d'études de survie de colonies de *Reticulitermes* nouvellement fondées ont montré des taux de mortalité équivalents à nos résultats après 100 jours de fondation (∼14 semaines) (Brossette *et al*., 2017 ; Matsuura & Nishida, 2001). La mortalité des colonies de *R. grassei* a ensuite été plus élevée que pour les autres types de croisement. Les colonies intra-*grassei* semblaient plus sensibles à l'humidité (observation personnelle), elles ont été maintenues dans les mêmes conditions que les autres colonies mais peu voire pas d'eau était ajoutée lors des suivis. Concernant la reproduction, les résultats ont montré un taux de fécondité équivalent entre les colonies intra-*flavipes* et les colonies hybrides au laboratoire, et un plus faible taux de fécondité pour les colonies intra-*grassei* (Figure 33). Cependant, le nombre de descendants obtenus par colonie fondée au laboratoire restait très faible comparé à de précédentes études. La première ponte des œufs dans les colonies de *Reticulitermes* arrive en moyenne après 8 à 25 jours de fondation (Buchli, 1960a ; Howard, Mallette, Haverty, & Smythe, 1981 ; Lainé & Wright, 2003) et les premières larves entre 20 et 60 jours après la fondation (Buchli, 1958, 1960a ; Howard *et al*., 1981 ; Janowiecki, Jones, & Bryant, 2013 ; Lainé & Wright, 2003 ; Light & Weesner, 1955). Les larves commencent à se nourrir au troisième stade environ 40 à 70 jours après la fondation de la colonie (Buchli, 1958 ; Howard *et al*., 1981 ; Janowiecki *et al*., 2013 ; Lainé & Wright, 2003), ces larves L3 sont alors de jeunes ouvriers. Cependant, peu d'études se sont intéressées à la dynamique du nombre d'individus dans de jeunes colonies de *Reticulitermes* lors des premiers mois de la fondation. Après 100 jours de fondations (~14 semaines), les jeunes colonies de *R. speratus* présentent entre 9 et 19 descendants, œufs compris, avec environ deux larves et entre 5 et 13 ouvriers (Matsuura & Nishida, 2001 ; Shimada *et al*., 2013). Après 400 jours de fondation (~57 semaines), ces colonies sont composées de 139 individus en moyenne avec environ cinq larves et 105 ouvriers (Shimada *et al*., 2013). Chez *R. flavipes*, après deux ans de

fondation, les colonies comportent en moyenne 387 individus dont 58 larves et 322 ouvriers (Thorne, Breisch, & Traniello, 1997). Même si les colonies de *R. flavipes* ont présenté le meilleur succès de fondation, celles de *R. grassei* le succès le plus bas et les colonies hybrides un succès de fondation intermédiaire, globalement, le taux de succès de fondation en laboratoire des trois types de colonies lors de cette expérience n'a pas été très élevé comparé à d'autres études, notamment le taux de reproduction (Shimada *et al*., 2013 ; Thorne *et al*., 1997). Ces différences pourraient être expliquées par plusieurs facteurs.

Tout d'abord, des différences ont été réalisées sur le design expérimental. Lors des précédentes études, les termites ont principalement été nourris avec de la cellulose, et des solutions nutritives ou de l'acide urique ont été ajoutés dans le milieu de fondation des jeunes colonies (Brossette *et al*., 2017 ; Shimada *et al*., 2013 ; Thorne *et al*., 1997). De plus, les colonies n'ont pas été dérangées pour des suivis de survie ou de reproduction (Brossette *et al*., 2017 ; Shimada *et al*., 2013 ; Thorne *et al*., 1997). Lors de la mise en place de cette expérience, nous avons choisi de nourrir les colonies avec de la sciure de bois sans autre apport nutritif ajouté puisque la nourriture impacte la composition symbiotique des termites (Duarte, Duarte, Borges, & Nunes, 2017 ; Mikaelyan, Dietrich, *et al*., 2015). L'ajout de nutriments dans le milieu des colonies a pu améliorer la valeur sélective des fondateurs dans les études précédentes et ainsi permettre une meilleure reproduction. Nous avons également régulièrement ouvert les boites contenant les colonies pour effectuer les suivis de survie et de reproduction. L'ouverture des boites a pu provoquer un stress sur les individus modifiant leur physiologie qui pourrait impacter leur survie et leur reproduction.

Chez *R. lucifugus*, environ 60 % des femelles ne font pas de positions d'appel des mâles après l'essaimage, certainement parce qu'elles ne sont pas sexuellement matures (Buchli, 1960b). L'auteur a également remarqué que si ces femelles sont tout de même mises en couple avec un mâle en laboratoire, la fondation est un échec car soit elles meurent, soit elles n'ont jamais de descendants (Buchli, 1960b). Ce phénomène pourrait également avoir lieu chez *R. grassei* et *R. flavipes* et pourrait expliquer les faibles succès de fondation des colonies lors de cette expérience. Nous n'avons en effet pas vérifié si toutes les femelles utilisées faisaient des positions d'appel avant de former les couples.

Les couples d'alates formés au laboratoire ont été aléatoirement réalisés, aucun choix n'a été fait par les alates. En conditions naturelles, il y aurait un choix à la fois par la femelle et le mâle qui se palpent 15 sec maximum puis se suivent en tandem (Buchli, 1960b). Un tandem 'efficace' dure au moins 10 sec, c'est-à-dire lorsque les deux partenaires se sont choisis et partent à la recherche d'un site de ponte pour fonder une nouvelle colonie (Buchli, 1960b). Si

le tandem ne fonctionne pas, les alates vont chercher un autre partenaire sexuel (Buchli, 1960b). Lorsque l'on force un couple d'alates à être ensemble, il n'y a pas nécessairement de rejet comportemental immédiat, mais cela peut entrainer à plus long terme de la surmortalité et la production d'aucun descendant (S. Dupont et C. Lucas, communication personnelle), ce qui pourrait expliquer les faibles taux de succès de fondation obtenus lors de cette étude. Le choix du partenaire sexuel pourrait être basé sur la diversité génétique de l'autre (*i.e.*, hétérogamie) afin de favoriser l'hétérozygotie dans la descendance qui serait corrélée à une meilleure valeur sélective (Brown, 1997 ; Chapman, Nakagawa, Coltman, Slate, & Sheldon, 2009 ; David, 1998). Il existerait en effet chez d'autres espèces une préférence pour des partenaires sexuels génétiquement différents (Beltran, Cézilly, & Boissier, 2008 ; Durand, Beauché, Richard, & Beltran-Bech, 2015 ; Mays Jr & Hill, 2004) même si des accouplements entre individus apparentés n'ont pas forcément d'effet néfaste sur la valeur sélective des descendants (Durand, Loiseau, Prigot, Braquart-Varnier, & Beltran-Bech, 2018). Les colonies issues de couples intra-coloniaux, en particuliers ceux de *R. flavipes*, ont d'ailleurs présenté les meilleurs succès de fondation (données non montrées), l'hétérozygotie n'est peut-être pas fortement associée à la valeur sélective chez les *Reticulitermes*. Le choix de partenaire sexuel pourrait également être porté sur la composition du microbiote intestinal de l'autre. Même s'il a souvent été décrit que la transmission verticale des symbiotes intestinaux de termites est parfaite, elle n'a jamais été mesurée et les deux composantes de transmission α et β peuvent être critiques. Lorsque les alates quittent leur colonie parentale, nous ne savons pas s'ils partent ou non avec tout le pool symbiotique présent (composante α). Comme la communauté symbiotique est indispensable à la nutrition des hôtes, les colonies ne présentant pas tous les symbiotes intestinaux ne survivraient pas ou n'auraient pas de descendants, ce qui pourrait expliquer les faibles succès de fondation lors de notre expérience. De plus, si certains symbiotes ne sont pas présents dans les alates, leur transmission est un échec mais certains pourraient être acquis secondairement dans l'environnement en conditions naturelles, notamment les bactéries (Berlanga, Palau, & Guerrero, 2018 ; Bourguignon *et al*., 2018 ; Duarte, Duarte, *et al*., 2017 ; Mikaelyan, Dietrich, *et al*., 2015). Or, nous avons tout stérilisé avant de mettre les individus en couple, les bactéries ou autres microorganismes comme des champignons présents dans le bois et pouvant potentiellement aider à la dégradation de celui-ci ont été enlevés, ce qui a pu accentuer la baisse du succès de fondation de nos colonies.

Chapitre VI :

Étude 2

Estimation de la composante α du taux de transmission des protistes



© Paride Bertolin (JAB) 2013

1. Introduction

Comme nous venons de le voir dans le chapitre précédent, le taux de transmission global d'une colonie parentale à une colonie fille n'a pas pu directement être estimé au cours de cette thèse. La première condition pour qu'un symbiote soit transmis à une colonie fille est qu'il soit présent dans les alates quittant la colonie parentale. Nous avons choisi d'estimer la première composante de transmission α afin de savoir si, lorsqu'ils quittent leur colonie parentale, les alates portent la communauté microbienne complète disponible. Cette seconde étude s'est focalisée sur les protistes intestinaux de termites.

En utilisant une approche de métabarcoding pour séquencer les gènes ribosomaux 18S des oxymonades et des parabasaliens, cette étude avait trois objectifs. Le premier objectif était d'analyser la diversité et la structure des communautés de protistes dans les populations de termites afin d'étudier les variations intraspécifiques du microbiote intestinal entre les colonies et les populations. Notre second objectif était d'estimer l'efficacité de la composante α de transmission verticale de ces protistes en comparant le pool symbiotique individuel des alates avec le pool symbiotique de leur colonie parentale. Notre troisième objectif était d'évaluer si les taux de transmission verticale permettaient d'expliquer la prévalence des protistes dans les populations hôtes.

Pour cela, des colonies de *R. grassei* ont été collectées dans deux régions françaises distantes d'environ 160 km : la région de l'île d'Oléron (Charente-Maritime) et la région de Pissos (Landes). Au total, 12 colonies de termites *R. grassei* ont été échantillonnées dans la population d'Oléron en avril 2017 et 12 ont été échantillonnées dans la population de Pissos en avril 2018 (Figure 34). Deux génotypes mitochondriaux, l'haplotype A et l'haplotype B, ont été retrouvés dans les deux populations (Figure 34). Pour chaque colonie, les intestins de sept alates femelles et sept alates mâles ont été prélevés de manière individuelle. Les intestins de 10 ouvriers ont également été prélevés puis 'poolés' (pour une description détaillée de la méthode, voir le chapitre IV). Ces 15 échantillons par colonie ont ensuite été séquencés à haut-débit pour connaître leurs diversités oxymonade et parabasalienne. Au total, 336 alates individuels et 24 pools d'ouvriers provenant des deux populations françaises étudiées de *R. grassei* ont été séquencés en 18S oxymonade et en 18S parabasalien.



Figure 34 : Carte de collecte des colonies de *Reticulitermes grassei* dans les populations d'Oléron (A) et de Pissos (B). Vingt-quatre colonies de *R. grassei* ont été collectées au total, la moitié dans la région de l'île d'Oléron (Charente-Maritime) et l'autre dans la région de Pissos (Landes). Les colonies en noir : haplotype mitochondrial A. Colonies en bleu : haplotype mitochondrial B. Carte obtenue avec le logiciel QGIS v2.18.17 (QGIS Development Team, 2019).

2. Résultats

Les résultats obtenus sur les protistes ont donné lieu à la rédaction d'un manuscrit d'article publié dans *Molecular Ecology* et présenté en Annexe 2.

2.1. Caractérisation des communautés de protistes

2.1.1. Assignation taxonomique des protistes

Après le traitement bioinformatique des jeux de données, un total de 2 849 038 et 4 393 966 séquences a été obtenu pour les oxymonades et les parabasaliens, respectivement. Pour le jeu de données oxymonade, 67 OTUs ont été obtenus par MED et ont été assignés à

sept taxa au niveau espèce appartenant à deux genres (*Pyrsonympha* et *Dinenympha*) de la famille des Pyrsonymphidae (Figure 35A). Le nombre de séquences par OTU oxymonade variaient de 741 à 762 231 avec une moyenne de 42 523 séquences. L'analyse MED a permis d'obtenir 31 OTUs pour le jeu de données parabasalien qui ont été assignés à six taxa au niveau espèce appartenant à cinq genres (*Trichonympha*, Holomastigotoididae genre A, Trichomonadidae genre A, *Cthylla* et *Spirotrichonymphella*) répartis en quatre familles (Figure 35B). Le nombre de séquences par OTU parabasalien variaient de 1 467 à 1 027 101 avec une moyenne de 141 741 séquences. Plus de détails sur les OTUs, leur assignation et le nombre de séquences associées sont dans les *Supporting information*[3] *Tables S1* et *S2* de l'article 1. Par commodité, les 'taxa niveau espèce' seront simplement nommés 'espèces' dans la suite de ce rapport.

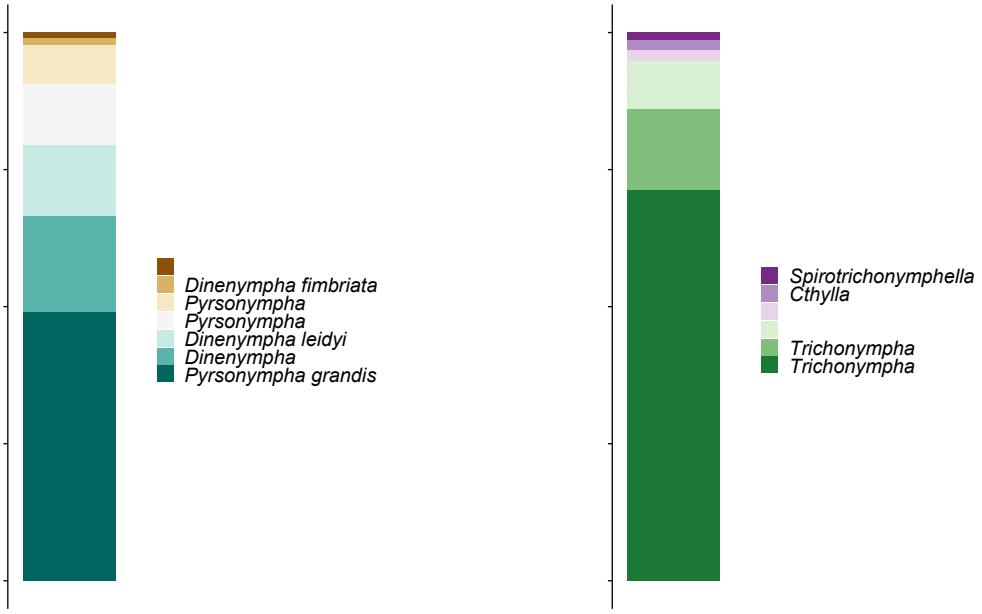


Figure 35 : Résultats d'assignation des taxa oxymonades et parabasaliens au niveau espèce et abondance relative dans les jeux de données. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre d'OTUs correspondant assignés aux taxa niveau espèce. Uncl. : non classifié.

[3] Les *Supporting informations* ne sont pas indispensables à la compréhension de mes résultats et ne sont donc pas présentés dans cette thèse (de même pour les données sur les bactéries du chapitre VII). N'hésitez pas à me contacter si vous souhaitez les consulter, c'est avec plaisir que je vous les enverrai.

2.1.2. Richesse des communautés de protistes

La comparaison de la richesse observée (*i.e.*, le nombre d'OTUs) en protistes entre les échantillons des différentes colonies a été réalisée séparément sur les pools d'ouvriers et les alates individuels. La richesse observée dans les pools d'ouvriers, que ce soit pour les oxymonades ou les parabasaliens, n'était pas significativement différente entre les populations d'Oléron et de Pissos (Oxymonades : $F_{(1,21)}$=0.145 ; p=0.707, Parabasaliens : $F_{(1,21)}$=2.990 ; p=0.098). Deux haplotypes mitochondriaux étaient présents dans les deux populations étudiées et ce facteur a également été testé. La richesse observée n'était pas non plus significativement différentes entre les deux haplotypes mitochondriaux (Oxymonades : $F_{(1,21)}$=1.559 ; p=0.226, Parabasaliens : $F_{(1,21)}$=0.755 ; p=0.394). En moyenne pour les deux populations, chaque pool d'ouvriers portait 78 OTUs (55 d'oxymonades et 23 de parabasaliens).

Dans les alates, le nombre d'OTUs oxymonades variaient de 32 à 63 avec une moyenne de 52 OTUs par individu. La richesse observée en oxymonades différait significativement entre les deux sexes ($F_{(1,311)}$=4.804 ; p=0.029), mais n'était pas significativement différente entre les deux populations ($F_{(1,21)}$=3.332 ; p=0.082) ni entre les deux haplotypes mitochondriaux ($F_{(1,21)}$=0.061 ; p=0.807). Cependant, l'effet sexe était à prendre avec précaution puisqu'en moyenne les femelles portaient un OTU oxymonade en moins que les mâles. Le nombre d'OTUs parabasaliens par alate était de 10 à 29 avec une moyenne de 22. Aucun facteur n'expliquait significativement cette richesse observée, que ce soit la population ($F_{(1,21)}$=1.240 ; p=0.278), le sexe ($F_{(1,311)}$=0.006 ; p=0.937) ou encore l'haplotype mitochondrial ($F_{(1,21)}$=1.239 ; p=0.278). Globalement, ces analyses ont montré que la richesse observée des communautés de protistes ne variait pas entre les populations ni entre les haplotypes. De plus, la richesse observée entre femelles et mâles alates semblait similaire.

2.1.3. Structure des communautés de protistes

La structure (*i.e.*, la composition en OTUs des échantillons prenant en compte l'abondance relative des OTUs) des communautés d'oxymonades et de parabasaliens a été étudiée séparément pour les pools d'ouvriers et les alates individuels. Les analyses statistiques réalisées sur le jeu de données des ouvriers ont montré que la structure des communautés oxymonades et parabasaliennes variait significativement entre les deux populations (Table 8 haut, Figure 36A-B). Dans les alates, la structure des communautés oxymonades et parabasaliennes variait significativement entre populations, entre haplotypes et entre colonies

(Table 8 bas, Figure 36C-D). Ces analyses de la variance ont mis en avant de manière intéressante une interaction significative entre les facteurs 'colonie' et 'sexe', suggérant que la structure des communautés de protistes pourrait varier entre les sexes en fonction des colonies (Table 8, Figure 36C-D). Un tel effet avait déjà été montré entre les femelles et mâles ouvriers de colonies de *R. speratus* (Inagaki & Matsuura, 2016).

Table 8 : Analyse multivariée de la variance des modèles linéaires généralisés appropriés aux communautés de protistes.

		Oxymonads			Parabasalids		
Response variable	Explanatory variables	Df	Deviance	p-value	Df	Deviance	p-value
Structure in workers							
	Population	1	412.5	**0.001** ***	1	119.2	**0.001** ***
	Haplotype	1	42.6	0.982	1	37.1	0.161
	Population x Haplotype	1	87.1	**0.049** *	1	28.1	0.341
Structure in alates							
	Population	1	3353	**0.001** ***	1	1258.9	**0.001** ***
	Sex	1	83	0.085	1	13.8	0.997
	Haplotype	1	383	**0.001** ***	1	350.4	**0.001** ***
	Population x Haplotype	1	354	**0.001** ***	1	161.7	**0.001** ***
	Sex x Haplotype	1	96	**0.006** **	1	14.5	0.995
	Colony	23	15034	**0.001** ***	23	12193	**0.001** ***
	Sex	1	128	**0.001** ***	1	55	**0.004** **
	Colony x Sex	23	2208	**0.001** ***	23	959	**0.001** ***

Les p-values significatives sont en gras.

2.1.1. Variation des communautés de protistes entre les colonies

La composition de la communauté de protistes d'une colonie a été estimée par la somme de tous les OTUs détectés dans le pool d'ouvriers et les 14 alates individuels étudiés pour la colonie donnée. Contre toute attente, les résultats ont révélé que chacune des 24 colonies possédait une communauté unique d'OTUs différant au moins par un OTU (Figure 37A). Cependant, 57 OTUs oxymonades sur les 67 (85.1 %) et 19 OTUs parabasaliens sur les 31 (61.2 %) étaient partagés par au moins 95 % des colonies (voir *Supporting information Table S4* de l'article 1 pour plus de détails). De plus, la variation des communautés de protistes entre colonies disparaissait presque complétement lorsque les analyses de clusterisation étaient menées au niveau des espèces (Figure 37B). Au total, 21 colonies sur les 24 étudiées (87.5 %)

hébergeaient toutes les espèces de protistes détectées dans cette étude (sept espèces d'oxymonades et six espèces de parabasaliens). Les trois exceptions ont été observées dans des colonies provenant de Pissos. En effet, l'oxymonade *Dinenympha fimbriata* n'a pas été détecté dans la colonie 18B22, et les parabasaliens *Trichonympha* TgA et Trichomonadidae genre A n'ont pas été détectés dans les colonies 18B25 et 18B32, respectivement (Figure 37B).

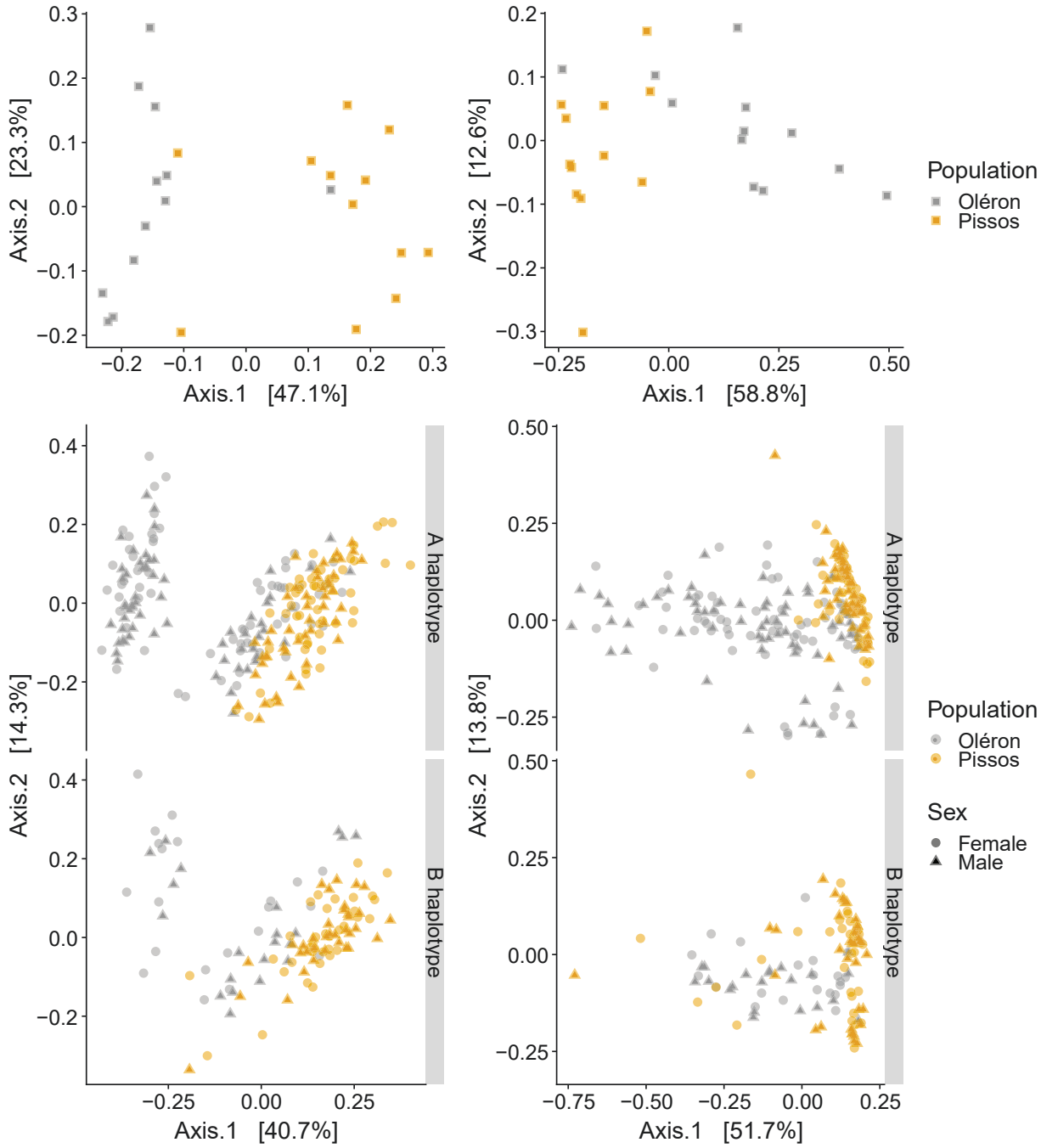


Figure 36 : Analyse en coordonnées principales de la structure des communautés oxymonades et parabasaliennes des ouvriers (A et B) et des alates (C et D). Les analyses ont été réalisées avec une matrice de dissimilarité de Bray-Curtis.

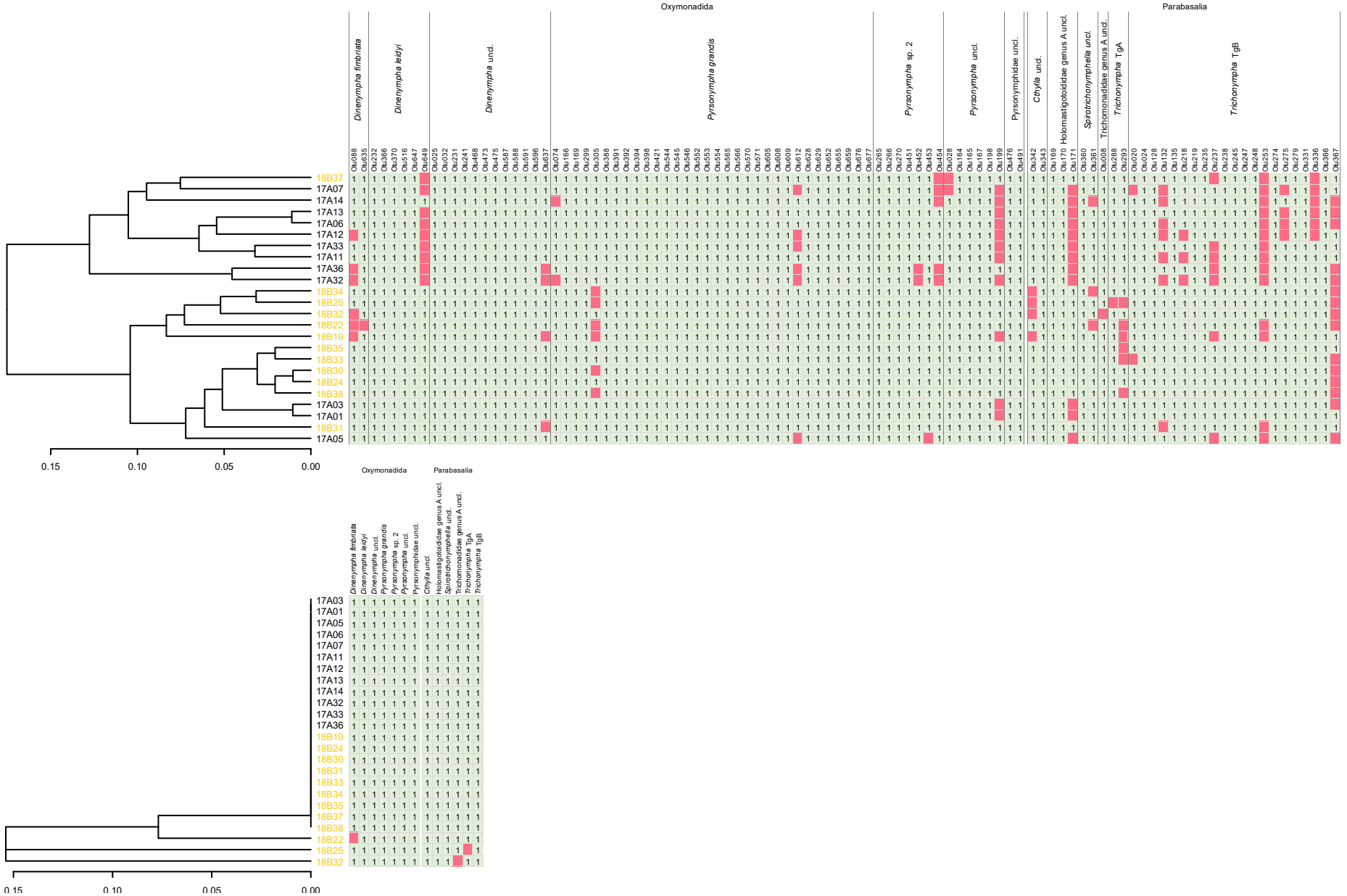


Figure 37 : Clusterisation hiérarchique des colonies en fonction de leur communauté en OTUs de protistes (A) et en espèces de protistes (B). Les communautés sont basées sur la présence (vert) ou l'absence (rouge) des OTUs (A) ou des espèces (B) dans chaque colonie. Les colonies d'Oléron sont en noir, celles de Pissos en orange. Uncl. : non classifiés.

2.1.2. Détection et quantification des protistes du genre *Trichonympha* par PCR quantitative

L'étude de la composition des communautés de protistes a révélé plusieurs cas où un taxon détecté dans les alates d'une colonie ne l'a pas été dans le pool d'ouvriers de la même colonie (aucun *read* assigné). Par exemple, dans quatre colonies de Pissos (18B19, 18B22, 18B33 et 18B35), *Trichonympha* TgA n'a pas été détecté dans le pool d'ouvriers, mais l'a été dans un ou deux alates. Afin de valider ou non l'absence des *Trichonympha* TgA dans les ouvriers, une approche de PCRq a été développée pour détecter et quantifier les deux espèces de *Trichonympha* dans 18 ouvriers individuels pour quatre colonies. La présence de *Trichonympha* TgA a été testée chez des ouvriers provenant de deux colonies (18B33 et 18B35) pour lesquelles l'approche métabarcoding n'a pas permis de détecter de *Trichonympha* TgA dans le pool d'ouvriers. Les résultats des PCRq ont montré la présence de *Trichonympha* TgA dans 17 ouvriers sur 18 pour les deux colonies testées (Figure 38, colonies 'B1' et B2'). Les résultats obtenus dans ces deux colonies ont également été comparés avec ceux de deux autres colonies (18B30 et 18B34) pour lesquelles l'approche métabarcoding avait permis de détecter *Trichonympha* TgA dans les pools d'ouvriers (Figure 38). La proportion de *Trichonympha* TgA était significativement plus faible que la proportion en *Trichonympha* TgB dans les individus provenant des quatre colonies ($V=3$, $p<10^{-13}$) (Figure 38). Les résultats ont également montré que la proportion de *Trichonympha* TgA dans les individus des colonies 18B30 et 18B34 ('AB1' et 'AB2') était significativement plus élevée que dans les individus provenant des colonies 18B33 et 18B35 ('B1' et 'B2') ($W=110$, $p<10^{-10}$) (Figure 38).

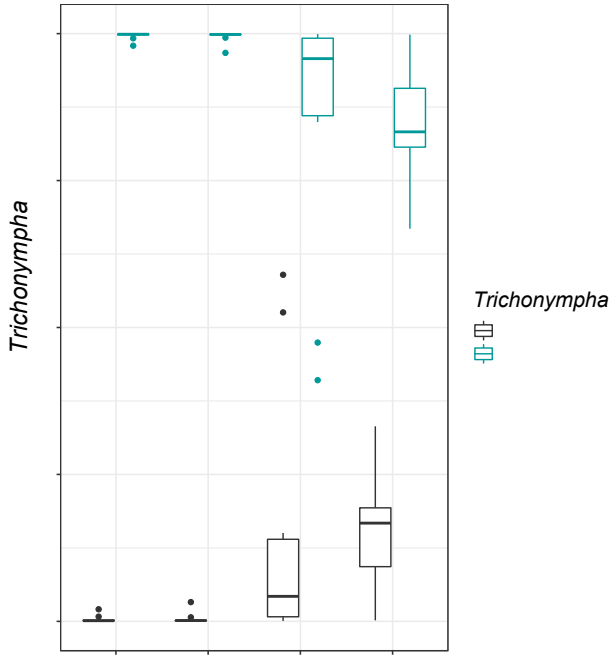


Figure 38 : Proportion en *Trichonympha* TgA et TgB dans les ouvriers individuels par approche de PCR quantitative. 'B1' et 'B2' font référence aux colonies 18B33 et 18B35, respectivement, où seul *Trichonympha* TgB a été détecté dans les pools d'ouvriers par métabarcoding. 'AB1' et 'AB2' font référence aux colonies 18B30 et 18B34, respectivement, pour lesquelles les deux espèces de *Trichonympha* ont été détectées par métabarcoding.

2.2. Estimation du taux de transmission des protistes

2.2.1. Valeurs α des OTUs par colonie

Les valeurs de la composante α de la transmission verticale (*i.e.*, probabilité α) ont tout d'abord été étudiées à l'échelle des colonies. Dans un premier temps, nous avons évalué les valeurs α des OTUs de protistes par sexe, c'est-à-dire que pour un OTU donné dans une colonie, nous avons estimé sa fréquence parmi les sept alates femelles et les sept alates mâles de la colonie. Les valeurs α des OTUs par colonie et par sexe variaient entre 0 et 1. Nous avons ensuite évalué la proportion d'OTUs de la colonie en fonction de leur fréquence dans les alates. Cette analyse a permis de montrer que le sexe des alates n'avait significativement pas d'effet sur les valeurs α par colonie (Table 9). De plus, en prenant en compte l'identité de chaque OTU, les valeurs α étaient significativement différentes entre les OTUs ($F_{(97,4302)}$=26.36 ; $p<10^{-15}$) mais ne différaient pas entre le sexe des alates ($F_{(1,4302)}$=1.95 ; p=0.16), indiquant que, qualitativement, les femelles et les mâles d'une même colonie parentale essaimaient avec des communautés intestinales de protistes similaires. Dans un deuxième temps, les valeurs α ont

donc été estimées sur l'ensemble des 14 alates par colonie. Le pourcentage d'OTUs oxymonades montrant un taux de transmission parfait (α=1) variait de 26.6 à 56.3 % par colonie, alors que pour les parabasaliens ces pourcentages variaient de 26.7 à 82.1 % par colonie (Figure 39).

Table 9 : Analyse de la variance du modèle linéaire mixte approprié au pourcentage d'OTUs oxymonades et parabasaliens d'une colonie dans les alates.

		Oxymonads				Parabasalids			
Response variable	Explanatory variables	F	Df	Df. Res	Pr(>F)	F	Df	Df. Res	Pr(>F)
Percentage of OTUs									
	Population	4.9966	1	21.10	**0.03634** *	0.8957	1	20.61	0.3549
	α value	602.727	1	337.58	**< 2.2e-16** ***	100.2418	1	267.58	**<2e-16** ***
	Sex	1.7079	1	331.50	0.19217	0.9763	1	257.06	3.24E-01
	Haplotype	0.0812	1	20.53	0.77857	0.11	1	21.91	0.7433
	Population x α value	16.2293	1	338.74	**6.93E-05** ***	0.4272	1	268.41	0.5139

Les p-values significatives sont en gras.

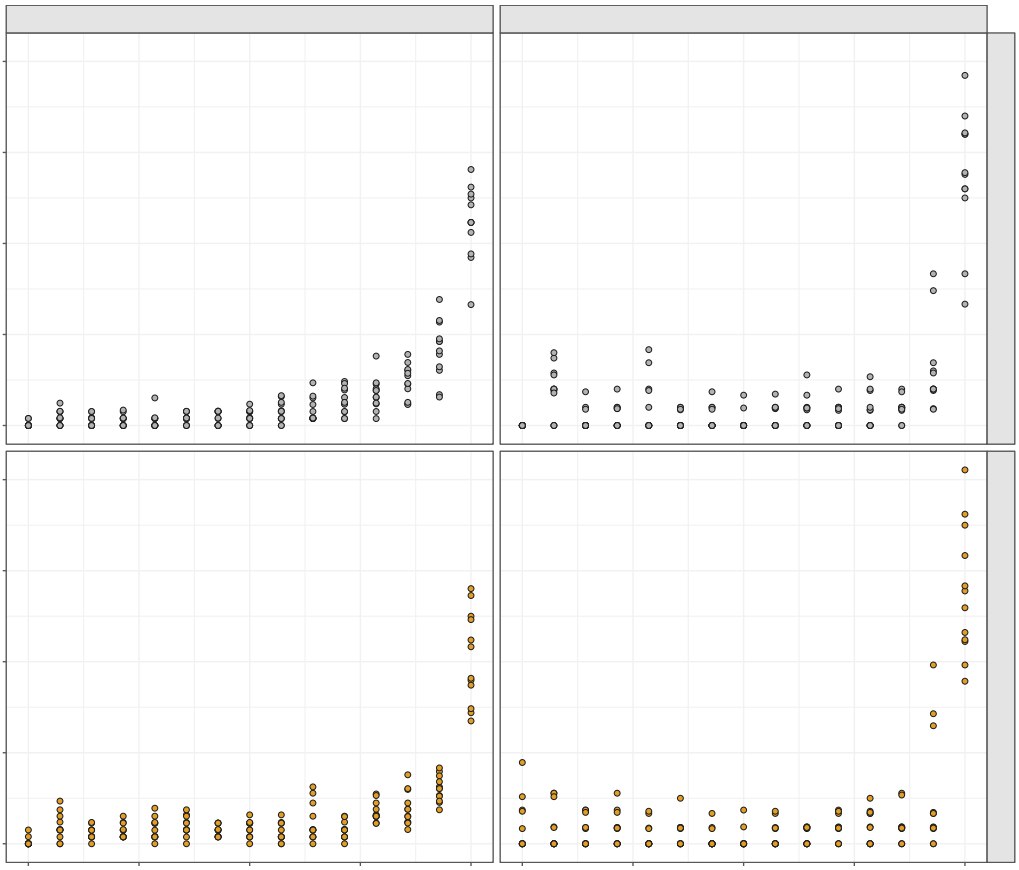


Figure 39 : Pourcentage d'OTUs de la colonie présents dans les 14 alates en fonction des valeurs α. Les valeurs α ont été estimées sur l'ensemble des 14 alates de la colonie.

2.2.1. Relation entre valeurs α et abondance relative

Il est intéressant de noter que les OTUs avec une valeur α de 1 (*i.e.*, 100% présents dans les alates) semblaient relativement plus abondants dans les alates (plus de 80 % de l'abondance relative de la communauté) et les ouvriers (plus de 50 % de l'abondance relative) que les OTUs avec une valeur α inférieure à 1 (Figure 40). Ces résultats doivent être interprétés précautionneusement car ils ont été estimés en fonction du nombre de *reads* par OTU et il peut exister certains biais liés à la méthodologie (Lamb *et al.*, 2019).

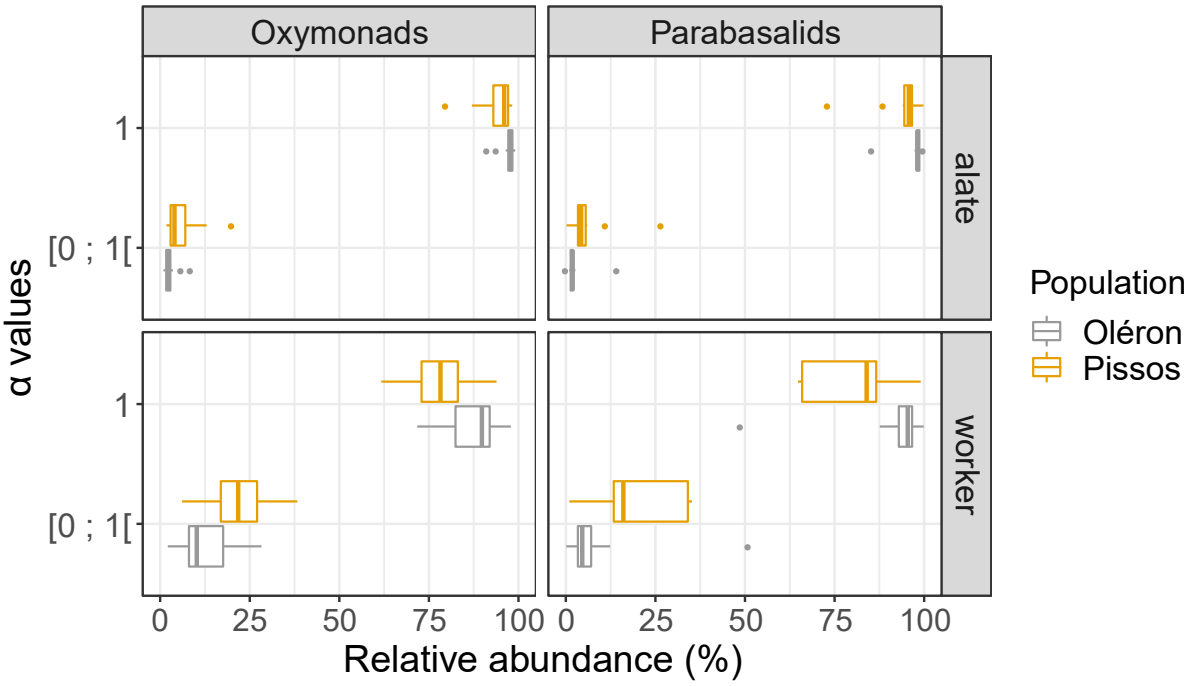


Figure 40 : Valeurs α des OTUs en fonction de leur abondance relative dans les alates et les ouvriers.

2.2.2. Valeurs α moyennes des protistes par population

Les OTUs avec une valeur α de 1 n'étaient pas nécessairement les mêmes entre les différentes colonies. Pour pouvoir les étudier à l'échelle des populations, les valeurs α de chaque OTU ont donc été moyennées au sein des populations entre les colonies possédant l'OTU donné. Ces valeurs α moyennes ont été calculées par sexe et pour les deux sexes confondus (voir *Supporting information Table S6* de l'article pour le détail des valeurs α moyennes de chaque OTU par sexe et les deux sexes confondus). Les valeurs α moyennes n'étaient significativement pas différentes entre les sexes (données non montrées). Les résultats ont montré que les valeurs α moyennes pour les deux sexes confondus présentaient de fortes

variations entre les OTUs (Figure 41). Le pourcentage d'OTUs présentant un parfait taux de transmission entre toutes les colonies d'Oléron ou de Pissos était relativement faible à la fois pour les oxymonades et pour les parabasaliens (entre 13 et 16 %) (Figure 41). Par contre, tous les OTUs détectés dans une population étaient présents dans au moins un alate de cette population, aucune valeur α moyenne n'était de 0 (Figure 41). Les OTUs présentaient des valeurs α moyennes comprises entre 0.071 et 1 pour les oxymonades et entre 0.155 et 1 pour les parabasaliens (Figure 41).

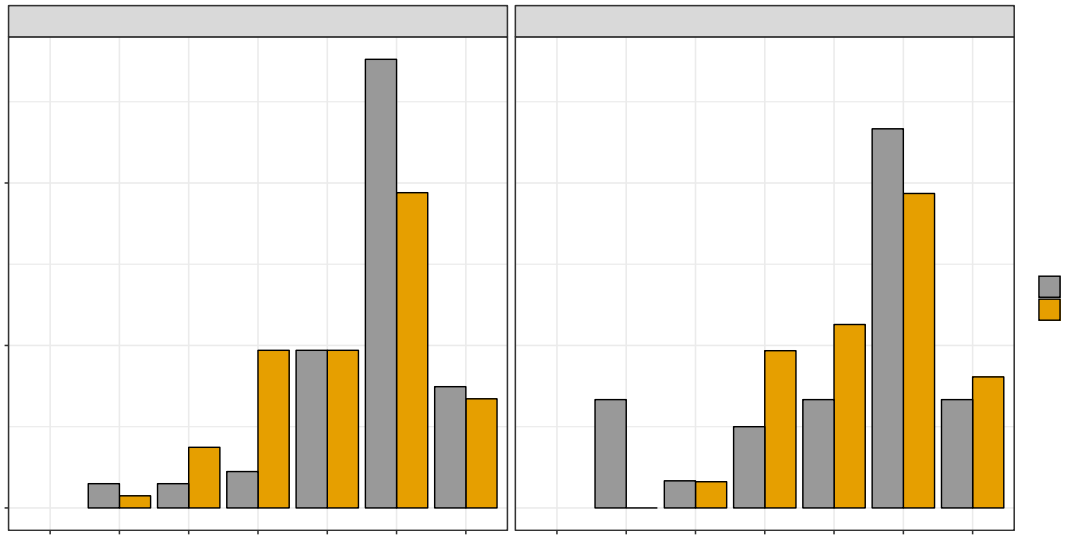


Figure 41 : Pourcentage d'OTUs de la population présents dans les alates en fonction des valeurs α moyennes. Les valeurs α moyennes ont été estimées sur l'ensemble des alates de la population.

Enfin, nous avons estimé les valeurs α moyennes au niveau taxonomique des espèces de protistes. Pour une espèce de protiste donnée, nous avons donc estimé sa fréquence parmi les alates de la population, par sexe et les deux sexes confondus (Table 10 et *Supporting information Table S6* de l'article 1). Ces valeurs α présentaient une variation entre les espèces, allant de 0.416 pour *Trichonympha* TgA dans la population de Pissos à 1 pour six espèces dont une de parabasalien (*Trichonympha* TgB) et cinq d'oxymonades (*Dinenympha leidyi*, *Dinenympha* non classifié, *Pyrsonympha grandis*, *Pyrsonympha* sp. 2 et *Pyrsonympha* non classifié) (Table 10). Ces résultats ont également montré que les valeurs α moyennes des espèces de protistes étaient significativement plus faibles dans la population de Pissos que celle d'Oléron (V=45 ; p=0.003).

Table 10 : Valeurs α moyennes, prévalences observées (p_o) et prévalences théoriques (p_e) des espèces de protistes dans les populations.

	Oléron			Pissos		
	α	p_o	p_e	α	p_o	p_e
Oxymonadida						
Dinenympha leidyi	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Pyrsonympha grandis	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Pyrsonympha sp. 2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Dinenympha unclassified	1.000	1.000	1.000	0.994	1.000	1.000
Pyrsonympha unclassified	1.000	1.000	1.000	0.994	1.000	1.000
Pyrsonymphidae unclassified	0.970	1.000	0.999	0.899	1.000	0.990
Dinenympha fimbriata	0.810	1.000	0.964	0.662	0.917	0.846
Parabasalia						
Trichonympha TgB	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Holomastigotoididae genus A unclassified	0.988	1.000	1.000	0.976	1.000	0.999
Spirotrichonymphella unclassified	0.982	1.000	1.000	0.738	1.000	0.931
Trichomonadidae genus A unclassified	0.893	1.000	0.989	0.623	0.917	0.816
Cthylla unclassified	0.863	1.000	0.981	0.554	1.000	0.801
Trichonympha TgA	0.958	1.000	0.998	0.416	0.917	0.617

2.3. Relation entre taux de transmission et prévalence des protistes dans les populations

Les prévalences observées (p_o) des OTUs ont été obtenues à partir des communautés en protistes des différentes colonies dans les populations (voir *Supporting information Table S4* de l'article 1). Les résultats d'une analyse en deux temps suggéraient que les valeurs α moyennes des OTUs représentaient un facteur pertinent expliquant les prévalences observées de ces OTUs dans les populations. En effet, la première partie d'analyse a montré que les valeurs α moyennes dans les OTUs fixés dans la population (p_o=1) étaient significativement plus grandes que celles des autres OTUs (p_o<1) (Table 11, Figure 42A). La seconde partie d'analyse sur les OTUs avec une prévalence inférieure à 1 a montré une corrélation positive avec leur prévalence dans les populations (Table 11, Figure 42B). Ces analyses avaient également mis en évidence un effet 'population' pour les OTUs oxymonades, mais aucun effet 'sexe' n'a été montré pour les deux jeux de données (Table 11).

Table 11 : Analyse de la variance des modèles binomial (p_o=1 vs p_o<1) et linéaire (p_o<1 uniquement) appropriés à la prévalence observée (p_o) des OTUs de protistes dans les populations.

		Oxymonads				Parabasalids			
Response variable	Explanatory variables	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
p_o=1 vs p_o<1									
	Mean α values	61.571	1	81.0948	**<2.2e-16** ***	73.99	1	88.315	**4.12E-16** ***
	Sex	0.064	1	0.0841	0.772057	0.002	1	0.0023	0.962
	Population	5.403	1	7.1168	**0.008109** **	0.322	1	0.3841	0.5366
	(Residuals)	200.443	264			102.211	122		
Only p_o<1									
	Mean α values	1.34742	1	50.0405	**5.05E-08** ***	0.67218	1	12.0363	**0.001371** **
	Sex	0.00007	1	0.0025	0.9605	0.00131	1	0.0234	0.879236
	Population	0.53899	1	20.0172	**9.10E-05** ***	0.05103	1	0.9138	0.345489
	(Residuals)	0.86165	32			2.01046	36		

Les p-values significatives sont en gras.

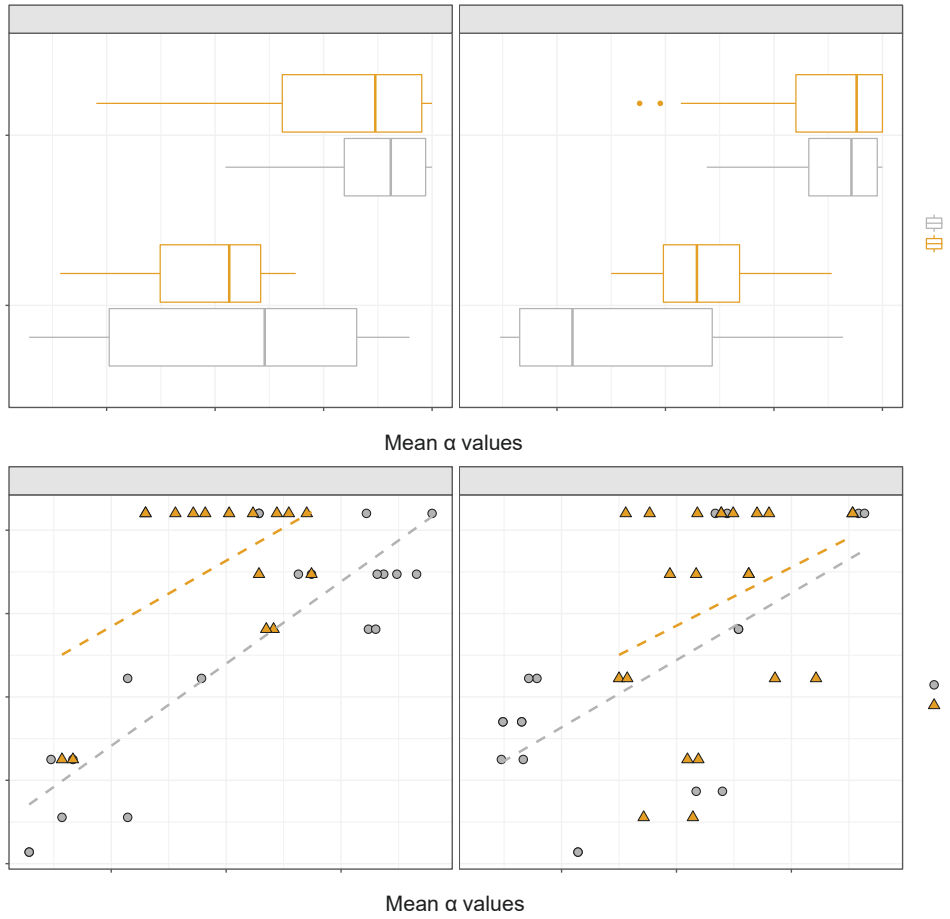


Figure 42 : Prévalence observée (p_o) des OTUs de protistes dans les populations en fonction de leur valeur α moyenne. (A) Les OTUs 100% prévalents *versus* les OTUs partiellement prévalents dans la population. (B) Les OTUs partiellement prévalents dans la population uniquement.

Une seconde analyse a été menée afin de tester l'hypothèse selon laquelle le taux de transmission d'un symbiote est un facteur majeur expliquant sa prévalence dans les populations en développant un modèle simple de génétique des populations. Les valeurs des prévalences théoriques des espèces de protistes (p_e) ont été calculées et comparées aux valeurs de prévalence observées (p_o) dans les populations d'Oléron et de Pissos (Table 10). Le modèle respecte trois hypothèses principales : (i) le système d'appariement dans la population est considéré panmictique (*i.e.*, la composition du microbiote n'affecte pas le choix de partenaire), (ii) il n'y a pas de sélection relative au microbiote intestinal (*i.e.*, la composition du microbiote n'affecte pas le succès reproducteur des alates ou la survie des colonies nouvellement fondées), et (iii) l'efficacité de la deuxième composante de transmission β est considérée identique entre les alates quelle que soit la composition de leur microbiote. Dans une population, la valeur de prévalence théorique (p_e) pour une espèce donnée a été calculée de la façon suivante :

$$p_e = 1 - [(1 - p_o) + p_o(1 - \alpha)]^2$$

où $[(1 - p_o) + p_o(1 - \alpha)]^2$ représente la probabilité que le couple formé par la reine et le roi fondant une colonie ne porte pas le taxon de protiste, avec '$1 - p_o$' représentant la probabilité qu'un alate ne porte pas le taxon en question car il n'est pas présent dans sa colonie parentale, et avec '$p_o(1 - \alpha)$' représentant la probabilité qu'un alate ne porte pas le taxon de protiste dû à une première composante de transmission imparfaite. Les analyses sur toutes les espèces en même temps ont montré que les valeurs de la prévalence observée étaient significativement plus élevées que celles attendues par le modèle à Oléron ($V=28$; $p=0.016$) comme à Pissos ($V=45$; $p=0.004$) (Table 10).

3. Discussion

3.1. Diversité de protistes chez *Reticulitermes grassei*

Cette étude a permis dans un premier temps d'apporter de nouvelles connaissances quant à la diversité des communautés symbiotiques dans les intestins du termite souterrain *R. grassei*. Deux études avaient déjà amorcé l'analyse de la diversité parabasalienne chez les termites (Tai *et al.*, 2015 ; Waidele *et al.*, 2017). Cependant, à notre connaissance, aucune étude de métabarcoding n'avait encore été menée sur les oxymonades de termites, certainement parce qu'il est difficile de cibler l'ensemble ou une grande partie des oxymonades avec les amorces préexistantes (Heiss & Keeling, 2006).

Notre étude a révélé une forte diversité d'OTUs oxymonades (67) qui ont été assignés aux deux genres décrits chez les termites du genre *Reticulitermes* : *Dinenympha* et *Pyrsonympha* (Duarte, Nunes, *et al*., 2017 ; Kitade & Matsumoto, 1998 ; Lewis & Forschler, 2004 ; Shimada *et al*., 2013 ; Stingl & Brune, 2003 ; Yamin, 1979). Pour les protistes parabasaliens, la richesse en OTUs obtenue (31) était comparable à celle d'une étude précédente menée notamment sur *R. grassei* (Waidele *et al*., 2017). Comme les études de métabarcoding menées chez les termites Rhinotermitidae, tous les genres de parabasaliens n'ont pas été détectés (Jasso-Selles *et al*., 2017 ; Tai *et al*., 2015 ; Waidele *et al*., 2017). Parmi les huit genres connus chez *R. grassei*, cinq ont été détectés dans cette étude (Brugerolle & Bordereau, 2006 ; Duarte, Nunes, *et al*., 2017 ; James, Tai, Scheffrahn, & Keeling, 2013 ; Kitade & Matsumoto, 1998 ; Waidele *et al*., 2017 ; Yamin, 1979). Même si tous les genres de protistes n'ont pas été détectés, ceux connus pour avoir un rôle majeur dans la digestion de l'hôte chez les *Reticulitermes* l'ont été (*Trichonympha*, *Pyrsonympha* et *Dinenympha*) (Inoue, Murashima, Azuma, Sugimoto, & Slaytor, 1997). Il serait intéressant d'utiliser d'autres outils moléculaires tels que la technique de clonage/séquençage pour étudier la diversité en espèce d'oxymonades et de parabasaliens chez les termites du genre *Reticulitermes* qui semblerait cryptique et mériterait plus d'attention.

3.2. Efficacité de la transmission verticale des protistes

3.2.1. Une transmission verticale efficace mais incomplète

Cette étude est, à notre connaissance, la première à tenter d'estimer les taux de transmission verticale des symbiotes chez une espèce de termite. Diouf *et al*. (2018) avaient récemment caractérisé la communauté bactérienne vivant dans les intestins d'alates n'ayant pas encore essaimés du termite supérieur *Nasutitermes arborum* (Termitidae). Cependant, cette précédente étude n'a pas apporté d'information sur l'efficacité de transmission des bactéries intestinales, principalement parce que les intestins des alates n'ont pas été étudiés individuellement mais ont été poolés en un seul échantillon. De plus, une seule colonie a été étudiée, ne donnant pas d'information sur la potentielle variabilité au sein d'une population (Diouf *et al*., 2018). Notre étude s'est focalisée sur la composante α de transmission des symbiotes, c'est-à-dire la probabilité qu'un symbiote présent dans une colonie le soit également dans un alate essaimant de cette colonie.

D'une manière générale, les valeurs α estimées pour les protistes étaient plutôt élevées. Par exemple, les valeurs α estimées de 10 espèces de protistes sur les 13 détectées lors de cette études (77 %) étaient supérieures à 0.95 dans la population d'Oléron (Table 10). Quatre espèces de protistes étaient présentes dans tous les alates essaimants des deux populations (*D. leidyi*, *P. grandis*, *Pyrsonympha* sp. 2 et *Trichonympha* TgB). Des *Dinenympha* et *Pyrsonympha* non classifiés étaient également présents dans tous les alates d'Oléron et les autres espèces de protistes présentaient des valeurs α de plus de 0.9 dans cette population. Dans la population de Pissos, les valeurs α estimées semblaient moins efficaces avec quatre espèces de protistes (*Cthylla*, *Spirotrichonymphella*, Trichononadidae genre A et *Trichonympha* TgA) présents dans moins de 75 % des alates. En moyenne, les espèces de protistes présentaient une valeur α de 0.959 dans la population d'Oléron et de 0.835 dans celle de Pissos. Aucune espèce de protiste n'a montré une valeur α de 0, elles étaient toutes présentes dans au moins quelques alates de la population. Il est important de souligner que la composition des communautés de protistes ne différait pas significativement entre les alates femelles et les alates mâles, ce qui a permis d'estimer les valeurs α des protistes par leur fréquence parmi les 14 alates (les 7 femelles et les 7 mâles) étudiés par colonie. La transmission des protistes dans les alates semblaient assez importante bien qu'incomplète pour l'ensemble des protistes. Les protistes circulants dans les colonies de *R. grassei* avaient une forte chance d'être présents dans les alates essaimants avant le vol nuptial.

3.2.2. Sous-estimation de l'efficacité de transmission ?

Il est possible que les valeurs α aient été sous-estimées à cause de la limite de détection de l'approche de métabarcoding (Coissac, Riaz, & Puillandre, 2012 ; Hatzenbuhler, Kelly, Martinson, Okum, & Pilgrim, 2017 ; Makiola *et al*., 2019 ; Port *et al*., 2016). En effet, les résultats de PCRq menés sur les protistes du genre *Trichonympha* ont démontré la présence de *Trichonympha* TgA dans les ouvriers individuels de colonies pour lesquelles la méthode de séquençage à haut-débit n'a assigné aucun *read* à cette espèce dans le pool d'ouvriers. Ces résultats ont montré que l'abondance relative de *Trichonympha* TgA était très faible dans ces échantillons (Figure 38), suggérant que l'approche de métabarcoding ne permet pas la détection de certains OTUs, probablement parce que leur abondance relative à l'origine dans les échantillons était en dessous du seuil de détection (Lamb *et al*., 2019). Une telle explication est également supportée par les analyses ayant mis en avant une relation positive entre les fréquences des OTUs de protistes dans les alates (valeur α) et leur abondance relative dans les

ouvriers et les alates (Figure 40, Figure 47). En effet, les OTUs (ou espèces) les plus abondants ont plus de chance d'être détectés que ceux avec de base une abondance faible. Il est donc possible que la composante α de transmission verticale ait été sous-estimée et soit plus élevée que ce que nos estimations ont suggéré, notamment pour les symbiotes avec une abondance relative faible dans les hôtes. Des analyses complémentaires pourraient être menées pour vérifier cette hypothèse.

Il serait notamment intéressant de conduire une approche de PCRq sur les alates individuels pour affiner les mesures des valeurs α. Nous avons essayé de développer cette approche pour détecter et quantifier les *Trichonympha* TgA et TgB dans des alates (données non montrées). Cependant, la mise au point n'a pas été concluante, nous avons rencontré des problèmes d'interférence que nous n'avons pas réussi à résoudre mais qui pourrait l'être par la suite. L'idéal serait de mettre au point un protocole suffisamment sensible pour permettre la détection d'une seule cellule de *Trichonympha* pour être sûr de ne pas rater leur présence même en faible quantité.

3.2.3. Biparentalité de la transmission

Il est largement admis que la transmission verticale des symbiotes intestinaux chez les termites inférieurs est réalisée à la fois par la reine et par le roi (*i.e.*, transmission biparentale), alors que la contribution respective des deux parents à la communauté intestinale microbienne des descendants reste inconnue. Nos analyses n'ont pas permis de détecter un effet clair du sexe sur les valeurs α estimées. Tout d'abord, les résultats ont montré que, globalement dans une même population, les alates femelles et mâles avaient une structure identique des communautés de protistes (Table 8). Les analyses sur la structure des communautés de protistes menées à l'échelle coloniale ont, quant à elles, mis en évidence un effet du sexe dépendant de la colonie (Table 8), ce qui pourrait montrer des différences dans la physiologie ou le comportement entre les femelles et les mâles qui affecteraient les abondances relatives de protistes comme cela a déjà été proposé pour les ouvriers de *R. speratus* (Inagaki & Matsuura, 2016). Néanmoins, nos résultats ont également mis en avant que les valeurs α estimées pour chaque OTU n'étaient pas significativement différentes entre les deux sexes, les femelles et les mâles essaimeraient avec une communauté de protistes très similaire en termes de composition dans les populations. Ainsi, les deux parents pourraient qualitativement apporter les mêmes protistes à leurs descendants. Les rois de *R. speratus* portent quantitativement plus de protistes que les reines, et ce tout au cours de la fondation des colonies (Shimada *et al*., 2013). Cependant, en même

temps, les reines procurent des trophallaxies proctodéales plus nombreuses et plus longues à leurs larves que ne le font les rois (Brossette *et al*., 2019). Ces trophallaxies maternelles fréquentes et longues pourraient compenser un fluide moins riche en quantité de protistes que celui des rois. Ensemble, ces résultats semblent montrer que les futurs reines et rois peuvent contribuer de manière équitable au pool symbiotique de leurs descendants.

3.3. Relation entre efficacité de transmission et prévalence des protistes dans les populations

Nos résultats ont révélé que la composition des communautés intestinales de protistes variait énormément entre les colonies de *R. grassei* entre et au sein des populations. En effet, nos résultats ont montré que chaque colonie de termites portait une communauté unique dans les populations d'Oléron et de Pissos pour les OTUs de protistes. Une fois de plus, il est possible que ces variations soient dues à la limite de détection de l'approche de métabarcoding. Cependant, cette limite méthodologique seule ne semble pas expliquer certaines valeurs de prévalence obtenues. Ce paramètre a en effet été mesuré par l'occurrence des OTUs dans chaque colonie, basée elle-même sur les résultats obtenus de 15 échantillons distincts (*i.e.*, 14 alates individuels et un pool de 10 ouvriers). La probabilité qu'un OTU de protiste présent dans une colonie ne soit pas détecté dans les 15 échantillons préparés indépendamment peut sembler faible. Chaque colonie présentait un assemblage unique d'OTUs oxymonades et parabasaliens. Cependant, lorsque les OTUs apparentés étaient regroupés au niveau taxonomique de l'espèce, la variation observée de composition de communautés entre les colonies était drastiquement réduite, les 13 espèces de protistes détectées lors de cette étude étaient présentes dans au moins 95 % des colonies et cet assemblage complet caractérisait la communauté de protistes de 21 colonies sur les 24 étudiées. Récemment, Waidele et collaborateurs (2017) ont montré de la variation intraspécifique dans les communautés intestinales de bactéries et de protistes de cinq espèces de termites inférieurs, incluant *R. grassei*. Ensemble, ces résultats mettent en avant que la variation intraspécifique des communautés intestinales symbiotiques des termites inférieurs semblerait plus commune que ce qui était pensé avant, notamment pour les OTUs de protistes (Inoue *et al*., 2000 ; Yamin, 1979).

Des facteurs génétiques et environnementaux voire microenvironnementaux pourraient expliquer cette variation observée (Dietrich *et al*., 2014 ; Duarte, Duarte, *et al*., 2017 ; Mikaelyan, Dietrich, *et al*., 2015 ; Tai *et al*., 2015 ; Waidele *et al*., 2017). Nous ne pouvons pas exclure l'effet de ces facteurs sur la composition des communautés de protistes. Cependant,

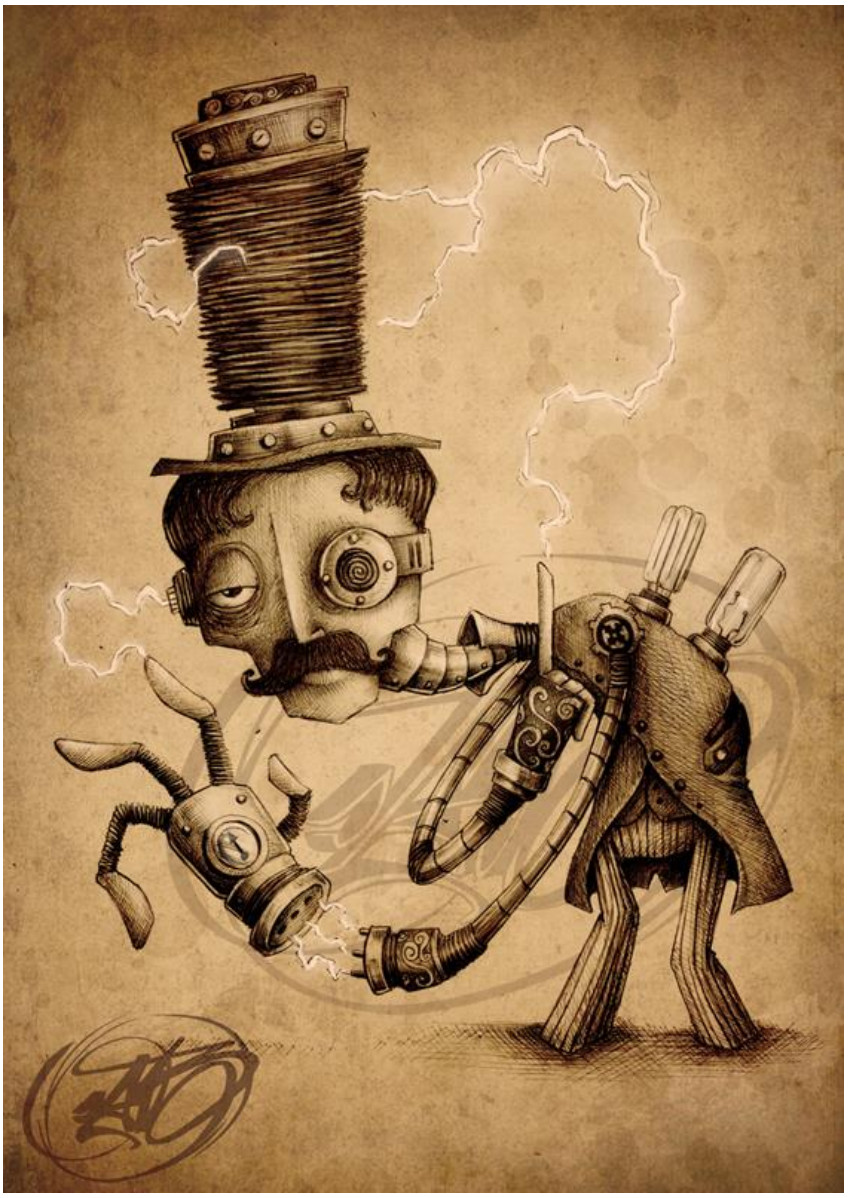
dans la mesure du possible, nous avons échantillonné les différentes colonies de termites dans des environnements homogènes et sur une même source de nourriture, le pin maritime. Nos résultats ont montré un effet de l'haplotype mitochondrial (A ou B) sur la structure des communautés de protistes dans les deux populations, mais nous n'avons pas trouvé un pattern clair de ce facteur (Figure 36). L'étude de marqueurs microsatellites de ces colonies pourraient permettre de mettre en avant un effet génétique hôte sur ces variations de composition.

Nos résultats ont suggéré que la transmission imparfaite des protistes pourrait constituer une cause majeure de la variation de composition des communautés de protistes entre les colonies au sein des populations. Le taux de transmission de certains OTUs de protistes est en effet imparfait ($\alpha<1$) voire même faible pour certains ($\alpha<0.5$). Comme discuté précédemment, ces taux de transmission ont pu être sous-estimés à cause des limites de l'approche utilisée. Mais il semblerait que des transmissions imparfaites de protistes existent et peuvent même être un phénomène récurrent dans les populations de *Reticulitermes* (Lewis & Forschler, 2004). Si une transmission imparfaite des symbiotes est réellement un facteur expliquant la variation intraspécifique de composition des microbiotes intestinaux dans les populations de *R. grassei*, une relation positive est attendue entre les valeurs de prévalence des OTUs et leur taux de transmission. Le pattern observé dans notre étude est raccord avec cette prédiction, nous avons en effet détecté une relation positive et significative entre les valeurs de prévalence et de transmission des OTUs de protistes, les OTUs les moins prévalents dans les deux populations étudiées étaient également les OTUs avec les valeurs α les plus faibles. Nous avons alors testé l'hypothèse selon laquelle le taux de transmission à lui seul est un facteur suffisant pour prédire la prévalence des protistes dans les populations. Pour cela, nous avons construit un modèle simple de génétique des populations. Les résultats des analyses indiquent que notre modèle sous-estime la prévalence des espèces de protistes dans les deux populations. Différentes raisons peuvent expliquer ces sous-estimations. Tout d'abord, il pourrait s'agir d'un décalage d'estimation de la présence des protistes dans les alates (niveau individuel donc estimation sur un échantillon) et dans les colonies (estimation sur les 15 échantillons de la colonie). Les sous-estimations pourraient également être d'ordre biologique comme de la sélection négative ou encore un choix de partenaire sexuel en fonction de la composition de son microbiote. Ces hypothèses seront évoquées plus en détails dans la discussion générale.

Chapitre VII :

Étude 3

Estimation de la composante α du taux de transmission des bactéries



© Paride Bertolin (JAB) 2013

1. Introduction

Le chapitre précédent a porté sur l'estimation de la composante α de transmission verticale des protistes intestinaux du termite *R. grassei*. Dans cette troisième étude, nous avons souhaité évaluer cette même composante de transmission pour les bactéries symbiotiques chez ce termite.

Les objectifs de cette étude étaient d'étudier la variation intraspécifique des communautés bactériennes intestinales de *R. grassei* puis de savoir si, au moment de l'essaimage, les alates partaient de leur colonie parentale avec le pool symbiotique disponible dans celle-ci, et si cette composante de transmission était un facteur expliquant les prévalences bactériennes dans les populations hôtes.

Pour répondre à ces questions, nous avons séquencé à haut-débit le gène ribosomal 16S bactérien des intestins individuels d'alates et des intestins poolés d'ouvriers de 24 colonies de *R. grassei* collectées dans deux populations françaises situées à Oléron et à Pissos (voir la carte de collecte en Figure 34 page 128 dans le chapitre précédent). Nous avons séquencé les mêmes échantillons que ceux utilisés pour l'étude 2, c'est-à-dire 15 échantillons par colonie comprenant sept alates femelles, sept alates mâles et un pool de 10 ouvriers, à l'exception d'une colonie (17A01) pour laquelle seuls quatre alates femelles et quatre alates mâles ont été séquencés en raison de mauvaises amplifications ADN. Au total, 330 alates individuels et 24 pools d'ouvriers ont été séquencés en 16S bactérien.

2. Résultats

Les données obtenues sur les bactéries donneront lieu à un deuxième article. Cependant, des analyses sont toujours en cours, le manuscrit de l'article n'est donc pas présenté dans cette thèse.

2.1. Caractérisation des communautés bactériennes

2.1.1. Assignation taxonomique des bactéries

Après le traitement bioinformatique du jeu de données bactérien, 2 164 827 séquences ont été obtenues dont l'analyse de MED a permis d'obtenir un total de 1 060 OTUs. Cette

diversité obtenue est supérieure à de précédentes études, mais la méthode d'obtention des OTUs n'est pas la même (un clustering avec un seuil de 3 % est généralement utilisé) et la taille de notre échantillonnage était plus importante (Abdul Rahman *et al*., 2015 ; Benjamino & Graf, 2016 ; Dietrich *et al*., 2014 ; Mikaelyan, Dietrich, *et al*., 2015 ; Waidele *et al*., 2017). Le nombre de séquences par OTU variait de 15 à 630 028 avec une moyenne de 2 042 séquences par OTU. Ces OTUs ont été assignés à 15 phyla bactériens (plus un non classifié) dont les plus abondants étaient les Proteobacteria, les Bacteroidetes, les Firmicutes, les Elusimicrobia, et les Spirochaetes qui représentaient 91.2 % du jeu de séquences total (Figure 43A). Ces résultats d'assignation taxonomique et d'abondance relative étaient parfaitement en accord avec les précédentes études menées sur les communautés bactériennes de *Reticulitermes* (Abdul Rahman *et al*., 2015 ; Benjamino & Graf, 2016 ; Dietrich *et al*., 2014 ; Mikaelyan, Dietrich, *et al*., 2015 ; Waidele *et al*., 2017). Ensemble, ces taxa bactériens présentent toutes les fonctions métaboliques nécessaires à la dégradation de la lignocellulose et la nutrition des termites, même si le rôle exact des différentes lignées de bactéries reste peu ou pas connu (Table 12).

Table 12 : Grandes fonctions métaboliques assurées par les phyla bactériens.

Functions	Bacterial taxa
Aceto.	Firmicutes, Spirochaetes
Biosynth. aa&cofact.	Elusimicrobia
Ferm. sugar&nitro.	Bacteroidetes
N_2 fixation	Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Spirochaetes
Polymer deg.	Actinobacteria
Sugar deg.	Firmicutes
Sulf. red.	Proteobacteria
Uric acid deg.	Bacteroidetes

Aceto. : acétogénèse. Biosynth. aa&cofact. : biosynthèse d'acides aminés et cofacteurs. Ferm. : fermentation. Nitro. : azote. Deg. : dégradation. Sulf. red. : réduction du soufre.

Les Proteobacteria comportaient 22 familles, les Bacteroidetes en comportaient 16 et les Firmicutes 17. Pour chacun de ces trois phyla, seules quatre familles représentaient plus de 90 % du phylum (Figure 43B-D). Les 36 OTUs du phylum Elusimicrobia ont été assignés au genre *Candidatus Endomicrobium* de la famille des Endomicrobiaceae. Les bactéries du phylum Spirochaetes ont été assignées à neuf genres, la quasi-totalité de ce jeu de données était représentée par des bactéries du genre *Treponema* du cluster I ou II (Figure 43E). Les autres phyla du jeu de données bactérien étaient les bactéries non classifiées, les Epsilonbacteraeota

et les Actinobacteria qui représentaient 7.9 % du jeu de données, et les Fusobacteria (5 OTUs), les Ptescibacteria (8 OTUs), les Synergistetes (3 OTUs), les Planctomycetes (2 OTUs), les Margulisbacteria (4 OTUs), les Tenericutes (4 OTUs), les Verrucomicrobia (1 OTU) et les Deferribacteres (1 OTU) qui ne représentaient que 0.9 % du jeu de données (Figure 43A). Pour plus de détails sur l'assignation des OTUs, voir le *Supporting information Table S1*.

Chez les termites inférieurs, de nombreuses bactéries sont en symbioses secondaires avec les protistes présents dans les intestins (Berchtold *et al*., 1999 ; Dolan, 2001 ; Lee *et al*., 1987 ; Noda *et al*., 2009 ; Ohkuma, 2008 ; Sato *et al*., 2009 ; Stingl *et al*., 2005 ; Strassert *et al*., 2010). Dans cette étude, la diversité bactérienne a été étudiée à partir des mêmes échantillons que pour le chapitre précédent portant sur les protistes, nous avons donc souhaité savoir si les communautés de bactéries et de protistes étaient corrélées au sein des individus. Des tests de Mantel ont alors été réalisés entre les jeux de données bactérien et oxymonade et entre les jeux de données bactérien et parabasalien. Ces tests ont montré une corrélation positive entre les bactéries et les protistes présents dans un même échantillon (oxymonades : r=0.192 ; p=0.001, parabasaliens : r=0.180 ; p=0.001).

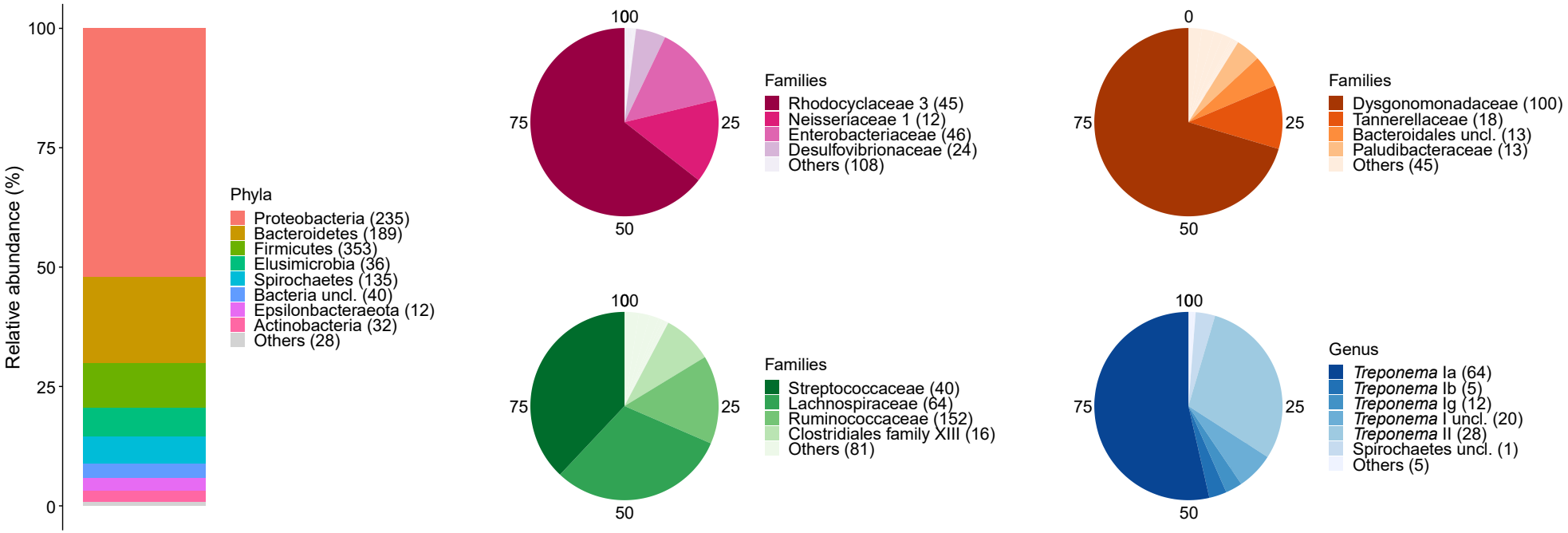


Figure 43 : Assignation taxonomique et abondance relative des séquences bactériennes. Résultats d'assignation des taxa bactériens sur l'ensemble du jeu de données (A) et pour quatre des phyla les plus abondants (B-E). Les nombres entre parenthèses représentent le nombre d'OTUs correspondant assignés aux taxa. Uncl. : non classifié.

2.1.2. Richesse des communautés bactériennes

La richesse observée (*i.e.*, le nombre d'OTUs) en bactéries des échantillons a été étudiée dans les pools d'ouvriers puis dans les alates individuels pour savoir si elle était influencée par la population d'appartenance des échantillons, par le génotype mitochondrial des colonies basé sur le séquençage du COII et, pour les alates, par la colonie et par le sexe des individus. En moyenne, 310 OTUs ont été détectés dans les pools d'ouvriers. Le nombre d'OTUs présents dans les ouvriers n'était pas significativement différent entre les deux populations ($F_{(1,21)}$=0.407 ; p=0.530) ni entre les deux haplotypes mitochondriaux ($F_{(1,21)}$=0.378 ; p=0.545). La richesse bactérienne observée dans les alates était significativement plus élevée dans ceux d'Oléron que de Pissos ($F_{(1,21)}$=5.480 ; p=0.029) et significativement plus faible dans les femelles que dans les mâles ($F_{(1,305)}$=7.103 ; p=0.008) (Figure 44). Cependant, l'haplotype mitochondrial ne présentait pas d'effet significatif sur cette richesse ($F_{(1,21)}$=0.025 ; 0.876). Ces résultats semblaient indiquer que, globalement, l'haplotype des colonies n'impactait pas la richesse observée en bactérie, mais que celle-ci variait entre sexe et population pour les alates.

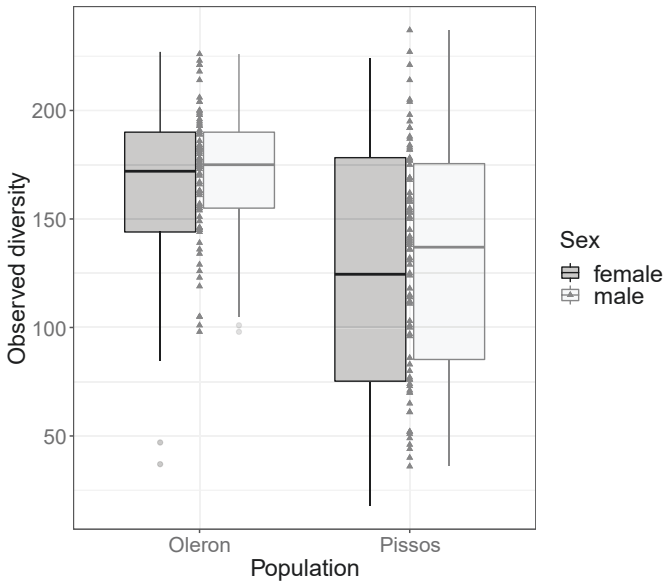


Figure 44 : Richesse bactérienne observée dans les alates femelles et mâles des deux populations.

2.1.3. Structure des communautés bactériennes

Les structures des communautés bactériennes, c'est-à-dire leur composition en OTUs en prenant en compte l'abondance relative des OTUs, ont été analysées pour savoir quels

facteurs les influençaient. Ces analyses ont été faites séparément pour les pools d'ouvriers et les alates. Les résultats ont montré des effets complexes des interactions entre les différents facteurs (Table 13) bien que, visuellement, aucun pattern clair n'a été détecté (Figure 45). Les résultats sur les pools d'ouvriers ont montré un effet significatif de l'interaction entre l'haplotype mitochondrial et la population (Table 13 haut, Figure 45A). Dans les alates, la structure des communautés bactériennes est significativement expliquée par des interactions complexes entre la population hôte, l'haplotype mitochondrial et le sexe des individus, ainsi que par l'interaction entre la colonie et le sexe des individus (Table 13 bas, Figure 45B). Ces analyses semblaient donc montrer que la structure bactérienne des échantillons dépendait de la colonie voire de la population hôte, et qu'elle pouvait changer en fonction de l'haplotype et du sexe des individus. Cependant, nous ne sommes pas en mesure de tirer des conclusions claires de ces résultats, la structure des communautés bactériennes varie énormément entre les échantillons.

Table 13 : Analyse multivariée de la déviance des modèles linéaires généralisés appropriés aux communautés bactériennes.

Response variable	Explanatory variables	Df	Deviance	p-value
Structure in workers				
	Population	1	2898.4	**0.001** ***
	Haplotype	1	1123.5	**0.001** ***
	Population x Haplotype	1	853.5	**0.001** ***
Structure in alates				
	Population	1	10844	**0.001** ***
	Sex	1	3774	**0.001** ***
	Haplotype	1	2193	**0.001** ***
	Population x Sex	1	3011	**0.001** ***
	Population x Haplotype	1	1562	**0.001** ***
	Sex x Haplotype	1	2123	**0.001** ***
	Population x Sex x Haplotype	1	1387	**0.001** ***
	Colony	23	51564	**0.001** ***
	Sex	1	4334	**0.001** ***
	Colony x Sex	23	39268	**0.001** ***

Les p-values significatives sont en gras.

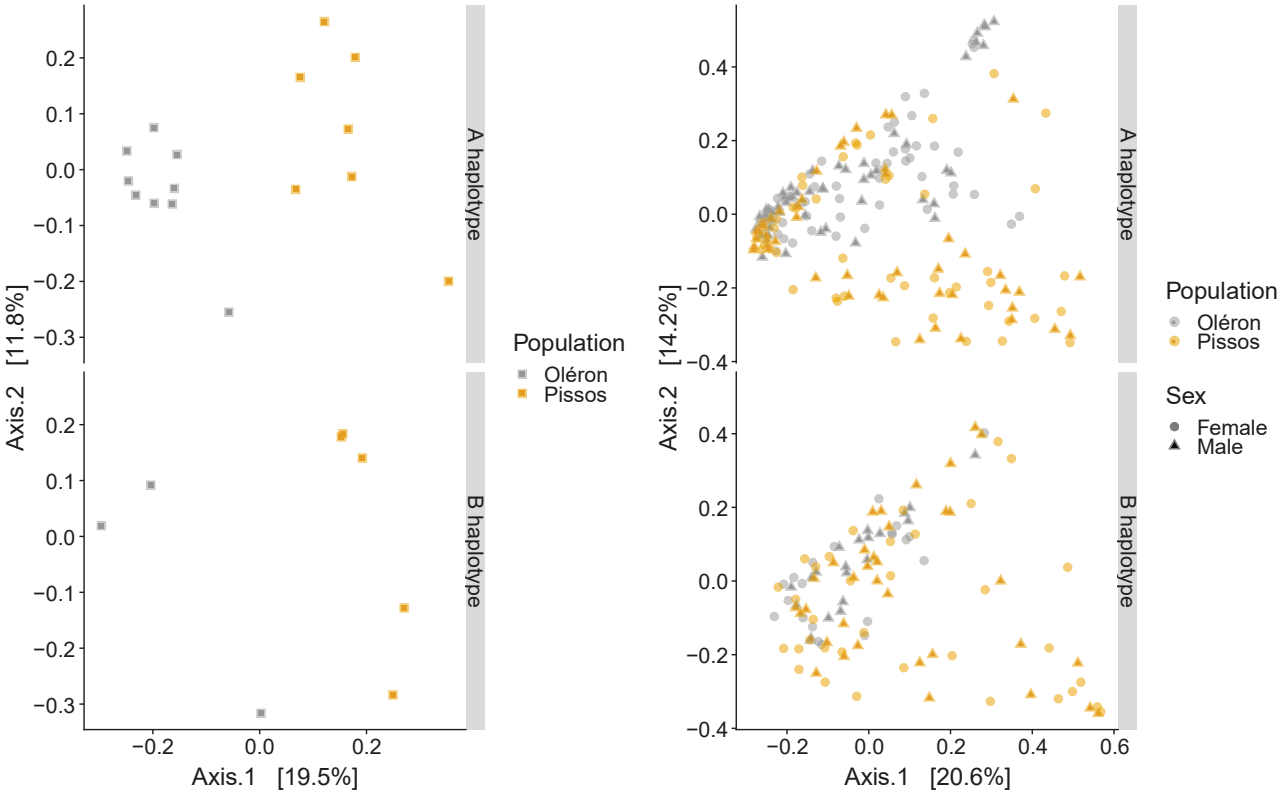


Figure 45 : Analyse en coordonnées principales de la structure des communautés bactériennes des ouvriers (A) et des alates (B). Les analyses ont été réalisées avec une matrice de dissimilarité de Bray-Curtis.

2.1.4. Variation des communautés bactériennes entre les colonies

Sur les 1 060 OTUs bactériens détectés dans cette étude, 781 étaient communs aux deux populations, 110 OTUs étaient exclusifs à la population d'Oléron et 169 étaient exclusifs à la population de Pissos. La composition de la communauté bactérienne d'une colonie prend en compte les occurrences des OTUs détectés dans le pool d'ouvriers et les 14 alates individuels de la colonie donnée. Les communautés bactériennes des 24 colonies ont été analysées, chaque colonie présentait une composition propre. Le nombre d'OTUs composant les communautés bactériennes des colonies variaient de 299 à 641 avec une moyenne de 495 OTUs. Les compositions bactériennes des 24 colonies et la prévalence observée des OTUs dans les deux populations sont présentées dans le *Supporting information Table S2*.

Le core bactérien du termite *R. grassei* a ensuite été étudié, il est représenté par les OTUs présents dans au moins 95 % des colonies. Quatre-vingt-huit OTUs bactériens étaient présents dans au moins 95 % des 24 colonies et représentaient donc le core bactérien de l'espèce (Table

14). Les colonies présentaient donc des OTUs bactériens permettant la dégradation du bois et leur nutrition (Table 12 page 152).

Table 14 : Taxonomie des 88 OTUs composant le core bactérien des populations de *Reticulitermes grassei*.

Phylum	Class	Order	Family	Genus	OTU	Group
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetales Incertae Sedis	*Candidatus* Ancillula	Otu2454	Termite specific
	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Coriobacteriales Incertae Sedis	uncultured	Otu0931, Otu0932, Otu2233, Otu2240, Otu2241, Otu2738, Otu2740	Others
		unclassified			Otu1384	Others
Bacteria unclassified					Otu1498	Others
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Dysgonomonadaceae	*Candidatus* Armantifilum	Otu0657, Otu2086	Termite specific
				Candidatus Symbiothrix	Otu2048	Termite specific
				unclassified	Otu0282, Otu0661	Others
			M2PB4-65 termite group		Otu2010	Termite specific
			p-2534-18B5 gut group		Otu0868	Others
			Paludibacteraceae	uncultured	Otu2037, Otu2039	Others
			Rikenellaceae	*Alistipes*	Otu1930	Others
				BCf9-17 termite group	Otu1956	Termite specific
			Rs-E47 termite group		Otu0658	Termite specific
			Tannerellaceae	*Candidatus* Vestibaculum	Otu0591, Otu1977, Otu2009, Otu2687	Termite specific
			unclassified		Otu0988	Others
Elusimicrobia	Endomicrobia	Endomicrobiales	Endomicrobiaceae	*Candidatus* Endomicrobium	Otu1130, Otu1214, Otu2379	Termite specific
Epsilonbacteraeota	Campylobacteria	Campylobacterales	Rs-M59 termite group		Otu1800, Otu1802	Termite specific
			Sulfurospirillaceae	*Sulfurospirillum*	Otu0464	Others
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiales vadinBB60 group		Otu0311	Others
			Family XIII		Otu0935, Otu1924, Otu2574	Termite specific
			Lachnospiraceae	unclassified	Otu1889	Others
			Ruminococcaceae	*Candidatus* Soleaferrea	Otu0471, Otu1876	Others
				Ruminococcaceae Gut cluster 4	Otu0025	Others
				unclassified	Otu0485	Others
			unclassified		Otu1501	Others
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Magnetospirillaceae	*Telmatospirillum*	Otu0493	Others
		Rickettsiales	uncultured		Otu2646	Others
	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	*Desulfovibrio*	Otu0073, Otu0105, Otu0725, Otu0726, Otu1593	Others
				unclassified	Otu0545, Otu1711	Others
		Rs-K70 termite group			Otu1091, Otu1309	Termite specific
	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	*Oxalobacteraceae*	Otu0843	Others
			Rhodocyclaceae	*Propionivibrio*	Otu0372, Otu0374, Otu0377, Otu1700, Otu1703	Others
				Rhodocyclaceae 3 Termite cluster	Otu0077, Otu0083, Otu0216, Otu0290, Otu0349, Otu0350, Otu0834, Otu1047, Otu1344, Otu1667, Otu1668, Otu1914, Otu2585, Otu2668,	Termite specific
Spirochaetes	Spirochaetia	Spirochaetales	Spirochaetaceae	*Spirochaeta*	Otu0403	Others
				Treponema I unclassified	Otu2432	Termite specific
				Treponema Ia	Otu1313, Otu1429, Otu1484, Otu2362, Otu2364, Otu2427, Otu2495, Otu2511, Otu2512, Otu2783	Termite specific
				Treponema Ig	Otu1258	Termite specific
				Treponema II	Otu0907	Termite specific

Termite specific : OTU dont l'assignation taxonomique a permis l'identification de bactéries spécifiques aux intestins de termites et blattes subsociales.

Others : OTU dont l'assignation taxonomique n'a pas permis de les classer parmi les bactéries spécifiques aux intestins de termites.

Les OTUs ont ensuite été classés en deux groupes en fonction de leur assignation taxonomique : (i) le groupe I désignant les OTUs appartenant à des taxa spécifiques aux intestins de termites et de blattes et (ii) le groupe II désignant les autres OTUs qui peuvent être spécifiques à des environnements particuliers comme les intestins d'arthropodes ou d'animaux en général, ou qui peuvent être généralistes et retrouvés dans l'environnement comme dans le sol, le bois mort ou encore l'humus.

2.2. Estimation du taux de transmission des bactéries

2.2.1. Valeurs α des OTUs par colonie

Les valeurs de la composante α du taux de transmission ont d'abord été estimées par colonie. Pour chaque OTU présent dans une colonie, sa fréquence a été estimée parmi les alates femelles et parmi les alates mâles. Les valeurs α variaient de 0 à 1 dans les deux populations. Nous avons ensuite évalué la proportion d'OTUs du groupe I (ou II) de la colonie en fonction de leur fréquence dans les alates femelles et mâles de cette colonie, soit la proportion des OTUs du groupe I (ou II) de la colonie présents dans les sept individus par sexe, la proportion de ceux présents dans six individus par sexe, jusqu'à la proportion des OTUs du groupe I (ou II) détectés seulement dans le pool d'ouvriers de la colonie. En moyenne, dans la population d'Oléron, tous les alates d'une colonie portaient 11.9 % des OTUs du groupe I et 6.4 % des OTUs du groupe II de la colonie (Figure 46). A Pissos, ces chiffres étaient de 7.5 % et 5.0 %, respectivement (Figure 46). Ces résultats ont également montré qu'en moyenne à Oléron, 25.1 % des OTUs du groupe I et 39.6 % des OTUs du groupe II de la colonie n'étaient présents dans aucun alate mais uniquement dans les ouvriers (Figure 46). Dans la population de Pissos, 31.3 % des OTUs du groupe I et 46.0 % des OTUs du groupe II de la colonie étaient absents des alates (Figure 46). La transmission ne semblait donc globalement pas très efficace pour la plupart des OTUs, et le nombre d'OTUs avec une valeur α de 1 (*i.e.*, présents dans toutes les femelles ou tous les mâles d'une colonie) était relativement faible.

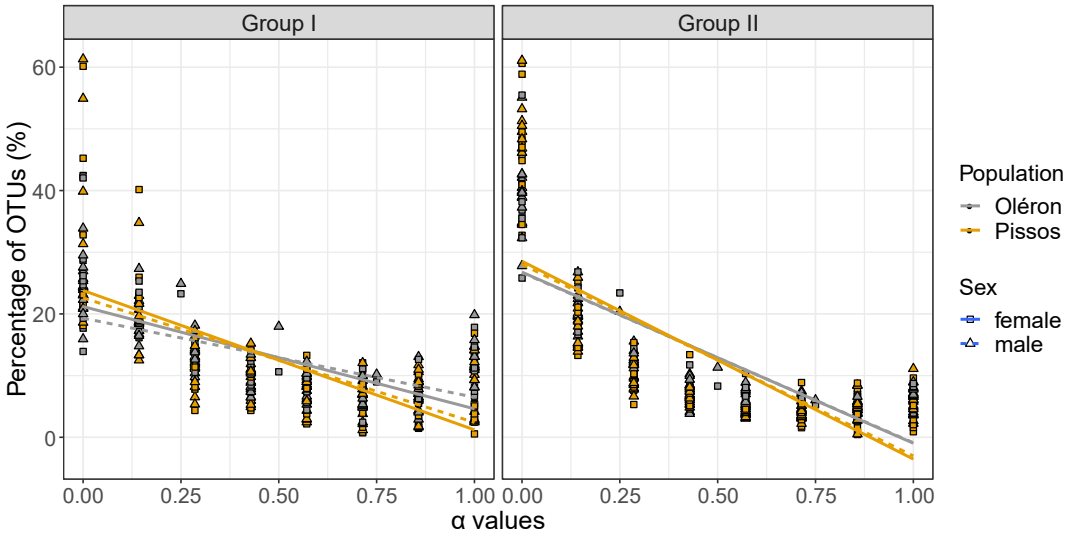


Figure 46 : Pourcentage d'OTUs bactériens de la colonie présents dans les alates en fonction des valeurs α. Les valeurs α ont été estimées par sexe par colonie. Une correction log(x+0.1) a été réalisée sur les données pour les tests statistiques, les régressions linéaires ne représentent donc pas celles adaptées aux statistiques mais cette ▶

◄ représentation a été choisie car plus explicite. Les groupes I et II représentent les OTUs spécifiques aux intestins de termites et les autres OTUs.

Les analyses statistiques ont révélé des effets significatifs des interactions entre différents facteurs expliquant la proportion d'OTUs de la colonie dans les alates femelles et mâles (Table 15). La proportion d'OTUs de la colonie présents dans les mâles était en moyenne plus élevée que celle des OTUs de la colonie présents dans les femelles, et ce dans les deux populations (Table 15, Figure 46). Les OTUs du groupe I étaient plus fréquents dans les alates que ceux du groupe II (Table 15, Figure 46). Une plus grande proportion d'OTUs de la colonie était portée par les alates d'Oléron que ceux de Pissos (Table 15, Figure 46).

Table 15 : Analyse de la variance du modèle linéaire mixte approprié au pourcentage d'OTUs bactériens par colonie présents dans les alates.

Response variable	Explanatory variables	F	Df	Df. Res	Pr(>F)	
Percentage of OTUs						
	Population	6.8298	1	20.93	**0.01626**	*
	α value	1163.859	1	726.01	**< 2.2e-16**	***
	Sex	0.7305	1	726.01	0.393	
	Haplotype	0.0175	1	20.83	0.89599	
	OTU group	20.9972	1	726.01	**5.414E-06**	***
	α value x OTU group	46.246	1	726.01	**2.18E-11**	***
	Sex x α value	4.4761	1	726.01	**0.03471**	*
	Populaton x α value	21.4169	1	726.01	**4.376E-06**	***

Les p-values significatives sont en gras.

2.2.2. Relation entre valeurs α et abondance relative

Même si les OTUs de groupes I et II confondus présents dans tous les alates femelles ou dans tous les alates mâles représentaient moins de 15 % des pool bactériens coloniaux, ils représentaient 61.6 % de l'abondance relative dans les intestins d'alates d'Oléron et 57.2 % de l'abondance relative dans ceux de Pissos (Figure 47 haut). Il est intéressant de noter que les OTUs de groupe I avec une valeur α de 1 avaient une abondance relative plus importante dans les intestins d'alates que les autres (Figure 47 haut). Ces résultats suggèrent que les OTUs bactériens spécifiques aux intestins de termites transmis dans tous les alates formeraient la plus grande partie de la communauté bactérienne des alates.

Les OTUs présents dans tous les alates d'une colonie ne représentaient que 26.9 % en moyenne de l'abondance relative des communautés bactériennes chez les ouvriers, les deux

populations confondues (Figure 47 bas). Une grande partie de l'abondance relative des communautés bactériennes des ouvriers est composée d'OTUs bactériens de groupe II peu ou pas présents dans les alates (Figure 47 bas droit). Ceci va dans le sens des résultats trouvés pour les valeurs α : une grande partie des OTUs de la colonie n'étaient portés que par les ouvriers, ils représentent une grande partie de la communauté intestinale de cette caste et seraient, pour la majorité, non spécifiques aux intestins de termites.

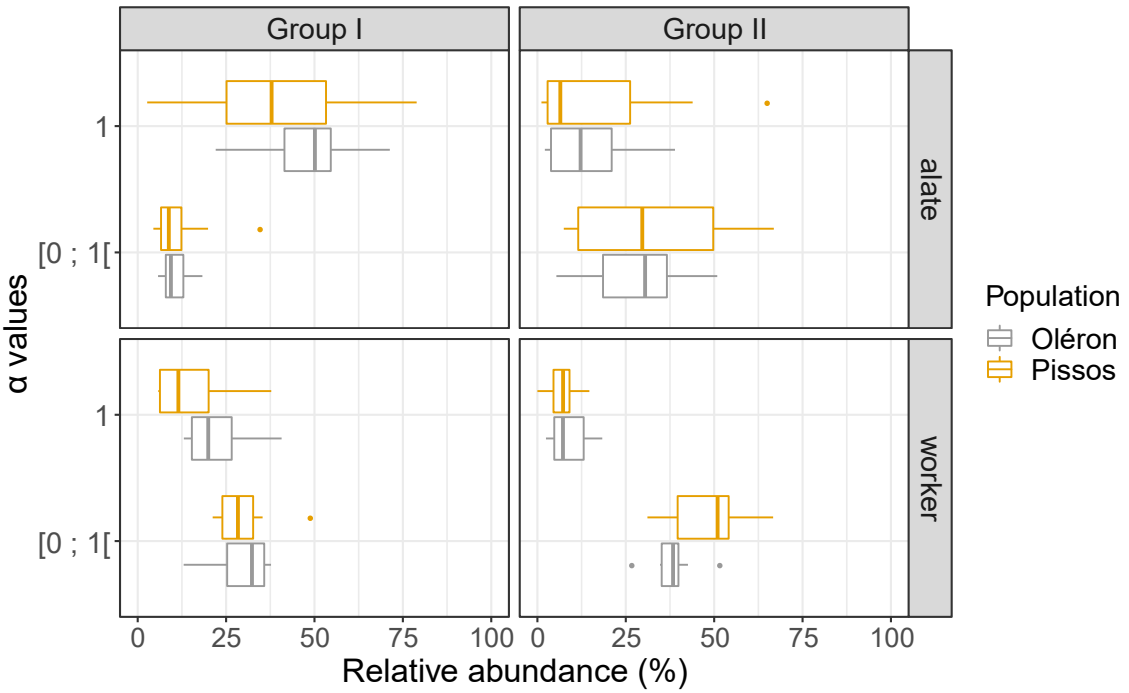


Figure 47 : Abondance relative des OTUs bactériens dans les alates et les ouvriers en fonction de leur valeur α. Les groupes I et II représentent les OTUs spécifiques aux intestins de termites et les autres OTUs.

2.2.3. Valeurs α moyennes des OTUs par population

Toutes les colonies ne portaient pas toujours les mêmes OTUs. Pour pouvoir les étudier à l'échelle des populations de termites, les valeurs α d'un OTU donné ont été moyennées par population entre les colonies portant l'OTU en question. Comme un effet sexe a été détecté sur les valeurs α, leurs moyennes ont été estimées par sexe. Ces valeurs α moyennes variaient de 0 à 1 dans les deux populations de termites, avec une moyenne de 0.249 à Oléron et de 0.217 à Pissos. Très peu d'OTUs présentaient une valeur α moyenne de 1, ils représentaient 0.10 à 0.42 % du nombre total d'OTUs dans les deux populations (Figure 48). Ils étaient aux nombres de trois dans les femelles d'Oléron (Otu1214 : Elusimicrobia, groupe I, core bactérien ; Otu0349 : Proteobacteria, groupe I, core bactérien ; Otu1604 : Proteobacteria, groupe II), de

quatre dans les mâles d'Oléron (Otu1214 : Elusimicrobia, groupe I, core bactérien ; Otu1604 : Proteobacteria, groupe II ; Otu0932 : Actinobacteria, groupe II, core bactérien ; Otu0657 : Bacteroidetes, groupe I, core bactérien), d'un dans les femelles de Pissos (Otu2180 : Firmicutes, groupe II) et de quatre dans les mâles de Pissos (Otu2180 : Firmicutes, groupe II ; Otu1214 : Elusimicrobia, groupe I, core bactérien ; Otu0349 : Proteobacteria, groupe I, core bactérien ; Otu0085 : Proteobacteria, groupe II). Même en prenant les OTUs présents dans au moins 90 % des individus femelles ou mâles de la population, ils ne représentaient que 6.9 à 12.7 % des OTUs de la population (Figure 48).

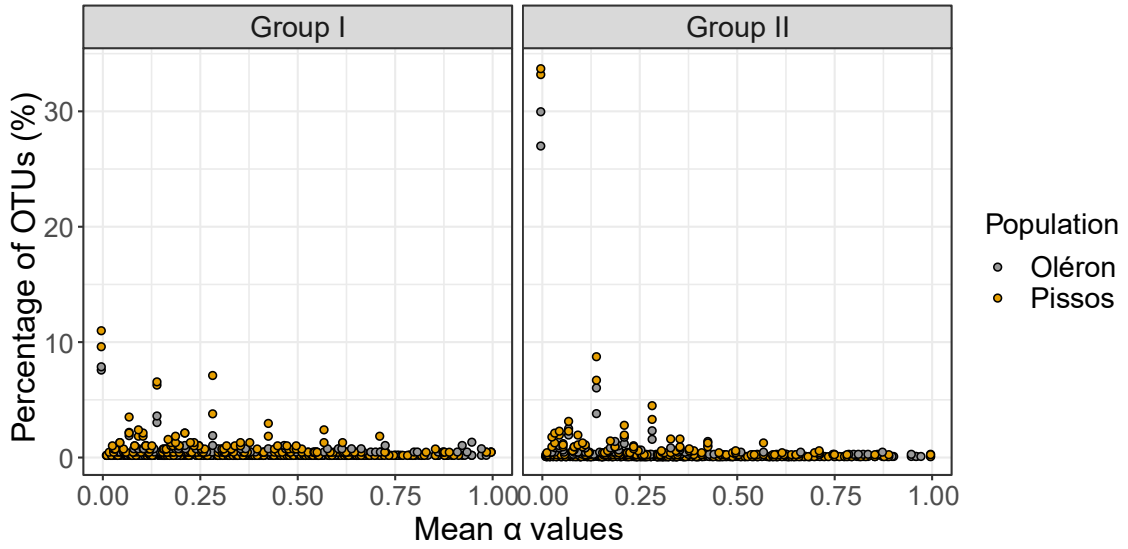


Figure 48 : Pourcentage d'OTUs bactériens de la population présents dans les alates en fonction de leur valeur α moyenne. Les valeurs α moyennes ont été estimées par sexe par population pour chaque OTU. Les groupes I et II représentent les OTUs spécifiques aux intestins de termites et les autres OTUs.

Les analyses statistiques menées pour mieux comprendre les facteurs influençant le pourcentage d'OTUs dans les alates ont montré un effet significatif de l'interaction entre la population hôte et les valeurs α moyennes et de l'interaction entre les valeurs α moyennes et le groupe des OTUs (I ou II), mais pas du sexe des alates (Table 16). Cette relation serait négative, les OTUs étaient globalement mieux transmis dans les alates d'Oléron que ceux de Pissos (Figure 48). Cependant, des informations sont certainement manquantes pour comprendre la variation observée.

Table 16 : Analyse de la variance du modèle linéaire généralisé adapté au pourcentage d'OTUs bactériens de la population présents dans les alates.

Response variable	Explanatory variables	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
Percentage of OTUs						
	Population	4.804	1	34.8928	**4.38E-09**	***
	Sex	0.028	1	0.2034	0.652101	
	Mean α value	10.641	1	77.2948	**<2.20E-16**	***
	OTU group	14.149	1	102.7784	**<2.20E-17**	***
	Population x Mean α value	2.565	1	18.6345	**1.70E-05**	***
	Mean α value x OTU group	1.206	1	8.7592	**0.003133**	**
	Residuals	189.843	1379			

Les p-values significatives sont en gras.

Nous avons ensuite regardé plus spécifiquement la transmission des OTUs assignés aux cinq phyla les plus abondants dans le jeu de données. Les Figures 49 à 53 représentent ces valeurs α moyennes. La plupart des OTUs assignés aux Proteobacteria, Bacteroidetes, Spirochaetes et Elusimicrobia présentaient certains OTUs plutôt bien transmis dans les alates des deux populations, et globalement les OTUs de ces quatre phyla semblaient mieux transmis que ceux appartenant aux Firmicutes (Figures 49 à 53). Cependant, même les OTUs spécifiques aux intestins de termites comme les *Treponema* clusters I et II (Figure 52) ou les *Endomicrobia* (Figure 53) ne présentaient pas forcément des valeurs α moyennes élevées. En effet, les valeurs α moyennes des OTUs assignés aux Spirochaetes étaient de 0.349 à Oléron et de 0.294 à Pissos. Pour les Elusimicrobia, ces valeurs étaient de 0.397 et de 0.290, respectivement. Les Firmicutes présentaient quant à elles des valeurs α moyennes de 0.107 pour les deux populations.

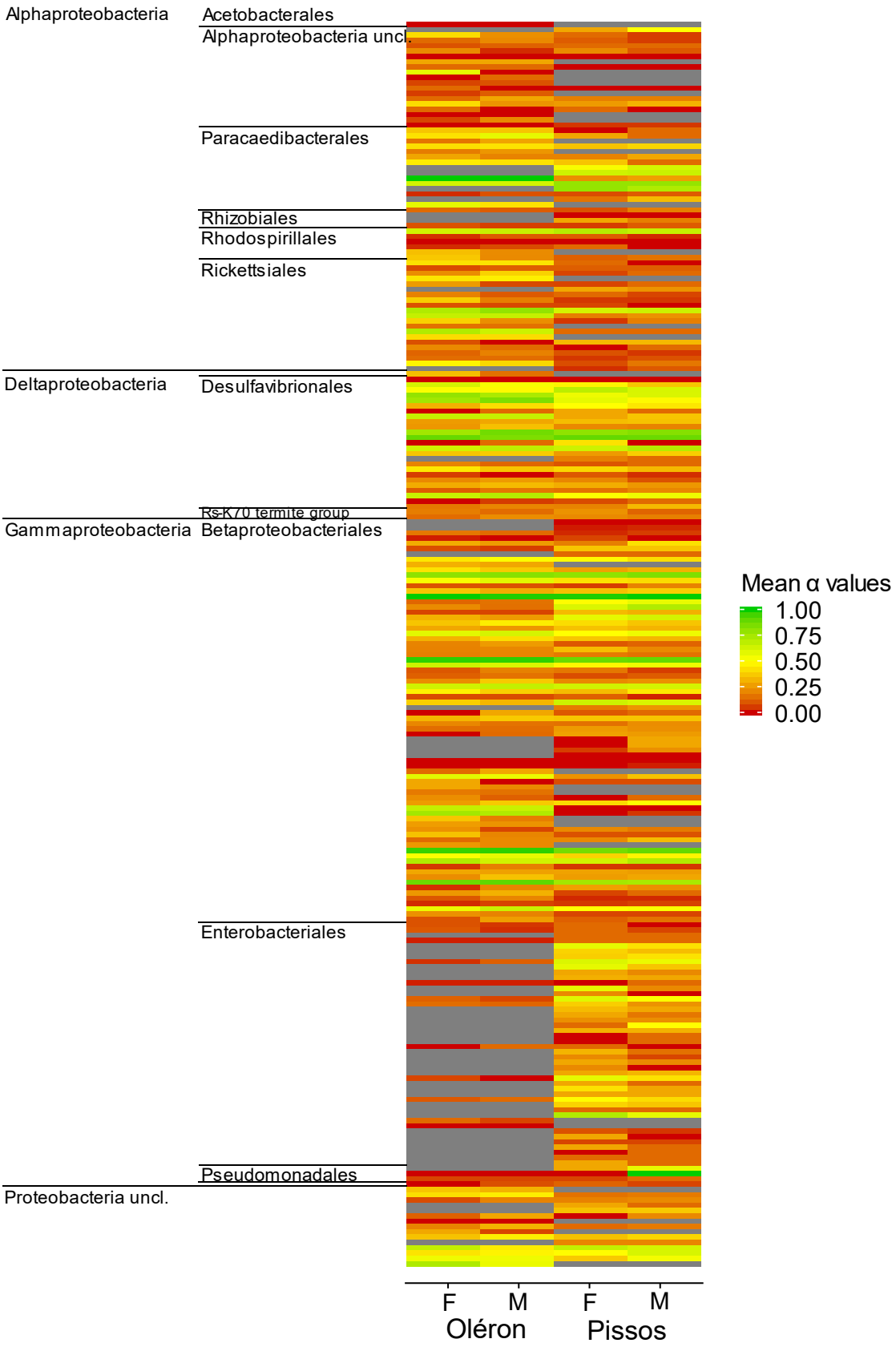


Figure 49 : Heatmap des valeurs α moyennes des OTUs du phylum Proteobacteria par sexe par population.

F : femelles. M : mâles. Les cases en gris représentent les OTUs absents de la population.

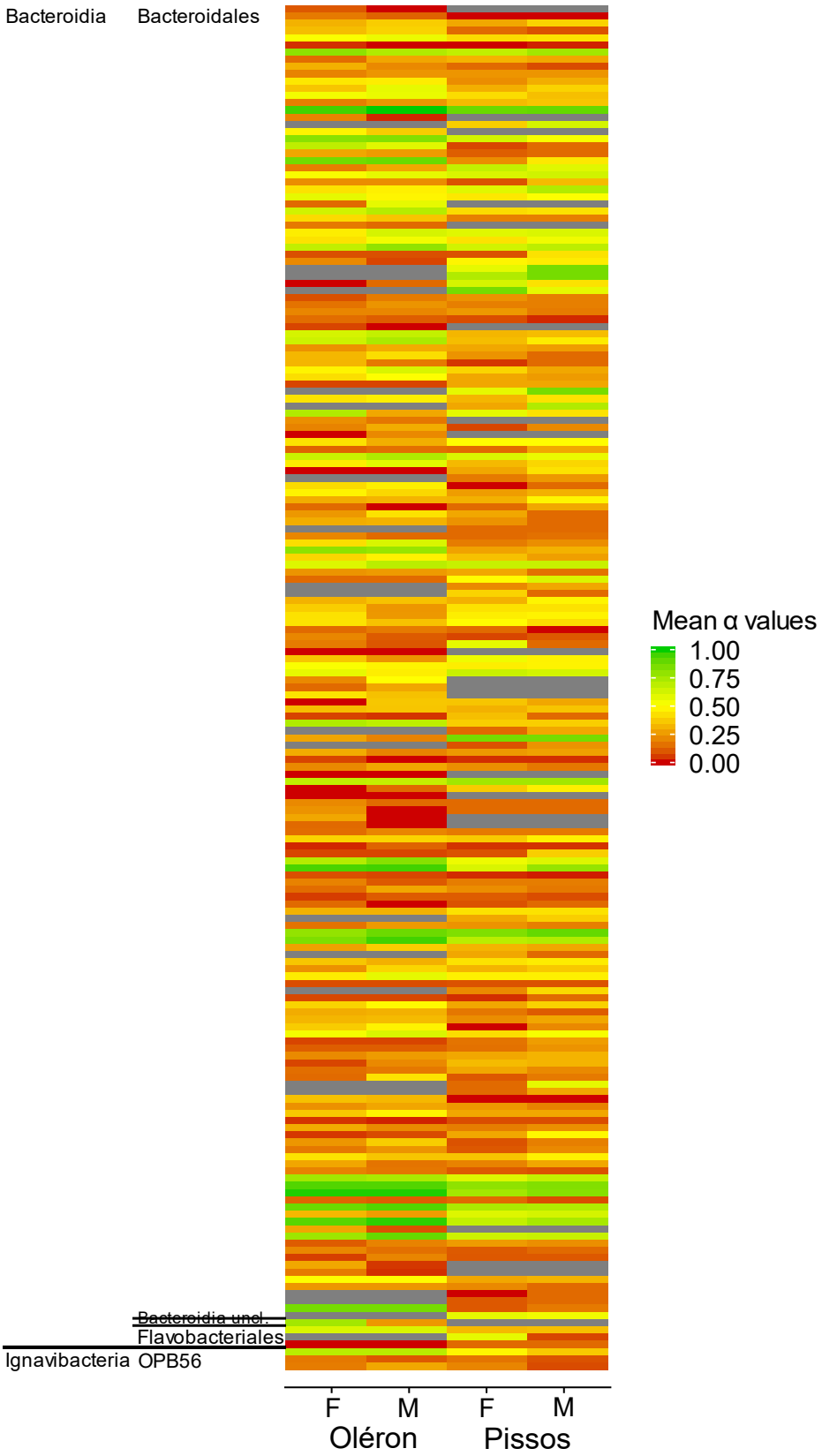


Figure 50 : Heatmap des valeurs α moyennes des OTUs du phylum Bacteroidetes par sexe par population.

F : femelles. M : mâles. Les cases en gris représentent les OTUs absents de la population.

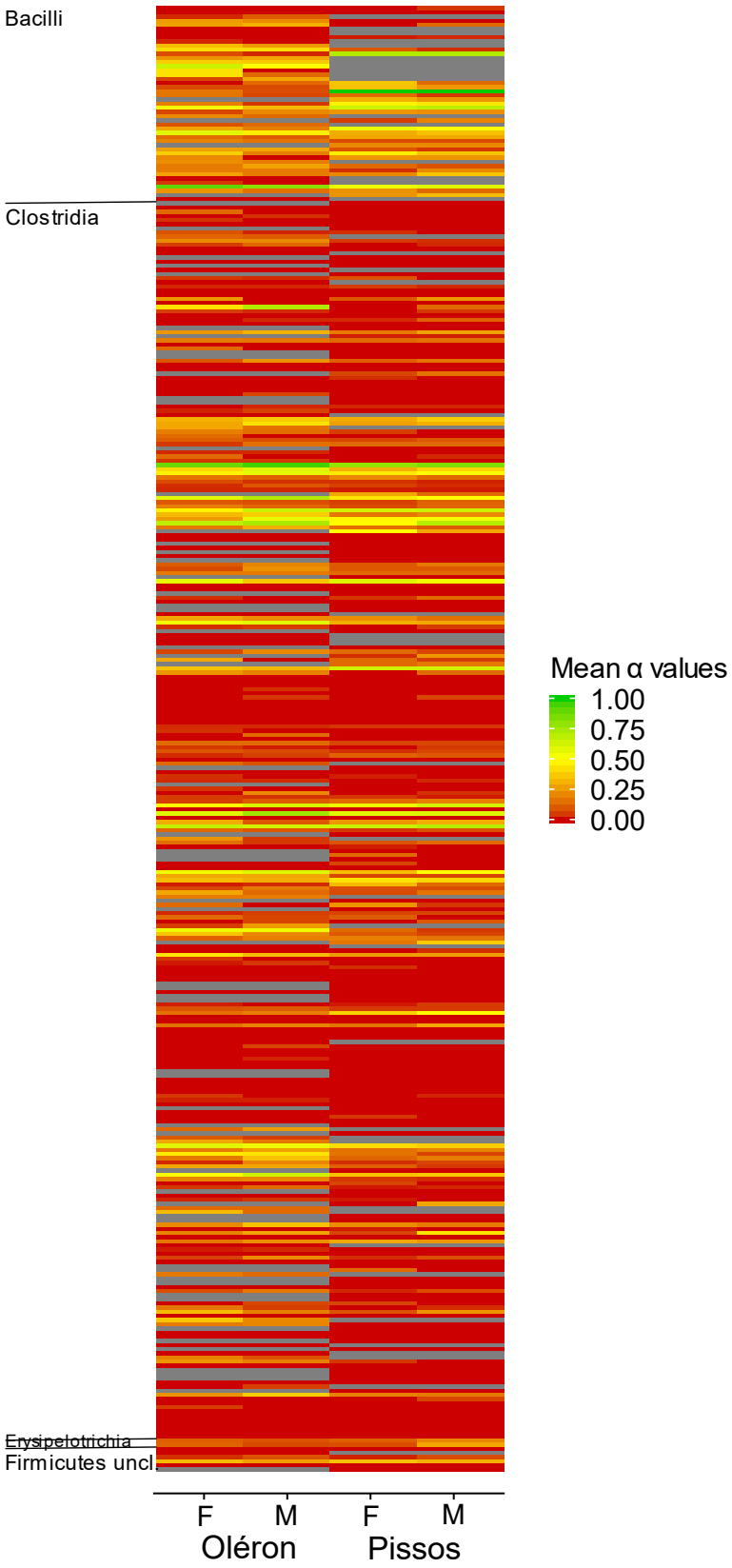


Figure 51 : Heatmap des valeurs α moyennes des OTUs du phylum Firmicutes par sexe par population. F : femelles. M : mâles. Les cases en gris représentent les OTUs absents de la population.

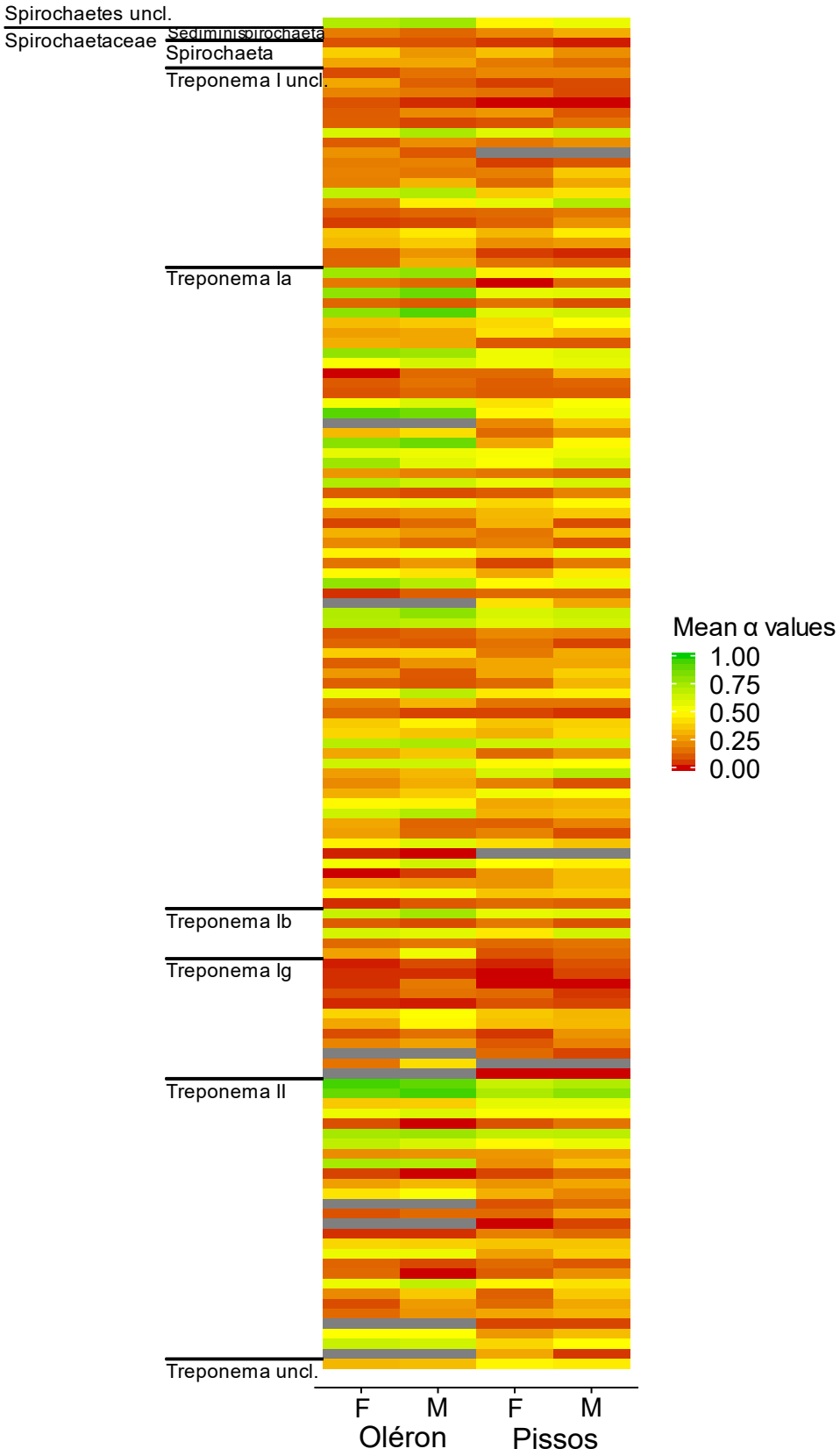


Figure 52 : Heatmap des valeurs α moyennes des OTUs du phylum Spirochaetes par sexe par population.

F : femelles. M : mâles. Les cases en gris représentent les OTUs absents de la population.



Figure 53 : Heatmap des valeurs α moyennes des OTUs du phylum Elusimicrobia par sexe par population. Tous les OTUs ont été assigné au *Candidatus* Endomicrobium. F : femelles. M : mâles. Les cases en gris représentent les OTUs absents de la population.

2.3. Relation entre taux de transmission et prévalence des bactéries dans les populations

Les prévalences observées (p_o) ont été obtenues pour chaque OTU bactérien d'une population en fonction de sa fréquence dans les 12 colonies de la population (détails en *Supporting information Table S3*). Les valeurs α moyennes semblaient être un bon facteur expliquant les prévalences des OTUs dans les populations. En effet, ces prévalences étaient significativement expliquées par l'interaction entre les valeurs α moyennes et le groupe des OTUs, ainsi qu'entre la population et le groupe des OTUs (Table 17). Les prévalences étaient positivement corrélées avec les valeurs α moyennes, avec une plus forte prévalence des OTUs du groupe I que les OTUs du groupe II (Figure 54). Dans la population de Pissos, les OTUs du groupe I moins présents dans les alates semblaient plus fréquents dans les colonies par rapport à la population d'Oléron (Figure 54). Cependant, toute la variation observée ne semblait pas être expliquée par les facteurs testés (Figure 54).

Table 17 : Analyse de la variance du modèle linéaire généralisé approprié aux données de prévalence observée (p_o) des OTUs bactériens dans les populations.

Response variable	Explanatory variables	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
p_o						
	Mean α value	107.316	1	1452.3	**< 2.2e-16**	***
	Population	7.027	1	95.0894	**< 2.2e-16**	***
	Sex	0.044	1	0.596	0.440143	
	OTU group	4.065	1	55.0126	**1.48E-13**	***
	Mean α value x OTU group	0.735	1	9.9437	**0.001627**	**
	Population x OTU group	1.141	1	15.4358	**8.69E-05**	***
	(Residuals)	271.561	3675			

Les p-values significatives sont en gras.

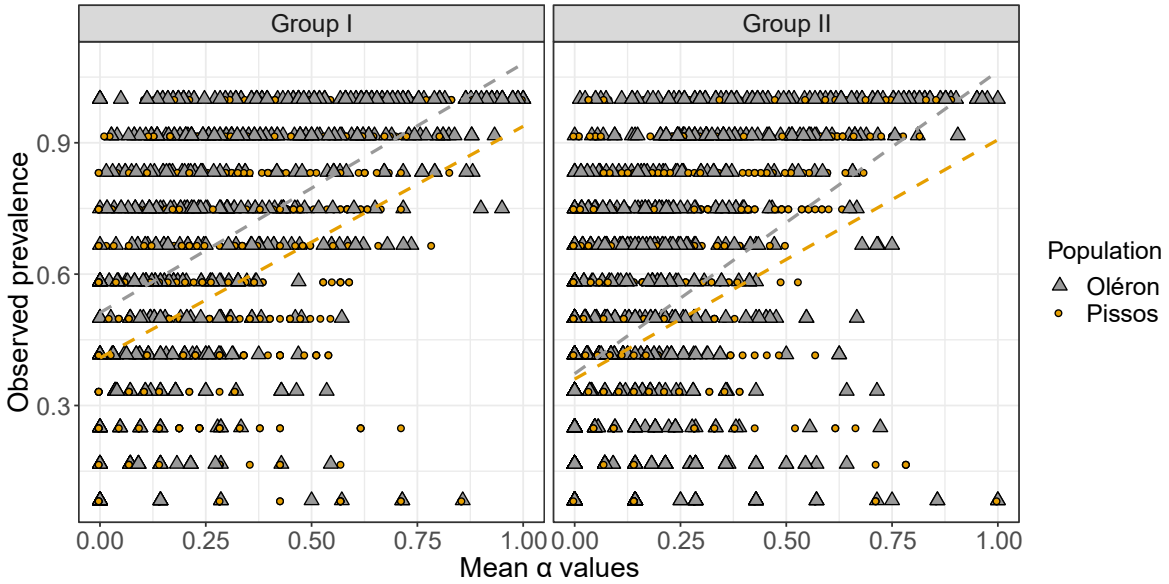


Figure 54 : Prévalence observée (p_o) des OTUs dans la population en fonction de leur valeur α moyenne. Une correction au carrée a été réalisée sur les données pour les tests statistiques, les régressions linéaires ne représentent donc pas celles adaptées aux statistiques mais cette représentation a été choisie car plus explicite. Les groupes I et II représentent les OTUs spécifiques aux intestins de termites et les autres OTUs.

3. Discussion

3.1. Efficacité de la transmission verticale des bactéries

3.1.1. Faibles taux de transmission verticale

Le postulat initial de cette étude était que la plupart des bactéries se transmettaient verticalement d'une génération à une autre *via* les alates. Cette étude avait donc pour but principal de tester l'efficacité de la transmission verticale des bactéries intestinales dans les reproducteurs primaires chez le termites xylophage *R. grassei*. Nous avons ainsi estimé la probabilité α qu'un OTU bactérien présent dans la colonie soit également présent dans un reproducteur essaimant de cette colonie pour en fonder une nouvelle. Cependant, nos résultats suggèrent que de nombreuses bactéries ne se transmettent pas (ou peu) verticalement.

Les valeurs α estimées pour les OTUs bactériens étaient extrêmement variables (de 0 à 1) et relativement faibles. Les OTUs bactériens étaient moins bien transmis dans les femelles que dans les mâles alates d'une même colonie, les valeurs α moyennes ont donc été estimées par sexe même si cet effet sexe était masqué à l'échelle des populations. Les OTUs bactériens avaient en moyenne une valeur α de 0.249 dans la population d'Oléron et de 0.217 dans celle

de Pissos, mais ces valeurs variaient en fonction des phyla. Par exemple, la valeur α moyenne des OTUs assignés aux Firmicutes était plus faible (0.121 et 0.092 pour les deux populations, respectivement), celle des OTUs assignés aux Elusimicrobia était quant à elle plus élevée (0.397 et 0.290 pour les deux populations, respectivement). Moins de 1 % des OTUs bactériens présentaient une valeur α de 1 que ce soit à Oléron ou à Pissos. De plus, nos résultats ont montré que 15.6 et 20.4 % des OTUs dans les populations d'Oléron et de Pissos n'étaient présents que dans les pools d'ouvriers et pas dans les alates, respectivement. Globalement, les bactéries semblaient mal transmises par les alates. Néanmoins, même si les alates femelles et mâles ne présentaient pas tout le pool bactérien disponible, leurs pools bactériens individuels étaient composés de bactéries assurant les grandes fonctions métaboliques nécessaires à la nutrition (données non montrées). Certains individus ne possédaient cependant pas certaines bactéries impliquées dans la dégradation des polymères (données non montrées), une fonction assurée généralement par l'hôte et les protistes (Brune, 2014 ; Brune & Dietrich, 2015).

3.1.2. Sous-estimation de l'efficacité de transmission

L'approche de métabarcoding comporte une limite de détection des taxa dans un échantillon quand ceux-ci sont présents en faible quantité (Coissac *et al*., 2012 ; Hatzenbuhler *et al*., 2017 ; Lamb *et al*., 2019 ; Makiola *et al*., 2019 ; Port *et al*., 2016). Comme discuté dans l'étude 2, il est possible que certains OTUs bactériens n'étaient qu'en très faible quantité dans certains alates et qu'ils n'aient pas été détectés par cette méthode. Les valeurs α ont donc pu être sous-estimées dans cette étude, d'autant plus pour les OTUs avec une faible abondance relative. Cependant, des pertes de symbiotes sont possibles dans les intestins de reproducteurs primaires de *Reticulitermes* (Lewis & Forschler, 2004). Des analyses complémentaires pourraient être menées pour vérifier nos données en utilisant une approche de PCR quantitative par exemple.

3.2. Mode de transmission des bactéries

Les faibles valeurs α obtenues pour les OTUs bactériens peuvent simplement indiquer un manque d'information dans notre étude. Cet argument est d'ailleurs appuyé par les résultats de plusieurs tests statistiques dont les effets significatifs étaient des interactions complexes entre différents facteurs difficiles à interpréter, même visuellement (exemple : structure des communautés bactériennes, relation entre prévalence et valeur α). Ces résultats suggèrent que

les facteurs que nous avons testés ne sont pas suffisants pour expliquer la variation observée que ce soit pour la richesse bactérienne dans les échantillons, la structure des communautés bactériennes, les valeurs α obtenues ou encore la prévalence des OTUs dans les populations hôtes. Notre hypothèse de départ supposait une transmission verticale efficace des bactéries. Ce postulat n'était certainement pas bon et ceci ne serait pas forcément étonnant si de nombreux OTUs bactériens ne se transmettent pas verticalement mais par voie horizontale *via* l'environnement (bactéries du sol, des végétaux, des champignons ou encore du bois) ou *via* des échanges avec d'autres espèces d'arthropodes vivant dans le bois.

Nous avons montré qu'une part importante des OTUs d'une population (environ 17 %) était uniquement présente dans les ouvriers. Ces OTUs visiblement non transmis dans les alates comportaient des OTUs du groupe II non spécifiques aux intestins de termites tels que des bactéries assignées aux *Mycoplasma* (phylum Tenericutes), aux *Saccharimonadales* (phylum Patescibacteria) ou encore aux *Clostridiales* et aux *Ruminoccocaceae* (phylum Firmicutes). Certains de ces genres sont généralistes et peuvent être retrouvés dans le sol ou dans le microbiote du bois en décomposition (Fierer, 2017 ; Neves Proença *et al*., 2017 ; Singh & Singh, 2018). D'autres sont communs à plusieurs espèces d'arthropodes voire d'animaux vivant dans le bois (König & Varma, 2006). Les OTUs du groupe II non transmis dans les alates pourraient être acquis secondairement par les colonies par des transferts horizontaux de l'environnement ou d'espèces aux membres de la colonie cherchant de la nourriture. Il n'est d'ailleurs pas étonnant qu'une grande partie de la communauté bactérienne des ouvriers soit représentée par ces OTUs (Figure 47 bas) puisque ce sont eux qui creusent des galeries dans le sol et cherchent la nourriture dans une colonie mature.

Cependant, parmi les OTUs non transmis dans les alates comptaient également des OTUs du groupe I spécifiques aux intestins de termites et pouvant jouer un rôle important dans la symbiose nutritionnelle avec l'hôte (Brune & Dietrich, 2015 ; Dietrich *et al*., 2014). Ces OTUs étaient majoritairement assignés aux *Tyzzerella* 3 (phylum Firmicutes), mais quelques OTUs appartenaient aux *Treponema* (phylum Spirochaetes), aux *Ancillula* (phylum Actinobacteria) et même aux *Endomicrobia* (phylum Elusimicrobia). Les *Endomicrobia* sont typiquement des bactéries endosymbiotiques de protistes (Stingl *et al*., 2005), et la plupart des bactéries spécifiques aux intestins de termites sont associées aux protistes (Berchtold *et al*., 1999 ; Dolan, 2001 ; Lee *et al*., 1987 ; Noda *et al*., 2009 ; Ohkuma, 2008 ; Sato *et al*., 2009 ; Stingl *et al*., 2005 ; Strassert *et al*., 2010). Comme les protistes flagellés de termites ne survivent pas dans l'environnement, nous pensions que les taxa bactériens associés aux protistes seraient transmis verticalement à la nouvelle génération de termites avec leurs hôtes unicellulaires.

Cependant, des formes enkystées existent chez les bactéries intestinales de termites (Radek & Nitsch, 2007). Même si elles ne sont pas présentes dans les alates suite à la fondation d'une nouvelle colonie, elles pourraient être acquises par des transferts horizontaux sous leur forme de résistance après la fondation. Nous avons également observé de fortes variations génétiques au sein des différentes populations bactériennes composant les communautés intestinales. Par exemple, 36 OTUs assignés aux *Endomicrobia* ont été obtenus lors de cette étude. La diversité bactérienne a pu être surestimée dans cette étude avec l'approche de MED comparé à du clustering à 3 % de dissimilarité utilisé classiquement (Eren *et al*., 2015). Cependant, des analyses préliminaires sur un sous jeu de données dont les OTUs ont été obtenus avec un seuil de 3 % ont montré des patterns de transmission verticale similaires à ceux de cette étude et ne remettent pas en cause la méthode utilisée (données non montrées). Les banques de données disponibles ne permettent pas d'assigner précisément les séquences jusqu'à l'espèce bactérienne. Il est possible que plusieurs OTUs représentent en réalité une seule espèce bactérienne. L'étude des relations phylogénétiques entre les OTUs d'un même genre permettrait de savoir si un OTU peu ou pas transmis est phylogénétiquement lié à un autre OTU bien transmis dans les alates. L'idéal serait même de séquencer la longueur totale des gènes ribosomaux 16S par une approche de clonage/séquençage pour une meilleure résolution.

Les résultats de cette étude suggèrent que les OTUs bactériens composant les communautés intestinales de *R. grassei* ont des taux de transmission verticale relativement faibles et pourraient être acquis dans l'environnement à chaque génération. Ceci signifie que les bactéries, spécifiques ou non aux intestins de termites, auraient un mode de transmission mixte incluant des événements de transmission verticale et horizontale, voire un mode de transmission uniquement horizontale pour certains taxa. Ces résultats vont dans le sens des analyses phylogénétiques récentes menées à l'échelle de nombreuses espèces de termites et de leurs communautés bactériennes intestinales montrant des transferts horizontaux récurrents au cours de la diversification de ces associations (Bourguignon *et al*., 2018).

Chapitre VIII :

Discussion générale

& Conclusion



© Paride Bertolin (JAB) 2013

Le mode et l'efficacité de transmission des symbiotes sont des facteurs clés à prendre en compte dans l'évolution des symbioses (Bennett & Moran, 2015 ; Ewald, 1987 ; Fine, 1975 ; Herre *et al*., 1999 ; Yamamura, 1993). Une transmission verticale des symbiotes microbiens, si elle est efficace, peut constituer un mécanisme participant à la stabilité de l'association mutualiste en assurant une fidélité entre les partenaires symbiotiques (Bull & Rice, 1991 ; Fine, 1975 ; Sachs *et al*., 2004). La transmission verticale comme mécanisme de maintien a été étudiée dans de nombreuses endo- et ectosymbioses mutualistes chez les insectes (Buchner, 1965 ; Douglas, 1989 ; Hosokawa *et al*., 2007 ; Kaltenpoth *et al*., 2014 ; Salem *et al*., 2017). Cependant, les cas étudiés sont des associations simples entre un hôte et une population symbiotique alors qu'en réalité un individu porte généralement une communauté symbiotique, notamment au niveau de son tube digestif (Douglas, 2015 ; Salem *et al*., 2015 ; Shapira, 2016). Que changent les interactions entre les différentes espèces symbiotiques d'une communauté sur le maintien du mutualisme ? Les mécanismes de transmission propre à chaque symbiote devraient résoudre les conflits entre symbiotes et permettre l'assemblage des différents taxa microbiens à la génération suivante. Cependant, les routes de transmission de ces communautés microbiennes sont peu connues. Chez les animaux sociaux, des soins parentaux envers les néonates longs et répétés au cours du temps pourraient assurer la transmission de communautés intestinales complexes (Onchuru *et al*., 2018). Cependant, cette hypothèse manque de données empiriques.

Chez les termites, il est largement admis par la communauté scientifique que le microbiote intestinal passe du couple fondateur d'une nouvelle colonie aux premiers descendants, probablement par trophallaxie proctodéale (Diouf *et al*., 2018 ; Nalepa *et al*., 2001 ; Ohkuma *et al*., 2009 ; Shimada *et al*., 2013). Lorsque ce projet de thèse a débuté, notre postulat était donc une transmission verticale efficace des symbiotes d'une génération de colonies de termites à une autre en accord avec ce qui était admis dans la communauté termitologue. Cependant, les résultats obtenus pour les bactéries ont déplacé nos objectifs. Les objectifs principaux de cette thèse étaient donc (i) d'étudier le mode de transmission des symbiotes (protistes et bactéries) et (ii) d'estimer l'efficacité de transmission de ceux transmis verticalement. Ces questions ont été étudiées en réalisant des analyses comparatives des communautés intestinales dans les populations naturelles du termite xylophage *R. grassei*.

1. Mode de transmission des symbiotes

Dans une première étude, nous voulions directement mesurer l'efficacité de transmission verticale des symbiotes chez les termites en fondant des colonies au laboratoire. Cependant, le faible succès de fondation des colonies ne nous a pas permis d'aller au bout de la démarche pour ce projet de thèse. Chez les insectes sociaux, si les symbiotes présentent un mode de transmission vertical, ils doivent nécessairement être présents dans les reproducteurs fondateurs des nouvelles colonies. Sans cette première étape, les symbiotes ne pourront pas être transmis par un mode vertical de transmission. Nous avons montré que les protistes et les bactéries symbiotiques des termites présentaient des modes de transmission contrastés.

1.1. Transmission verticale des protistes

Les résultats de l'étude que nous avons menée sur les protistes intestinaux de termites ont montré que tous les OTUs de protistes détectés dans une population de termite étaient retrouvés dans les alates femelles et/ou mâles de cette population, aucun OTU n'était présent que dans les pools d'ouvriers. Ce résultat suggère que les protistes ont la possibilité d'être transmis verticalement des alates à leurs descendants par trophallaxie proctodéale. Nous ne pouvons cependant pas exclure un mode de transmission mixte incluant des transferts verticaux et horizontaux, mais nos résultats ne permettent pas de statuer sur ce point.

La possibilité d'une transmission verticale des protistes est conforme à leur biologie. En effet, aucun protiste actif, sous forme de cyste ou sous toute autre forme de résistance n'a jamais été retrouvé dans les fèces de termites (Andrew, 1930 ; Cleveland, 1926 ; Cleveland *et al*., 1934 ; Kirby, 1949). De plus, ils sont extrêmement sensibles aux changements de température, de nourriture ou encore d'eau (Honigberg, 1970). Il est même possible de rendre les termites aposymbiotiques pour les protistes avec un traitement à l'oxygène (Cleveland, 1925a). Ces protistes sont spécifiques aux termites et ne peuvent pas survivre en dehors des intestins de leur hôte (Inoue et al 2000). De plus, des analyses phylogénétiques sur des familles ou des sous-familles de termites ont effectivement montré un pattern global de cocladogenèse entre les lignées hôte et symbiotique, suggérant une diversification évolutive de ces associations par des événements de cospéciation probablement dus à des transmissions verticales (Desai *et al*., 2010 ; Noda *et al*., 2007 ; Radek *et al*., 2018 ; Taerum *et al*., 2018 ; Tai *et al*., 2015). Des événements de changement d'hôte ou de perte de symbiote ont également ponctuellement eu

lieu (Desai *et al*., 2010 ; Radek *et al*., 2018 ; Taerum *et al*., 2018 ; Tai *et al*., 2015). Nos résultats vont donc dans le sens de ces études avec un mode de transmission principalement vertical pour les protistes.

1.2. Transmission mixte voire horizontale des bactéries

Concernant les bactéries, nous avons indirectement montré qu'un mode de transmission vertical n'était pas une bonne hypothèse de travail. Nos résultats ont montré que les bactéries intestinales de *R. grassei* n'avaient pas toutes la possibilité d'être transmises verticalement puisqu'entre 15 et 20 % des OTUs détectés dans une population étaient uniquement présents dans les ouvriers et ne pouvaient donc pas être transmis à la descendance par les alates. Comprendre comment se constitue le microbiote bactérien des termites représente un challenge.

Certains genres voire souches de bactéries détectées dans les populations de termites sont également présentes dans le sol et/ou le bois mort (Fierer, 2017 ; Neves Proença *et al*., 2017 ; Singh & Singh, 2018). Les ouvriers termites creusent des galeries dans le sol et cherchent de la nourriture (du bois), ils pourraient acquérir ces bactéries environnementales en les ingérant. D'autres genres bactériens sont spécifiques aux intestins de plusieurs arthropodes voire invertébrés terrestres fréquentant les mêmes habitats que les termites (*e.g.*, collemboles, cloportes, gastéropodes terrestres, araignées) (König & Varma, 2006). Dans la nature, ces invertébrés peuvent être trouvés dans les mêmes morceaux de bois que les colonies de termites (observation personnelle). Des transferts de bactéries peuvent donc avoir lieu par contact direct entre les termites et les autres invertébrés, ou indirectement par l'ingestion de fèces contenant ces bactéries. Des acquisitions secondaires par les colonies de ces bactéries non spécifiques aux intestins de termites sont donc un scénario possible et sont en accord avec leur biologie. Des analyses plus approfondies de ces lignées bactériennes vont être réalisées pour mieux savoir à quelles souches elles appartiennent et mieux comprendre comment elles peuvent être acquises par les termites.

Nous avons montré que parmi les bactéries uniquement présentes dans les ouvriers, et donc ne pouvant pas se transmettre verticalement, se trouvaient également des lignées spécifiques aux intestins de termites (Dietrich *et al*., 2014). Ces bactéries ne sont pas retrouvées dans d'autres habitats. Si ces bactéries sont acquises secondairement par les colonies, elles peuvent donc l'être uniquement à partir d'autres colonies de termites. Il a été montré que des formes de résistance pouvaient exister chez les bactéries spécifiques aux intestins de termites (Radek & Nitsch, 2007). Il est donc possible que ces lignées soient acquises après la fondation

d'une nouvelle colonie par l'ingestion de fèces d'une autre colonie contenant des formes de résistance ou par contacts directs avec des individus d'une autre colonie par consommation des individus après un combat par exemple.

Chez les termites, une partie des bactéries composant la communauté intestinale pourrait présenter un mode de transmission mixte puisque ces bactéries sont présentes dans les alates mais ont également la possibilité d'être acquises par des transferts environnementaux. L'autre partie des bactéries (*i.e.*, absentes des alates) aurait alors uniquement un mode de transmission horizontal. Ces résultats sont en accord avec les données à l'échelle macro-évolutive des termites montrant des transferts horizontaux récurrents de bactéries, même pour les lignées spécifiques aux intestins de termites (Bourguignon *et al*., 2018). Les colonies de termites seraient cependant dépendantes de leur environnement pour les transferts secondaires de bactéries, si des bactéries essentielles à la nutrition de l'hôte ne sont ni présentes dans les alates ni présentes sur le site de fondation des colonies, celles-ci pourraient être désavantagées dans la population. Ces résultats pourraient d'ailleurs expliquer les faibles succès de fondation des colonies au laboratoire. En effet, tout le matériel (sciure de bois, sable, boite) a été stérilisé avant de mettre les couples royaux dans les boites. Si les colonies acquièrent des bactéries essentielles à leur nutrition par l'environnement (voire d'autres microorganismes comme des champignons), ça n'a pas pu être le cas au laboratoire. De la sélection négative a pu agir sur les couples royaux ne possédant pas toutes les bactéries nécessaires à leur survie.

Une question demeure toujours pour les bactéries associées aux protistes : pourquoi ne sont-elles pas transmises verticalement à la descendance termite par le biais de leur hôte unicellulaire ? Ces bactéries devraient être transmises aussi bien que les protistes qui les hébergent. Nous avons montré que tous les protistes avaient la possibilité d'être transmis verticalement, mais certaines bactéries associées aux protistes n'étaient pas présentes dans les alates (*Treponema*, *Endomicrobia*). Il est possible que l'approche de métabarcoding n'ait pas permis la détection de certains OTUs bactériens présents en faible quantité dans les alates (Lamb *et al*., 2019). Une autre explication est que les protistes ne sont peut-être pas de bons 'vecteurs' de bactéries lors de la transmission à une nouvelle génération. Les cycles de vie des protistes flagellés dans les intestins de termites sont mal connus (pour revue : Nalepa, 2017). Il est possible qu'ils perdent leurs ecto- et endobactéries lors de la mue imaginale des termites. Dans ce cas, les bactéries associées aux protistes ne seraient pas transmises verticalement avec les protistes, mais elles pourraient être réacquises par les termites *via* l'environnement où elles coloniseraient ensuite les protistes déjà présents dans les intestins. Pour pouvoir tester cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier les protistes présents dans les intestins d'ouvriers, de

nymphes et d'alates de colonies matures avec des outils de métagénomique et d'hybridation *in situ* en fluorescence sur des cellules individuelles de protistes.

2. Efficacité de la transmission verticale des protistes

L'efficacité de transmission verticale peut être décomposée en deux étapes chez les insectes sociaux : (i) la probabilité α qu'un symbiote présent dans une colonie parentale soit également présent dans les alates essaimant de cette colonie et (ii) la probabilité β que le symbiote soit bien transmis à la descendance une fois la nouvelle colonie fondée. Nous avons choisi de mesurer la composante α de transmission verticale puisque si les symbiotes ne sont pas présents dans les alates, ils ne pourront pas être transmis à la descendance.

2.1. Une transmission verticale efficace…

Nous avons montré que les taux de transmission verticale des protistes étaient plutôt efficaces dans les populations de *R. grassei* (de 0.897 en moyenne) et ce pour la majorité des espèces de protistes, d'autant plus que notre approche a peut-être sous-estimé les valeurs α mesurées (voir discussion du chapitre VI). Cependant, même si cette première étape est nécessaire pour les symbiotes pour être transmis à une nouvelle génération hôte, elle n'est pas suffisante car ils doivent ensuite être transférés avec succès des reproducteurs primaires aux descendants (probabilité β). Nous pouvons donc nous demander ce que représentent réellement les valeurs α estimées au cours de cette thèse, mais nous avons de bonnes raisons de penser qu'un symbiote présent dans un alate ayant fondé une nouvelle colonie ait une forte probabilité d'être transmis à la descendance.

L'efficacité de la deuxième étape de transmission, précédemment appelée composante β de transmission (*i.e.*, la probabilité β), ne peut pas être étudiée avec les outils actuels, elle reste donc inconnue. Cependant, des études récentes menées sur *R. grassei* et d'autres espèces de *Reticulitermes* suggèreraient que la probabilité β pourrait être très élevée voire même proche de 1. Ces études ont montré que les deux reproducteurs fondant une nouvelle colonie ont de nombreuses opportunités de transférer leurs symbiotes intestinaux aux premières larves produites. Les reines et rois gardent leurs protistes intestinaux pendant plusieurs mois (Shimada *et al*., 2013) et font régulièrement des trophallaxies proctodéales avec leurs larves (de parents à

descendants) (Brossette *et al*., 2019). Ce comportement pourrait assurer le transfert de la plupart des protistes à la première cohorte d'ouvriers qui, en retour, pourront les transmettre aux autres membres de la colonie (dont les futurs alates) par trophallaxie proctodéale et ainsi perpétuer la symbiose avec les protistes au sein de la colonie (Brossette *et al*., 2019 ; Shimada *et al*., 2013). En théorie, un seul événement de trophallaxie proctodéale d'un des reproducteurs primaires à une de ses larves serait suffisant pour la transmission des symbiotes et ainsi pour leur propagation parmi les membres de la colonie nouvellement fondée. Si la probabilité β est réellement égale à 1, alors θ=α (puisque $\theta = \alpha . \beta$), cela signifierait que les valeurs α estimées lors de notre étude seraient un proxy des taux de transmission des symbiotes des colonies parentales aux colonies filles.

Cette transmission verticale efficace des protistes dans les alates est en accord avec les prévalences importantes des protistes que nous avons observées dans les populations. De plus, les études phylogénétiques menées sur les termites et leurs protistes intestinaux ont suggéré que la stabilité évolutive de ces associations était due à une transmission verticale efficace des protistes d'une génération de termite à une autre (Desai *et al*., 2010 ; Noda *et al*., 2007 ; Radek *et al*., 2018 ; Tai *et al*., 2015). Les résultats de notre étude sont l'une des premières preuves empiriques en faveur de cette interprétation (Michaud *et al*., 2020).

2.2. … Mais néanmoins imparfaite

Bien que nous ayons estimé des taux de transmission verticale plutôt efficaces pour les protistes, ils n'étaient pas parfaits. Une étude précédente menée sur trois termites américains du genre *Reticulitermes* a montré par observation microscopique que certaines espèces de protistes présentes en faible abondance dans les ouvriers, nymphes et soldats d'une colonie pouvaient être absentes des alates (Lewis & Forschler, 2004). Une transmission verticale imparfaite serait donc une réalité biologique pour les protistes. Nous ne pouvons pas exclure des effets des variables environnementales sur la transmission des symbiotes par les alates. Nous avons pourtant étudié des populations homogènes génétiquement (Bankhead-Dronnet, Perdereau, Kutnik, Dupont, & Bagnères, 2015) et écologiquement (colonies collectées sur du pin maritime). Quels seraient alors les taux de transmission dans des populations hétérogènes génétiquement et exploitant diverses essences de bois comme c'est le cas en Espagne par exemple (Lefebvre *et al*., 2016) ? L'échec de transmission semblerait un phénomène récurrent. Or, dans un contexte de mutualisme entre un hôte et plusieurs espèces de symbiotes, les symbiotes gagnant la compétition au niveau intra-hôte peuvent être, à terme, contre-

sélectionnés au niveau inter-hôte puisque les valeurs sélectives de l'hôte et des symbiotes sont intimement liées (Frank, 1996, 1997). Une transmission verticale imparfaite pourrait avoir un impact négatif sur la valeur sélective de l'hôte et donc sur celle du reste des symbiotes, il serait donc attendu que des mécanismes hôtes ou propres à la communauté symbiotique permettant la cotransmission de toutes les espèces symbiotiques mutualistes soient favorisés (Mira & Moran, 2002 ; Mouton, Henri, Boulétreau, & Vavre, 2003). Par exemple, chez le puceron, l'efficacité de transmission verticale des symbiotes secondaires peut varier en fonction du contexte de co-infection, certaines associations amélioreraient la cotransmission et d'autres réduiraient le taux de transmission verticale (Rock *et al*., 2018). L'assemblage de protistes dans les nymphes destinées à muer en alates pourrait ainsi impacter la composition des communautés intestinales des alates. Comment des pertes symbiotiques peuvent avoir lieu dans les alates ? Et quelles sont les conséquences de telles pertes sur les colonies de termites ? Il faut prendre en compte l'échelle de la communauté microbienne pour comprendre ce phénomène de transmission imparfaite.

2.2.1. Mécanismes de perte symbiotique

Le nombre total de protistes dans les intestins d'alates serait au moins 90 fois inférieur à celui dans les intestins de nymphes à longs fourreaux alaires (Lewis & Forschler, 2004). La mue imaginale induirait donc un important goulot d'étranglement sur les populations de protistes qui pourrait se traduire par la perte de certaines espèces dans les alates. Dans un tel processus aléatoire, la probabilité pour un symbiote donné d'être perdu chez les alates est fortement corrélé à son abondance relative dans la communauté symbiotique des nymphes, cette perte serait neutre et sans mécanisme sélectif sous-jacent. En effet, la probabilité de perdre un symbiote très abondant serait beaucoup plus faible que la probabilité de perdre un symbiote représenté par quelques cellules dans une nymphe destinée à muer en alate. Par exemple, nos résultats ont montré un taux de transmission de 0.416 des *Trichonympha* TgA dans la population de Pissos alors qu'il était de 1 pour les *Trichonympha* TgB. Les résultats de PCRq ont révélé que, dans certaines colonies de termites, l'abondance relative des *Trichonympha* TgA était très faible comparée aux *Trichonympha* TgB, et dans ces mêmes colonies les alates portent tous TgB mais pas TgA. L'utilisation d'outils moléculaires permettrait d'évaluer ce goulot d'étranglement symbiotique lors de la mue imaginale chez les termites de façon plus précise et pourrait l'être pour chaque espèce de protistes, et non pour les protistes dans leur ensemble. Ces résultats permettraient de faire des modèles prédictifs plus fins sur la perte aléatoire des

symbiotes dans les alates. En plus de ce modèle neutre de perte symbiotique, des modèles non exclusifs pourraient également expliquer pourquoi les symbiotes ne sont pas parfaitement transmis dans les alates de termites. Ces différents facteurs sont résumés dans la Figure 55 à la fin de cette section (page 188).

Les protistes peuvent entrer en compétition pour les ressources nutritionnelles de l'hôte (sucres, acides aminés, vitamines), leur place dans les microenvironnements de la panse rectale (microoxique en périphérie et anoxique dans le lumen) et pour l'accès à la nouvelle génération hôte, des interactions antagonistes peuvent donc avoir lieu entre eux pour assurer leur présence dans les nymphes destinées à muer en alates puis dans les alates eux-mêmes. Des pressions de sélection, exacerbées par la réduction symbiotique lors de la mue imaginale (Lewis & Forschler, 2004), pourraient agir sur les protistes et mener à la sélection intra-alates des symbiotes les plus compétitifs (généralement les plus abondants) et à la perte des moins compétitifs (Frank, 1996). Ces pertes constitueraient une transmission verticale imparfaite. L'étude des deux espèces de *Trichonympha* présentes chez *R. grassei* pourrait être intéressante dans une optique de mieux comprendre la coexistence d'espèces proches phylogénétiquement avec une niche écologique comparable. L'approche de PCRq que nous avons développée pourrait être utilisée afin de quantifier les deux espèces chez les nymphes, les alates et les ouvriers et d'étudier si de la compétition existe entre elles. Il serait d'ailleurs intéressant d'étendre cette technique à l'étude de toute la communauté de protistes intestinaux voire à certaines souches bactériennes pour étudier si de la compétition existe entre les différentes espèces ou si des mécanismes permettant leur cotransmission ont été sélectionnés.

Un mécanisme de choix de partenaire symbiotique pourrait également expliquer des pertes symbiotiques des nymphes aux alates. Comme les microorganismes présentent un taux de réplication plus rapide que leurs hôtes et que les symbioses intestinales sont ouvertes à la colonisation par des symbiotes transitoires, des symbiotes tricheurs, investissant moins dans la coopération, peuvent être présents dans les communautés intestinales. Dans un contexte de mutualisme, l'hôte aurait un intérêt évolutif à ne pas transmettre ces symbiotes tricheurs à sa descendance en les sanctionnant ou en favorisant les symbiotes les plus coopératifs (Jones *et al*., 2015 ; Sachs *et al*., 2004). Pour cela, l'hôte doit être capable de discriminer ces symbiotes. Des récepteurs permettant la reconnaissance de symbiotes moins ou non coopératifs pourrait se trouver au niveau de l'épithélium intestinal des termites pour pouvoir sélectivement les éliminer. Les gènes de l'immunité de l'hôte pourraient notamment avoir un rôle dans la régulation de la communauté symbiotique intestinale, comme cela a été mis en avant dans d'autres modèles (Hooper *et al*., 2012 ; Lindenberg *et al*., 2019 ; Zhang & Luo, 2015). Dans la

même logique, les symbiotes mutualistes présents dans la communauté intestinale auraient un intérêt évolutif à sanctionner les symbiotes tricheurs pour favoriser la transmission de leurs propres descendants. Les mécanismes de reconnaissance et de choix au sein de la communauté pourraient avoir lieu grâce à des allèles de reconnaissance entre les symbiotes coopérateurs (*i.e.*, allèles *green beard*) (Dawkins, 1976 ; Haig, 1996). La manipulation des microbiotes intestinaux de termites combinée à une approche de transcriptomique et de génomique permettrait d'identifier si des gènes de l'hôte ou de la communauté symbiotique sont impactés positivement ou négativement par ces perturbations de communautés.

Chez les termites, il a été décrit que la communauté intestinale de protistes, prise comme une unité fonctionnelle, participait activement à la digestion de la lignocellulose, mais le rôle respectif de chaque espèce de protiste dans la dégradation du bois reste peu connu (Ni & Tokuda, 2013). Dans les cas de symbioses mutualistes entre un hôte et une communauté de symbiotes, pour pouvoir être maintenus et transmis d'une génération hôte à la suivante, les symbiotes doivent apporter des avantages différents à l'hôte (Vautrin & Vavre, 2009). Or, de la redondance fonctionnelle peut avoir lieu dans une communauté microbienne mutualiste, notamment si les souches sont proches phylogénétiquement (Louca *et al*., 2018). Il existerait donc théoriquement une certaine flexibilité métabolique dans la composition des communautés symbiotiques sans impact fonctionnel important et donc sans impact sur la valeur sélective des hôtes ou sur la valeur sélective de la communauté microbienne dans sa généralité si la perte d'une souche voire d'une espèce symbiotique est métaboliquement ou fonctionnellement compensée par un autre symbiote. Dans les colonies de *R. grassei*, la redondance fonctionnelle entre symbiotes apparentés pourrait expliquer les patterns observés de variation de composition de communautés de protistes au sein des populations. Les alates étudiés n'essaimaient pas tous avec toutes les espèces de protistes détectées. Il est cependant difficile de savoir s'ils quittaient leur colonie avec suffisamment de protistes pour assurer la dégradation de la lignocellulose. Ceci nécessite de mieux comprendre la relation entre la structure des communautés microbiennes et leurs fonctions. Une étude plus approfondie des fonctions métaboliques de chaque souche symbiotique permettrait de déterminer si chacune a un rôle différent, complémentaire ou synergétique.

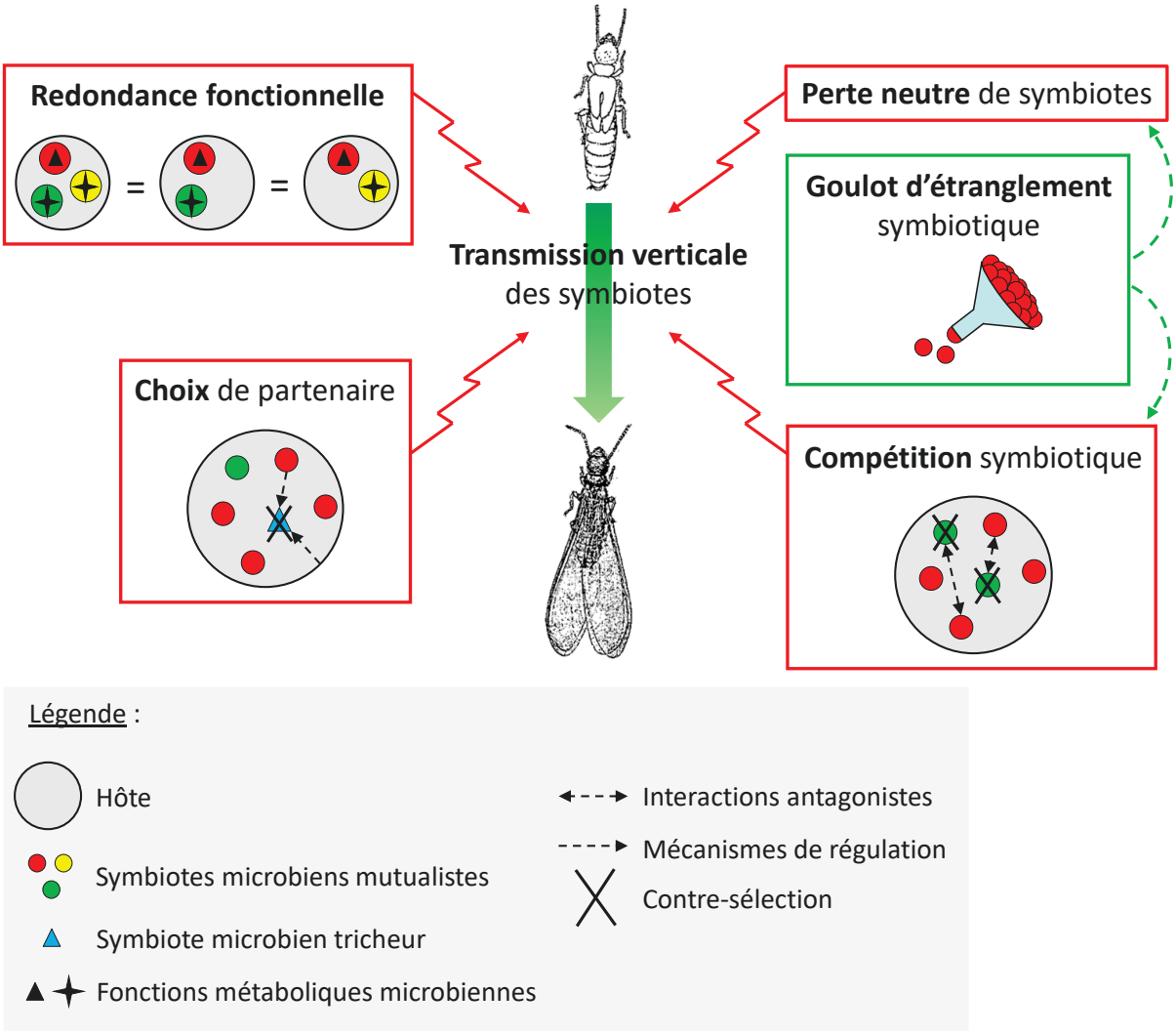


Figure 55 : Schéma récapitulatif des facteurs pouvant impacter l'efficacité de transmission verticale chez les termites. Lors de la mue imaginale des nymphes en reproducteurs primaires, la transmission verticale des protistes et des bactéries est imparfaite. La réduction symbiotique lors de la mue pourrait conduire à des pertes neutres de symbiotes. Ces pertes pourraient également être expliquées par de la compétition symbiotique dans l'hôte, exacerbée par le goulot d'étranglement symbiotique. Des mécanismes de choix de partenaire permettant la régulation par l'hôte ou par les symbiotes de symbiotes tricheurs pourraient également être à l'origine de ces pertes. Enfin, si de la redondance fonctionnelle existe entre les différents symbiotes, la perte d'une espèce sera compensée métaboliquement par une autre.

2.2.2. Conséquences d'une transmission imparfaite

Nos travaux ont mis en évidence une relation positive entre le taux de transmission verticale des protistes et leur prévalence dans les populations de termites. La transmission verticale des symbiotes serait donc un facteur expliquant la prévalence dans les populations, comme démontré dans de précédentes études chez des plantes (Gundel *et al.*, 2008, 2011).

Cependant, les valeurs mesurées d'efficacité de transmission verticale ne semblaient pas expliquer à elles seules les prévalences. Un modèle simple de simulation nous a permis d'estimer des valeurs théoriques de prévalence des protistes qui se sont révélées plus faibles que celles observées dans les populations de *R. grassei*. La raison la plus parcimonieuse expliquant ces sous-estimations est que l'une ou les deux suppositions de départ de notre modèle ne sont pas vérifiées dans la nature, mais d'autres facteurs pourraient également entrer en jeu. Ces facteurs non exclusifs pourraient également être une explication aux faibles succès de fondation de colonies obtenues en laboratoire. La Figure 56 à la fin de cette section (page 191) récapitule les facteurs pouvant expliquer la prévalence des symbiotes intestinaux dans les populations de termites.

La première supposition de notre modèle était l'absence de sélection entre les individus et les colonies liée à leurs communautés intestinales. Les prévalences observées des espèces de protistes étaient au moins de 0.95 mais leur taux de transmission n'étaient pas tous aussi élevés. Or, si un symbiote est fixé dans une population, on pourrait s'attendre à ce que sa transmission verticale soit parfaite comme pour des symbiotes primaires de pucerons (Darby & Douglas, 2003 ; Douglas, 2008), ou que de la sélection négative ait lieu contre les hôtes ne portant pas suffisamment de symbiotes. Des pressions de sélection pourraient s'exercer contre les reproducteurs primaires ne portant pas suffisamment d'espèces de protistes pour se nourrir jusqu'à ce que les premiers ouvriers se différencient et les nourrissent en retour. La sélection pourrait également agir contre les colonies ne présentant pas suffisamment d'espèces de protistes pour assurer une dégradation optimale de la cellulose. La prévalence élevée des protistes dans les populations de termites pourrait être liée à de la sélection négative envers les colonies ne possédant pas l'assemblage complet de protistes qui peut être essentiel au mutualisme nutritionnel avec l'hôte. Nous avons supposé que la redondance fonctionnelle serait un mécanisme expliquant la perte de symbiotes dans les alates. Dans ce cas, la perte d'un symbiote n'aurait pas de conséquence directe si elle concerne un symbiote exprimant des fonctions redondantes avec un autre symbiote qui est quant à lui transmis. Cependant, la redondance fonctionnelle entre les symbiotes pourrait elle-même varier en fonction des habitats ou plus simplement en fonction de la nature du bois ingéré. Dans ce cas, la perte du symbiote métaboliquement compensée par une autre espèce ne le serait plus sur une nouvelle source de nourriture, de la sélection négative pourrait s'exercer contre la colonie.

La seconde supposition de notre modèle était l'absence de choix entre partenaires sexuels, or un choix préférentiel entre partenaires portant des symbiotes différents (hétérogamie dépendant du microbiote) pourrait expliquer nos résultats. Il a été montré chez *Drosophila*

melanogaster que le choix de partenaire pouvait être modulé par le microbiote intestinal et que les individus choisissaient préférentiellement des partenaires positivement assortis, probablement par détection de composés volatils (Najarro, Sumethasorn, Lamoureux, & Turner, 2015 ; Sharon *et al*., 2010). Chez les termites xylophages, les acides gras volatils et les autres composés produits par les symbiotes intestinaux (Odelson & Breznak, 1983) sont émis par l'hôte et sembleraient impliqués dans la reconnaissance des congénères (Matsuura, 2001). Si certains symbiotes échouent à être transmis dans les alates, les alates pourraient exploiter ces signaux chimiques pour estimer la composition du microbiote intestinal des potentiels partenaires sexuels et préférentiellement choisir un individu négativement assorti afin de compléter la communauté symbiotique par rapport à la sienne pour fonder une colonie avec un maximum de symbiotes. Des études mêlant modulation du microbiote intestinal et écologie comportementale permettrait d'identifier si un tel choix de partenaire sexuel est fait en fonction de la composition de sa communauté intestinale, mais permettrait également de déterminer si ce choix est fait par la femelle, par le mâle ou par les deux partenaires.

Notre postulat de base était une transmission verticale des symbiotes chez les termites. Or, comme nous l'avons discuté pour les bactéries, les protistes pourraient présenter un mode de transmission mixte incluant de la transmission verticale et de la transmission horizontale (Bourguignon *et al*., 2018 ; da Costa & Poulsen, 2018 ; Ebert, 2013 ; Radek *et al*., 2018 ; Taerum *et al*., 2018). Les protistes ne pouvant pas survivre en dehors des intestins de termites (Inoue *et al*., 2000), si de tels transferts horizontaux existent, ils doivent obligatoirement avoir lieu par contact direct avec des individus d'une autre colonie voire d'une autre espèce de termite par consommation des individus après un combat par exemple. De tels transferts horizontaux de protistes ont été observés au laboratoire entre deux espèces de termites (Guyot *et al*., données non publiées). Ces acquisitions secondaires de symbiotes permettraient de réacquérir un protiste non transmis verticalement dans les alates ou alors d'acquérir de nouveaux protistes avec de nouvelles fonctions permettant de remplacer ceux qui ont été perdus. Cependant, si les protistes en question sont essentiels à la nutrition des termites et qu'ils ne sont pas présents dans la colonie à sa création, elle serait certainement contre-sélectionnée. Sa force coloniale ne serait de toute façon certainement pas suffisante à ses débuts pour combattre une autre colonie plus mature.

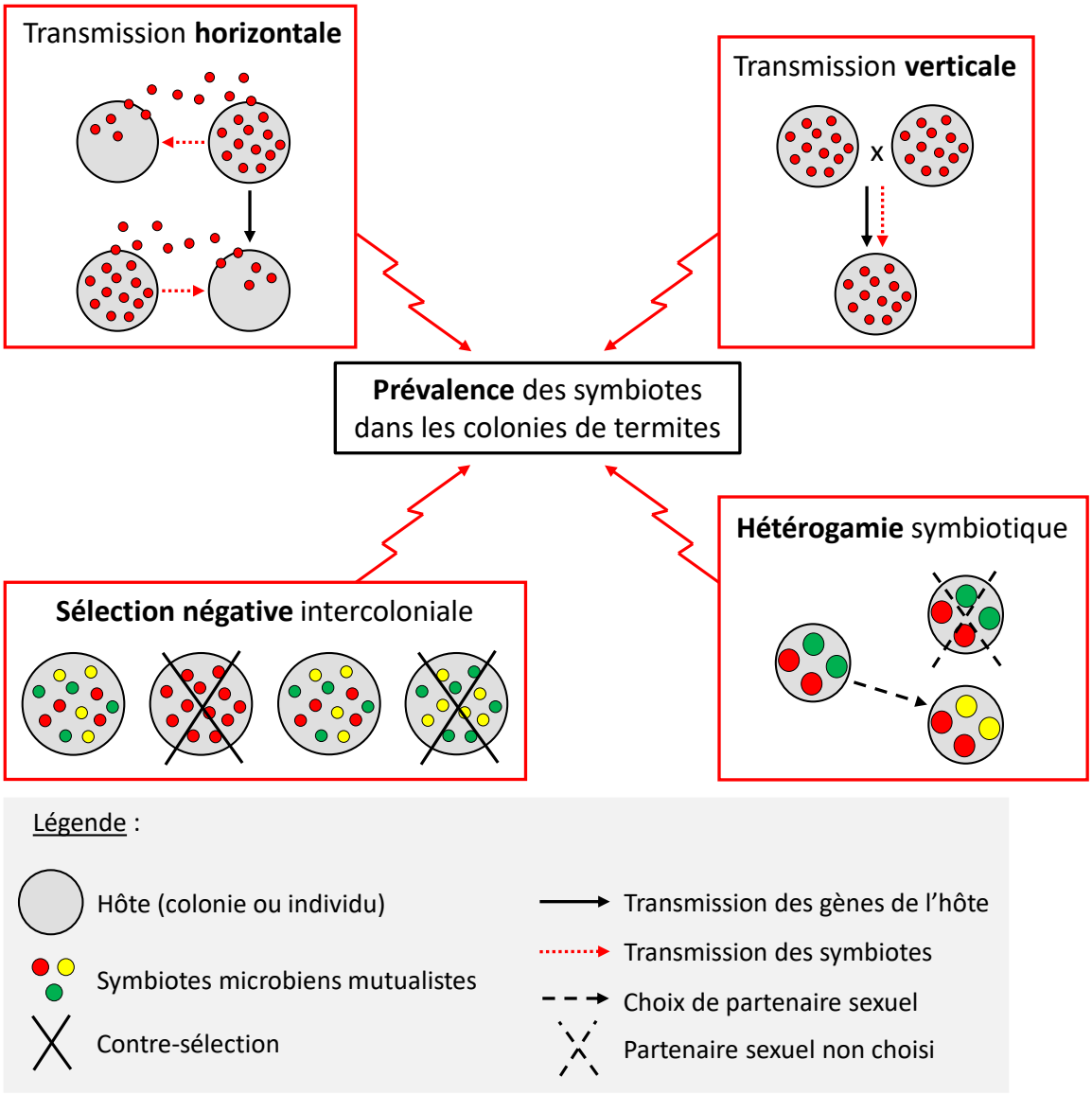


Figure 56 : Schéma récapitulatif des facteurs expliquant la prévalence des symbiotes dans les populations de termites. La transmission verticale des symbiotes est un facteur expliquant en partie leur prévalence dans les populations hôtes mais n'est pas suffisant. Celui-ci pourrait être conditionné par un choix de partenaire sexuel assortatif au niveau symbiotique puisqu'à la fois la reine et le roi peuvent transmettre leur symbiote à la descendance. Des acquisitions secondaires de protistes pourraient avoir lieu après la fondation des colonies mais serait dépendante du contexte environnemental. Si les colonies ne portent pas les symbiotes nécessaires à leur nutrition, elles seraient désavantagées et contre-sélectionnées au niveau intercolonial.

3. Conclusion : quels facteurs permettent la coopération des symbiotes et la stabilité des associations hôtes-microbiotes ?

En étudiant le mode et l'efficacité de transmission du microbiote intestinal dans les populations naturelles du termite xylophage *R. grassei*, les travaux de cette thèse ont permis de mettre en évidence que la transmission verticale à elle seule ne constitue probablement pas un mécanisme suffisant pour expliquer le maintien de ces associations. Pour les protistes flagellés, la transmission verticale semblerait être en mesure de résoudre en partie les conflits entre les différentes espèces au sein d'un hôte. La fidélité entre l'hôte et les symbiotes et entre les symbiotes eux-mêmes assurée par la transmission verticale des protistes est donc un mécanisme à prendre en compte dans le maintien de ces associations. Cependant, ce mécanisme n'explique pas le mélange des lignées symbiotiques parentales à chaque génération ni les événements ponctuels de transmission horizontale. Nous avons mis en avant que les femelles et les mâles fondateurs de nouvelles colonies dans une population de termites pouvaient contribuer équitablement, de façon qualitative, à l'apport de symbiotes mutualistes à leurs descendants. Il a été proposé que le lien de parenté entre les symbiotes est un facteur majeur expliquant le niveau de coopération entre eux et avec l'hôte (Leeks *et al*., 2019). Chez les termites, même si la mère et le père n'apportaient qu'une seule espèce à leurs descendants, le mélange des lignées symbiotiques maternelle et paternelle pourrait induire des conflits entre les symbiotes puisque ceux-ci ne sont pas forcément apparentés (Frank, 1996). D'autres facteurs pourraient avoir ce rôle, non seulement lors de la fondation d'une colonie et du mélange des lignées symbiotiques, mais également tout au court de la vie des colonies. Concernant les bactéries symbiotiques, la transmission verticale n'expliquerait en rien le maintien des différents taxa microbiens puisque la plupart semblent avoir un mode de transmission mixte voire uniquement horizontal. L'acquisition de ces bactéries à chaque génération de colonies par l'environnement pourrait déstabiliser l'association. De la sélection pourrait agir à plusieurs niveaux pour maintenir la coopération entre les souches symbiotiques (Travisano & Velicer, 2004). Cette sélection, qu'elle soit sur les bactéries ou sur les protistes, pourrait être assurée par des mécanismes de reconnaissance et de choix de partenaire par l'hôte sur les symbiotes comme cela a été mis en évidence dans d'autres systèmes (Gubry-Rangin, Garcia, & Béna, 2010 ; Kaltenpoth *et al*., 2014 ; Kiers *et al*., 2003 ; Sachs *et al*., 2004). Un tel mécanisme de régulation pourrait exister chez les termites *via* la reconnaissance des symbiotes coopérateurs ou tricheurs au niveau de

l'épithélium intestinal et l'expression de gènes de l'immunité par exemple. Ce mécanisme de choix de partenaire n'est d'ailleurs pas incompatible avec celui de fidélité entre partenaires, les deux pourraient agir en synergie pour permettre le maintien des associations termites-microbiotes et d'une manière plus générale celles entre les hôtes et leurs microbiotes intestinaux. Ces travaux sont un début dans la compréhension de ces mécanismes mais permettent déjà d'avoir une première idée de leur fonctionnement.

Références bibliographiques

A

Abdul Rahman, N., Parks, D. H., Willner, D. L., Engelbrektson, A. L., Goffredi, S. K., Warnecke, F., … Hugenholtz, P. (2015). A molecular survey of Australian and North American termite genera indicates that vertical inheritance is the primary force shaping termite gut microbiomes. *Microbiome*, *3*(1), 5. https://doi.org/10.1186/s40168-015-0067-8

Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., … Zhang, Q. (2019). Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *66*, 4-119. https://doi.org/10.1111/jeu.12691

Aksoy, S. (1995). *Wigglesworthia* gen. Nov. And *Wigglesworthia glossinidia* sp. Nov., taxa consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of tsetse flies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *45*(4), 848-851.

Aksoy, S., Chen, X., & Hypsa, V. (1997). Phylogeny and potential transmission routes of midgut-associated endosymbionts of tsetse (Diptera : Glossinidae). *Insect Molecular Biology*, *6*(2), 183-190. https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1997.tb00086.x

Alizon, S., Hurford, A., Mideo, N., & Van Baalen, M. (2009). Virulence evolution and the trade-off hypothesis : History, current state of affairs and the future: Virulence evolution and trade-off hypothesis. *Journal of Evolutionary Biology*, *22*(2), 245-259. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01658.x

Anderson, R. M., & May, R. M. (1982). Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology*, *85*, 411-426.

Andrew, B. J. (1930). Method and rate of protozoan refaunation in the termite *Termopsis angusticollis* Hagen. *University of California publications in zoology*, *33*, 449-470.

Apprill, A., Robbins, J., Eren, A. M., Pack, A. A., Reveillaud, J., Mattila, D., … Mincer, T. J. (2014). Humpback whale populations share a core skin bacterial community : Towards a health index for marine mammals? *PLoS ONE*, *9*(3), e90785. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090785

Archibald, J. M. (2012). The evolution of algae by secondary and tertiary endosymbiosis. In *Advances in botanical research* (Vol. 64, p. 87-118). Academic Press.

Archibald, J. M. (2015). Endosymbiosis and Eukaryotic cell evolution. *Current Biology*, *25*(19), R911-R921. https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.055

Arnot, D. E., Roper, C., & Bayoumi, R. A. (1993). Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *61*(1), 15-24. https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90154-P

Arora, N. K. (2013). *Plant microbe symbiosis : Fundamentals and advances*. New Delhi: Springer.

Attardo, G. M., Benoit, J. B., Michalkova, V., Yang, G., Roller, L., Bohova, J., … Aksoy, S. (2012). Analysis of lipolysis underlying lactation in the tsetse fly, *Glossina morsitans*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *42*(5), 360-370. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.01.007

Axelrod, R., & Hamilton, W. D. (1981). The evolution of cooperation. *Science*, *211*(4489), 1390-1396.

B

Bagnères, A.-G., Clément, J.-L., Blum, M. S., Severson, R. F., Joulie, C., & Lange, C. (1990). Cuticular hydrocarbons and defensive compounds of *Reticulitermes flavipes* (Kollar) and *R. santonensis* (Feytaud) : Polymorphism and chemotaxonomy. *Journal of Chemical Ecology*, *16*(12), 3213-3244. https://doi.org/doi.org/10.1007/BF00982094

Balmand, S., Lohs, C., Aksoy, S., & Heddi, A. (2013). Tissue distribution and transmission routes for the tsetse fly endosymbionts. *Journal of Invertebrate Pathology*, *112*, S116-S122. https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.04.002

Bandi, C., Damiani, G., Magrassi, L., Grigolo, A., Fani, R., & Sacchi, L. (1994). Flavobacteria as intracellular symbionts in cockroaches. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *257*(1348), 43-48. https://doi.org/10.1098/rspb.1994.0092

Bandi, C., Sironi, M., Magrassi, L., Nalepa, C. A., Laudani, U., & Sacchi, L. (1995). The establishment of intracellular symbiosis in an ancestor of cockroaches and termites. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *259*(1356), 293-299. https://doi.org/10.1098/rspb.1995.0043

Bankhead-Dronnet, S., Perdereau, E., Kutnik, M., Dupont, S., & Bagnères, A.-G. (2015). Spatial structuring of the population genetics of a European subterranean termite species. *Ecology and Evolution*, *5*(15), 3090-3102. https://doi.org/10.1002/ece3.1566

Baudouin, G., Dedeine, F., Bech, N., Bankhead-Dronnet, S., Dupont, S., & Bagnères, A.-G. (2017). An American termite in Paris : Temporal colony dynamics. *Genetica*, *145*(6), 491-502. https://doi.org/10.1007/s10709-017-9991-9

Baumann, P. (2005). Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology*, *59*(1), 155-189. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121041

Belt, T. (1874). *The naturalist in Nicaragua*. London: J.M. Dent and Sons.

Beltran, S., Cézilly, F., & Boissier, J. (2008). Genetic dissimilarity between mates, but not male heterozygosity, influences divorce in schistosomes. *PLoS ONE*, *3*(10), e3328. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003328

Benjamino, J., & Graf, J. (2016). Characterization of the core and caste-specific microbiota in the termite, *Reticulitermes flavipes*. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 171. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00171

Bennett, G. M., & Moran, N. A. (2015). Heritable symbiosis : The advantages and perils of an evolutionary rabbit hole. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(33), 10169-10176. https://doi.org/10.1073/pnas.1421388112

Berchtold, M., Chatzinotas, A., Schönhuber, W., Brune, A., Amann, R., Hahn, D., & König, H. (1999). Differential enumeration and in situ localization of microorganisms in the hindgut of the lower termite *Mastotermes darwiniensis* by hybridization with rRNA-targeted probes. *Archives of Microbiology*, *172*(6), 407-416. https://doi.org/10.1007/s002030050778

Berlanga, M., Palau, M., & Guerrero, R. (2018). Gut microbiota dynamics and functionality in Reticulitermes grassei after a 7-day dietary shift and ciprofloxacin treatment. *PLOS ONE*, *13*(12), e0209789. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209789

Bézier, A., Annaheim, M., Herbiniere, J., Wetterwald, C., Gyapay, G., Bernard-Samain, S., … Drezen, J.-M. (2009). Polydnaviruses of braconid wasps derive from an ancestral nudivirus. *Science*, *323*(5916), 926-930. https://doi.org/10.1126/science.1166788

Bignell, D. E., & Eggleton, P. (2000). Termites in ecosystems. In T. Abe, D. E. Bignell, & M. Higashi (Éd.), *Termites : Evolution, sociality, symbioses, ecology* (p. 363-387). Springer, Dordrecht.

Birky, C. W. (1995). Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes : Mechanisms and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(25), 11331-11338. https://doi.org/10.1073/pnas.92.25.11331

Blackman, R. L. (1987). Reproduction, cytogenetics and development. In A. K. Minks & P. Harrewijn (Éd.), *Aphids : Their biology, natural enemies and control*: *Vol. A*. Amsterdam: Elsevier.

Bonfante, P., & Anca, I.-A. (2009). Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria : A network of interactions. *Annual Review of Microbiology*, *63*(1), 363-383. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073504

Boscaro, V., James, E. R., Fiorito, R., Hehenberger, E., Karnkowska, A., del Campo, J., … Keeling, P. J. (2017). Molecular characterization and phylogeny of four new species of the genus *Trichonympha* (Parabasalia, Trichonymphea) from lower termite hindguts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *67*(9), 3570-3575. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002169

Bosch, T. C. G., & Miller, D. J. (2016). *The hologenome imperative*. Vienna: Springer.

Boucher, D. H., James, S., & Keeler, K. H. (1982). The ecology of mutualism. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *13*(1), 315-347. https://doi.org/10.1146/annurev.es.13.110182.001531

Bourguignon, T., Lo, N., Cameron, S. L., Šobotník, J., Hayashi, Y., Shigenobu, S., … Evans, T. A. (2015). The evolutionary history of termites as inferred from 66 mitochondrial genomes. *Molecular Biology and Evolution*, *32*(2), 406-421. https://doi.org/10.1093/molbev/msu308

Bourguignon, T., Lo, N., Dietrich, C., Šobotník, J., Sidek, S., Roisin, Y., … Evans, T. A. (2018). Rampant host switching shaped the termite gut microbiome. *Current Biology*, *28*(4), 649-654.e2. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.035

Braendle, C., Miura, T., Bickel, R., Shingleton, A., Kambhampati, S., & Stern, D. L. (2003). Developmental origin and evolution of bacteriocytes in the aphid–*Buchnera* symbiosis. *PLoS Biology*, *1*(1), e21. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000021

Breznak, J. A. (2000). Ecology of prokaryotic microbes in the guts of wood-and litter-feeding termites. In T. Abe, D. E. Bignell, & M. Higashi (Éd.), *Termites : Evolution, sociality, symbioses, ecology* (p. 209-231). Springer, Dordrecht.

Breznak, J. A., & Brune, A. (1994). Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annual Review of Entomology*, *39*, 453-487.

Breznak, J. A., & Leadbetter, J. R. (2006). Termite gut spirochaetes. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, & K. H. Schleifer (Éd.), *The prokaryotes*: *Vol. 7: Proteobacteria: Delta, Epsilon subclasses, deeply rooting bacteria* (p. 318-329). Springer.

Bright, M., & Bulgheresi, S. (2010). A complex journey : Transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(3), 218-230. https://doi.org/10.1038/nrmicro2262

Brossette, L., Bagnères, A.-G., Millot, A., Blanchard, S., Dupont, S., & Lucas, C. (2017). Termite's royal cradle : Does colony foundation success differ between two subterranean species? *Insectes Sociaux*, *64*(4), 515-523. https://doi.org/10.1007/s00040-017-0571-x

Brossette, L., Meunier, J., Dupont, S., Bagnères, A.-G., & Lucas, C. (2019). Unbalanced biparental care during colony foundation in two subterranean termites. *Ecology and Evolution*, *9*(1), 192-200. https://doi.org/10.1002/ece3.4710

Brown, J. L. (1997). A theory of mate choice based on heterozygosity. *Behavioral Ecology*, *8*(1), 60-65. https://doi.org/10.1093/beheco/8.1.60

Brugerolle, G. (2004). Devescovinid features, a remarkable surface cytoskeleton, and epibiotic bacteria revisited in *Mixotricha paradoxa*, a parabasalid flagellate. *Protoplasma*, *224*(1-2), 49-59. https://doi.org/10.1007/s00709-004-0052-8

Brugerolle, G., & Bordereau, C. (2006). Immunological and ultrastructural characterization of spirotrichonymphid flagellates from *Reticulitermes grassei* and *R. flavipes* (syn. *R. santonensis*), with special reference to *Spirotrichonympha*, *Spironympha* and *Microjoenia*. *Organisms Diversity & Evolution*, *6*(2), 109-123. https://doi.org/10.1016/j.ode.2005.07.004

Brugerolle, G., & Lee, J. J. (1985). Order oxymonadida. In J. J. Lee, S. H. Hunter, & E. C. Bovee (Éd.), *An illustrated guide to the protozoa* (p. 1186-1195). Society of Protozoologists.

Brune, A. (1998). Termite guts : The world's smallest bioreactors. *Trends in Biotechnologies*, *16*(1), 16-21. https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01151-7

Brune, A. (2014). Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(3), 168-180. https://doi.org/10.1038/nrmicro3182

Brune, A., & Dietrich, C. (2015). The gut microbiota of termites : Digesting the diversity in the light of ecology and evolution. *Annual Review of Microbiology*, *69*(1), 145-166. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155715

Brune, A., & Stingl, U. (2005). Prokaryotic symbionts of termite gut flagellates : Phylogenetic and metabolic implications of a tripartite symbiosis. In J. Overmann (Éd.), *Molecular basis of symbiosis* (Vol. 41, p. 39-60). https://doi.org/10.1007/3-540-28221-1_3

Buchli, H. (1958). L'origine des castes et les potentialités ontogéniques des termites européens du genre *Reticulitermes* Holmgren. In *Zoologie, 11e série*: *Vol. 20*. *Annales des Sciences Naturelles* (p. 263-429).

Buchli, H. (1960a). Le premier accouplement et la fécondité de la jeune reine imaginale chez *Reticulitermes lucifigus santonensis*. *Vie Milieu*, *11*, 494-499.

Buchli, H. (1960b). Les tropismes lors de la pariade des imagos de *Reticulitermes lucifugus* R. *Vie Milieu*, *11*, 308-311.

Buchner, P. (1965). *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*. John Wiley & Sons Inc.

Bull, J. J. (1994). Virulence. *Evolution*, *48*(5), 1423-1437.

Bull, J. J., Molineux, I. J., & Rice, W. R. (1991). Selection of benevolence in a host-parasite system. *Evolution*, *45*(4), 875-882. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1991.tb04356.x

Bull, J. J., & Rice, W. R. (1991). Distinguishing mechanisms for the evolution of cooperation. *Journal of Theoretical Biology*, *149*(1), 63-74. https://doi.org/10.1016/S0022-5193(05)80072-4

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., … Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines : Minimum Information for Publication of Quantitative real-time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, *55*(4), 611-622. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797

Buxton, P. A. (1955). *The natural history of tsetse plies. An account of the biology of the genus* Glossina *(Diptera).* (Vol. 10).

C

Cafaro, M. J., & Currie, C. R. (2005). Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. *Canadian Journal of Microbiology*, *51*(6), 441-446. https://doi.org/10.1139/w05-023

Campbell, B. C. (1993). Congruent evolution between whiteflies (Homoptera : Aleyrodidae) and their bacterial endosymbionts based on respective 18S and 16S rDNAs. *Current Microbiology*, *26*(3), 129-132. https://doi.org/10.1007/BF01577365

Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gbaldón, T. (2009). trimAl : A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, *25*(15), 1972-1973. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348

Carpenter, K. J., Weber, P. K., Davisson, M. L., Pett-Ridge, J., Haverty, M. I., & Keeling, P. J. (2013). Correlated SEM, FIB-SEM, TEM, and NanoSIMS imaging of microbes from the hindgut of a lower termite : Methods for *in situ* functional and ecological studies of uncultivable microbes. *Microscopy and Microanalysis*, *19*(6), 1490-1501. https://doi.org/10.1017/S1431927613013482

Čepička, I., Dolan, M. F., & Gile, G. H. (2016). Parabasalia. In J. M. Archibald, A. G. B. Simpson, C. H. Slamovits, L. Margulis, M. Melkonian, D. J. Chapman, & J. O. Corliss (Éd.), *Handbook of the protists* (p. 1-44). https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6_8-1

Chapela, I. H., Rehner, S. A., Schultz, T. R., & Mueller, U. G. (1994). Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science*, *266*(5191), 1691-1694. https://doi.org/10.1126/science.266.5191.1691

Chapman, J. R., Nakagawa, S., Coltman, D. W., Slate, J., & Sheldon, B. C. (2009). A quantitative review of heterozygosity–fitness correlations in animal populations. *Molecular Ecology*, *18*(13), 2746-2765. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04247.x

Clark, M. A., Baumann, L., Munson, M. A., Baumann, P., Campbell, B. C., Duffus, J. E., … Moran, N. A. (1992). The eubacterial endosymbionts of whiteflies (homoptera : Aleyrodoidea) constitute a lineage distinct from the endosymbionts of aphids and

mealybugs. *Current Microbiology*, *25*(2), 119-123. https://doi.org/10.1007/BF01570970

Clay, K. (1990). Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *21*, 275-297.

Clément, J.-L., Bagnères, A.-G., Uva, P., Wilfert, L., Quintana, A., Reinhard, J., & Dronnet, S. (2001). Biosystematics of *Reticulitermes* termites in Europe : Morphological, chemical and molecular data. *Insectes Sociaux*, *48*(3), 202-215. https://doi.org/10.1007/PL00001768

Cleveland, L. R. (1923). Symbiosis between termites and their intestinal protozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *9*(12), 424-428.

Cleveland, L. R. (1925a). The effects of oxygenation and starvation on the symbiosis between the termite, *Termopsis*, and its intestinal flagellates. *The Biological Bulletin*, *48*(6), 455-468. https://doi.org/10.2307/1536599

Cleveland, L. R. (1925b). The feeding habit of termite castes and its relation to their intestinal flagellates. *The Biological Bulletin*, *48*(5), 295-308.

Cleveland, L. R. (1926). Symbiosis among animals with special reference to termites and their intestinal flagellates. *The Quarterly Review of Biology*, *1*(1), 51-60.

Cleveland, L. R. (1949). Hormone-induced sexual cycles of flagellates. I. Gametogenesis, fertilization, and meiosis in Trichonympha. *Journal of Morphology*, *85*(2), 197-295. https://doi.org/10.1002/jmor.1050850202

Cleveland, L. R. (1960). Ecdysone induced modifications in the sexual cycles of the protozoa of *Cryptocercus*. *The Journal of Protozoology*, *7*(3), 229-239. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1960.tb00735.x

Cleveland, L. R., & Grimstone, A. V. (1964). The fine structure of the flagellate *Mixotricha paradoxa* and its associated microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *159*(977), 668-686.

Cleveland, L. R., Hall, S. R., Sanders, E. P., & Collier, J. (1934). The wood-feeding roach *Cryptocercus*, its protozoa, and the symbiosis between protozoa and roach. *Memoirs of the American Academy of Arts and Sciences*, *17*(2), 185-327. https://doi.org/10.2307/25058198

Cleveland, L. R., & Nutting, W. L. (1955). Suppression of sexual cycles and death of the protozoa of *Cryptocercus* resulting from change of hosts during molting period. *Journal of Experimental Zoology*, *130*(3), 485-513. https://doi.org/10.1002/jez.1401300306

Coissac, E., Riaz, T., & Puillandre, N. (2012). Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals. *Molecular Ecology*, *21*(8), 1824-1847. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05550.x

Combes, C. (1995). *Interactions durables : Écologie et évolution du parasitisme*. Masson.

Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., … Lipkin, W. I. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, *318*(5848), 283-287. https://doi.org/10.1126/science.1146498

Crosland, M. W. J., Lok, C. M., Wong, T. C., Shakarad, M., & Traniello, J. F. A. (1997). Division of labour in a lower termite : The majority of tasks are performed by older workers. *Animal Behaviour*, *54*(4), 999-1012. https://doi.org/10.1006/anbe.1997.0509

Crozier, R. H., & Pamilo, P. (1996). Evolution of social insect colonies. *Annals of the Entomological Society of America*, *90*(6), 861-862. https://doi.org/10.1093/aesa/90.6.861

Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms : The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(10), 701-712. https://doi.org/10.1038/nrn3346

Currie, C. R., Poulsen, M., Mendenhall, J., Boomsma, J. J., & Billen, J. (2006). Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science*, *311*(5757), 81-83. https://doi.org/10.1126/science.1119744

Currie, C. R., Scott, J. A., Summerbell, R. C., & Malloch, D. (1999). Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, *398*(6729), 701-704. https://doi.org/10.1038/19519

da Costa, R. R., & Poulsen, M. (2018). Mixed-mode transmission shapes termite gut community assemblies. *Trends in Microbiology*, *26*(7), 557-559. https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.04.005

D

Darby, A. C., & Douglas, A. E. (2003). Elucidation of the transmission patterns of an insect-borne bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(8), 4403-4407. https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4403-4407.2003

Darwin, C. (1859). *On the origin of species by means of natural selection, of the preservation of favoured races in the struggle for life*. London: John Murray.

David, P. (1998). Heterozygosity-fitness correlations. *Heredity*, *80*(5), 531-537. https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.1998.00393.x

Davidson, S. K., & Stahl, D. A. (2006). Transmission of nephridial bacteria of the earthworm *Eisenia fetid*. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(1), 769-775. https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.769-775.2006

Dawkins, R. (1976). *The selfish gene*. Oxford University Press.

De Bary, A. (1879). Die erscheinung der symbiose. *Revue internationale des Sciences*, *3*, 301-309.

Dedeine, F., Boulétreau, M., & Vavre, F. (2005). *Wolbachia* requirement for oogenesis : Occurrence within the genus *Asobara* (Hymenoptera, Braconidae) and evidence for intraspecific variation in *A. tabida*. *Heredity*, *95*(5), 394-400. https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800739

Dedeine, F., Dupont, S., Guyot, S., Matsuura, K., Wang, C., Habibpour, B., … Luchetti, A. (2016). Historical biogeography of *Reticulitermes* termites (Isoptera : Rhinotermitidae) inferred from analyses of mitochondrial and nuclear loci. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *94*, 778-790. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.10.020

Dedeine, F., Vavre, F., Fleury, F., Loppin, B., Hochberg, M. E., & Boulétreau, M. (2001). Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(11), 6247-6252. https://doi.org/10.1073/pnas.101304298

Dedeine, F., Vavre, F., Shoemaker, D. D., & Boulétreau, M. (2004). Intra-individual coexistence of a *Wolbachia* strain required for host oogenesis with two strains inducing cytoplasmic incompatibility in the wasp *Asobara tabida*. *Evolution*, *58*(10), 2167-2174. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2004.tb01595.x

Dedeine, F., Weinert, L. A., Bigot, D., Josse, T., Ballenghien, M., Cahais, V., … Gayral, P. (2015). Comparative analysis of transcriptomes from secondary reproductives of three *Reticulitermes* termite species. *PLOS ONE*, *10*(12), e0145596. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145596

Denlinger, D. L., & Ma, W.-C. (1974). Dynamics of the pregnancy cycle in the tsetse *Glossina morsitans*. *Journal of Insect Physiology*, *20*(6), 1015-1026. https://doi.org/10.1016/0022-1910(74)90143-7

Desai, M. S., Strassert, J. F. H., Meuser, K., Hertel, H., Ikeda-Ohtsubo, W., Radek, R., & Brune, A. (2010). Strict cospeciation of devescovinid flagellates and *Bacteroidales* ectosymbionts in the gut of dry-wood termites (Kalotermitidae). *Environmental Microbiology*, *12*(8), 2120-2132. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02080.x

Dietrich, C., Köhler, T., & Brune, A. (2014). The cockroach origin of the termite gut microbiota : Patterns in bacterial community structure reflect major evolutionary events. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(7), 2261-2269. https://doi.org/10.1128/AEM.04206-13

Diouf, M., Hervé, V., Mora, P., Robert, A., Frechault, S., Rouland-Lefèvre, C., & Miambi, E. (2018). Evidence from the gut microbiota of swarming alates of a vertical transmission of the bacterial symbionts in *Nasutitermes arborum* (Termitidae, Nasutitermitinae). *Antonie van Leeuwenhoek*, *111*(4), 573-587. https://doi.org/10.1007/s10482-017-0978-4

Dolan, M. F. (2001). Speciation of termite gut protists : The role of bacterial symbionts. *International Microbiology*, *4*(4), 203-208. https://doi.org/10.1007/s10123-001-0038-8

Douglas, A. E. (1989). Mycetocyte symbiosis in insects. *Biological Reviews*, *64*(4), 409-434.

Douglas, A. E. (2008). Conflict, cheats and the persistence of symbioses. *New Phytologist*, *177*(4), 849-858. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02326.x

Douglas, A. E. (2014). Symbiosis as a general principle in eukaryotic evolution. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(2), a016113-a016113. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016113

Douglas, A. E. (2015). Multiorganismal insects : Diversity and function of resident microorganisms. *Annual Review of Entomology*, *60*(1), 17-34. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020822

Douglas, A. E. (2018). *Fundamentals of microbiome science : How microbes shape animal biology*. Princeton University Press.

Douglas, A. E., & Prosser, W. A. (1992). Synthesis of the essential amino acid tryptophan in the pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*) symbiosis. *Journal of Insect Physiology*, *38*(8), 565-568.

Duarte, S., Duarte, M., Borges, P. A. V., & Nunes, L. (2017). Dietary-driven variation effects on the symbiotic flagellate protist communities of the subterranean termite *Reticulitermes grassei* Clément. *Journal of Applied Entomology*, *141*(4), 300-307. https://doi.org/10.1111/jen.12331

Duarte, S., Nunes, L., Borges, P. A. V., Fossdal, C. G., & Nobre, T. (2017). Living inside termites : An overview of symbiotic interactions, with emphasis on flagellate protists. *Arquipélago, Life and Marine Sciences*, *34*, 21-43.

Duarte, S., Nunes, L., Borges, P. A. V., & Nobre, T. (2018). A bridge too far? An integrative framework linking classical protist taxonomy and metabarcoding in lower termites. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2620. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02620

Dubilier, N., Bergin, C., & Lott, C. (2008). Symbiotic diversity in marine animals : The art of harnessing chemosynthesis. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(10), 725-740. https://doi.org/10.1038/nrmicro1992

Durand, S., Beauché, F., Richard, F.-J., & Beltran-Bech, S. (2015). How do females' genetic characteristics influence male mate preference in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*? *Ethology*, *121*(11), 1122-1130. https://doi.org/10.1111/eth.12429

Durand, S., Loiseau, V., Prigot, C., Braquart-Varnier, C., & Beltran-Bech, S. (2018). Producing offspring in *Armadillidium vulgare* : Effects of genetic diversity and inbreeding. *Evolution & Development*, *20*(2), 65-77. https://doi.org/10.1111/ede.12248

Dykstra, H. R., Weldon, S. R., Martinez, A. J., White, J. A., Hopper, K. R., Heimpel, G. E., … Oliver, K. M. (2014). Factors limiting the spread of the protective symbiont *Hamiltonella defensa* in *Aphis craccivora* aphids. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(18), 5818-5827. https://doi.org/10.1128/AEM.01775-14

E

Eberle, M. W., & McLean, D. L. (1983). Observation of symbiote migration in human body lice with scanning and transmission electron microscopy. *Canadian Journal of Microbiology*, *29*(7), 755-762.

Ebert, A., & Brune, A. (1997). Hydrogen concentration profiles at the oxic-anoxic interface : A microsensor study of the hindgut of the wood-feeding lower termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar). *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(10), 40-39-4046.

Ebert, D. (2013). The epidemiology and evolution of symbionts with mixed-mode transmission. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *44*(1), 623-643. https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-032513-100555

Ebert, D., & Bull, J. J. (2007). The evolution and expression of virulence. In S. C. Stearns & J. C. Koella (Éd.), *Evolution in health and disease* (p. 153-168). https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199207466.003.0012

Ebert, D., & Herre, E. A. (1996). The evolution of parasitic diseases. *Parasitology today*, *12*(3), 96-101.

Eggleton, P. (2011). An introduction to termites : Biology, taxonomy and functional morphology. In D. E. Bignell, Y. Roisin, & N. Lo (Éd.), *Biology of termites : A modern synthesis* (p. 1-26). Springer.

Ehrman, L. (1983). Endosymbiosis. In I. Futuyama & M. Slatkin (Éd.), *Coevolution* (p. 128-137). Sinauer, USA.

Elliott, K. L., & Stay, B. (2007). Juvenile hormone synthesis as related to egg development in neotenic reproductives of the termite *Reticulitermes flavipes*, with observations on

urates in the fat body. *General and Comparative Endocrinology*, *152*(1), 102-110. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.03.003

Elliott, K. L., & Stay, B. (2008). Changes in juvenile hormone synthesis in the termite *Reticulitermes flavipes* during development of soldiers and neotenic reproductives from groups of isolated workers. *Journal of Insect Physiology*, *54*(2), 492-500. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.11.008

Eren, A. M., Borisy, G. G., Huse, S. M., & Mark Welch, J. L. (2014). Oligotyping analysis of the human oral microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(28), E2875-E2884. https://doi.org/10.1073/pnas.1409644111

Eren, A. M., Maignien, L., Sul, W. J., Murphy, L. G., Grim, S. L., Morrison, H. G., & Sogin, M. L. (2013). Oligotyping : Differentiating between closely related microbial taxa using 16S rRNA gene data. *Methods in Ecology and Evolution*, *4*, 1111-1119. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12114

Eren, A. M., Morrison, H. G., Lescault, P. J., Reveillaud, J., Vineis, J. H., & Sogin, M. L. (2015). Minimum entropy decomposition : Unsupervised oligotyping for sensitive partitioning of high-throughput marker gene sequences. *The ISME Journal*, *9*(4), 968-979. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.195

Eren, A. M., Zozaya, M., Taylor, C. M., Dowd, S. E., Martin, D. H., & Ferris, M. J. (2011). Exploring the diversity of *Gardnerella vaginalis* in the genitourinary tract microbiota of monogamous couples through subtle nucleotide variation. *PLoS ONE*, *6*(10), e26732. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026732

Evangelista, D., Thouzé, F., Kohli, M. K., Lopez, P., & Legendre, F. (2018). Topological support and data quality can only be assessed through multiple tests in reviewing Blattodea phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *128*, 112-122. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.05.007

Ewald, P. W. (1983). Host-parasite relations, vectors, and the evolution of disease severity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *14*(1), 465-485. https://doi.org/10.1146/annurev.es.14.110183.002341

Ewald, P. W. (1987). Transmission modes and the evolution of the parasitism-mutualism continuum. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *503*, 295-306.

Ewald, P. W. (1994). *Evolution of infectious disease*. Oxford: Oxford University Press.

F

Ferdy, J., & Godelle, B. (2005). Diversification of transmission modes and the evolution of mutualism. *The American Naturalist*, *166*(5), 613-627. https://doi.org/10.1086/491799

Fierer, N. (2017). Embracing the unknown : Disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(10), 579-590. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87

Fine, P. E. M. (1975). Vectors and vertical transmission : An epidemiologic perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *266*(1 Pathobiology), 173-194. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1975.tb35099.x

Fine, P. E. M., & Sylvester, E. S. (1978). Calculation of vertical transmission rates of infection, illustrated with data on an aphid-borne virus. *The American Naturalist*, *112*(986), 781-786.

Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., & Duncan, S. H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *9*(10), 577-589. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.156

Flórez, L. V., & Kaltenpoth, M. (2017). Symbiont dynamics and strain diversity in the defensive mutualism between *Lagria* beetles and *Burkholderia*. *Environmental Microbiology*, *19*(9), 3674-3688. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13868

Flórez, L. V., Scherlach, K., Gaube, P., Ross, C., Sitte, E., Hermes, C., … Kaltenpoth, M. (2017). Antibiotic-producing symbionts dynamically transition between plant pathogenicity and insect-defensive mutualism. *Nature Communications*, *8*(1), 15172. https://doi.org/10.1038/ncomms15172

Foster, K. R., & Wenseleers, T. (2006). A general model for the evolution of mutualisms. *Journal of Theoretical Biology*, *19*(4), 1283-1293. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.01073.x

Frank, A. B. (1877). Uber die biologischen verhaltnisse des thallus eineger krustenfl echten. *Beitrage zur Biologie der Pflanzen*, *2*, 123-200.

Frank, S. A. (1994). Kin Selection and virulence in the evolution of protocells and parasites. *Proceedings: Biological Sciences*, *258*(1352), 153-161.

Frank, S. A. (1995). Mutual policing and repression of competition in the evolution of cooperative groups. *Nature*, *377*(6549), 520-522. https://doi.org/10.1038/377520a0

Frank, S. A. (1996). Models of parasite virulence. *The Quarterly Review of Biology*, *71*(1), 37-78.

Frank, S. A. (1997). Models of symbiosis. *The American Naturalist*, *150*(S1), S80-S99. https://doi.org/10.1086/286051

Frank, S. A. (1998). *Foundations of social evolution*. Princeton University Press.

Fujishima, M. (2009). *Endosymbionts in* Paramecium (Vol. 12). Springer Science & Business Media.

Fujita, A. I. (2004). Lysozymes in insects : What role do they play in nitrogen metabolism? *Physiological Entomology*, *29*(4), 305-310. https://doi.org/10.1111/j.0307-6962.2004.00393.x

Fukatsu, T., & Hosokawa, T. (2002). Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common Plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(1), 389-396. https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.389-396.2002

Fukatsu, T., & Nikoh, N. (2000). Endosymbiotic microbiota of the bamboo Pseudococcid*Antonina crawii* (Insecta, Homoptera). *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(2), 643-650. https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.643-650.2000

Funkhouser, L. J., & Bordenstein, S. R. (2013). Mom knows best : The universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biology*, *11*(8), e1001631. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001631

G

Gier, H. T. (1936). The morphology and behavior of the intracellular bacteroids of roaches. *The Biological Bulletin*, *71*(3), 433-452.

Gil, R., Silva, F. J., Zientz, E., Delmotte, F., Gonzalez-Candelas, F., Latorre, A., … Moya, A. (2003). The genome sequence of *Blochmannia floridanus* : Comparative analysis of reduced genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(16), 9388-9393. https://doi.org/10.1073/pnas.1533499100

Gilbert, J. A., Blaser, M. J., Caporaso, J. G., Jansson, J. K., Lynch, S. V., & Knight, R. (2018). Current understanding of the human microbiome. *Nature Medicine*, *24*(4), 392.

Gile, G. H., James, E. R., Tai, V., Harper, J. T., Merrell, T. L., Boscaro, V., … Keeling, P. J. (2018). New species of *Spirotrichonympha* from *Reticulitermes* and the relationships among genera in Spirotrichonymphea (Parabasalia). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *65*(2), 159-169. https://doi.org/10.1111/jeu.12447

Glasgow, H. (1914). The gastric caeca and the caecal bacteria of the Heteroptera. *The Biological Bulletin*, *26*(3), 101-170.

Glöckner, F. O., Yilmaz, P., Quast, C., Gerken, J., Beccati, A., Ciuprina, A., … Ludwig, W. (2017). 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of Biotechnology*, *261*, 169-176. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1198

Goetsch, W. (1933). Die chilenischen Termiten. *Zoologische Jahrbücher*, *64*, 227-244.

Goetsch, W. (1936). Beiträge zur biologie des termitenstaates. *Zoomorphology*, *31*(3), 490-560.

Grassé, P. P. (1952). La symbiose flagellés-termites. In *Traité de zoologie : Anatomie, systèmatique, biologie. Tome 1 : Phylogénie protozoaires,généralités flagellés* (p. 945-962). Masson.

Grenier, A. M., Nardon, C., & Nardon, P. (1994). The role of symbiotes in flight activity of *Sitophilus weevils*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *70*(3), 201-208.

Gruwell, M. E., Morse, G. E., & Normark, B. B. (2007). Phylogenetic congruence of armored scale insects (Hemiptera : Diaspididae) and their primary endosymbionts from the phylum Bacteroidetes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *44*(1), 267-280. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.01.014

Gubry-Rangin, C., Garcia, M., & Béna, G. (2010). Partner choice in *Medicago truncatula* – *Sinorhizobium* symbiosis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *277*(1690), 1947-1951. https://doi.org/10.1098/rspb.2009.2072

Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, L., … Christen, R. (2013). The Protist Ribosomal Reference database (PR2) : A catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D597-D604. https://doi.org/10.1093/nar/gks1160

Gundel, P. E., Batista, W. B., Texeira, M., Martínez-Ghersa, M. A., Omacini, M., & Ghersa, C. M. (2008). *Neotyphodium* endophyte infection frequency in annual grass populations : Relative importance of mutualism and transmission efficiency. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *275*(1637), 897-905. https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1494

Gundel, P. E., Garibaldi, L. A., Tognetti, P. M., Aragón, R., Ghersa, C. M., & Omacini, M. (2009). Imperfect vertical transmission of the endophyte *Neotyphodium* in exotic grasses in grasslands of the flooding pampa. *Microbial Ecology*, *57*(4), 740-748. https://doi.org/10.1007/s00248-008-9447-y

Gundel, P. E., Rudgers, J. A., & Ghersa, C. M. (2011). Incorporating the process of vertical transmission into understanding of host-symbiont dynamics. *Oikos*, *120*(8), 1121-1128. https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2011.19299.x

H

Haas, F., & König, H. (1987). Characterisation of an anaerobic symbiont and the associated aerobic bacterial flora of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera : Pyrrhocoridae). *FEMS Microbiology Letters*, *45*(2), 99-106. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02345.x

Haas, F., & König, H. (1988). *Coriobacterium glomerans* gen. Nov., sp. Nov. From the intestinal tract of the red soldier bug. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *38*(4), 382-384. https://doi.org/10.1099/00207713-38-4-382

Haig, D. (1996). Gestational drive and the green-bearded placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(13), 6547-6551. https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6547

Hamilton, W. D. (1964a). The genetical evolution of social behavior 1. *Journal of Theoretical Biology*, *7*(1), 1-16. https://doi.org/10.1016/0022-5193(64)90039-6

Hamilton, W. D. (1964b). The genetical evolution of social behavior 2. *Journal of Theoretical Biology*, *7*(1), 17-52. https://doi.org/10.1016/0022-5193(64)90039-6

Hampl, V. (2016). Preaxostyla. In J. M. Archibald, A. G. B. Simpson, C. H. Slamovits, L. Margulis, M. Melkonian, D. J. Chapman, & J. O. Corliss (Éd.), *Handbook of the protists* (p. 1-36). https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6_8-1

Hansen, A. K., & Moran, N. A. (2011). Aphid genome expression reveals host–symbiont cooperation in the production of amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(7), 2849-2854. https://doi.org/10.1073/pnas.1013465108

Hardin, G. (1968). The tragedy of the commons. *Science*, *162*(3859), 1243-1248. https://doi.org/10.1126/science.162.3859.1243

Hatzenbuhler, C., Kelly, J. R., Martinson, J., Okum, S., & Pilgrim, E. (2017). Sensitivity and accuracy of high-throughput metabarcoding methods for early detection of invasive fish species. *Scientific Reports*, *7*, 46393. https://doi.org/10.1038/srep46393

Hayashi, Y., Lo, N., Miyata, H., & Kitade, O. (2007). Sex-linked genetic influence on caste determination in a termite. *Science*, *318*(5852), 985-987. https://doi.org/10.1126/science.1146711

Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & De Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life : Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(Suppl_1), S96-S99. https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025

Heil, M., Baumann, B., Krüger, R., & Linsenmair, K. E. (2004). Main nutrient compounds in food bodies of Mexican *Acacia* ant-plants. *Chemoecology*, *14*(1), 45-52. https://doi.org/10.1007/s00049-003-0257-x

Heil, M., Gonzalez-Teuber, M., Clement, L. W., Kautz, S., Verhaagh, M., & Bueno, J. C. S. (2009). Divergent investment strategies of *Acacia* myrmecophytes and the coexistence of mutualists and exploiters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(43), 18091-18096. https://doi.org/10.1073/pnas.0904304106

Heil, M., Greiner, S., Meimberg, H., Krüger, R., Noyer, J.-L., Heubl, G., … Boland, W. (2004). Evolutionary change from induced to constitutive expression of an indirect plant resistance. *Nature*, *430*(6996), 205-208. https://doi.org/10.1038/nature02703

Heiss, A. A., & Keeling, P. J. (2006). The phylogenetic position of the oxymonad *Saccinobaculus* based on SSU rRNA. *Protist*, *157*(3), 335-344. https://doi.org/10.1016/j.protis.2006.05.007

Herre, E., Knowlton, N., Mueller, U., & Rehner, S. (1999). The evolution of mutualisms : Exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends in Ecology & Evolution*, *14*(2), 49-53. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01529-8

Herren, J. K., Paredes, J. C., Schüpfer, F., & Lemaitre, B. (2013). Vertical transmission of a *Drosophila* endosymbiont via cooption of the yolk transport and internalization machinery. *mBio*, *4*(2), e00532-12. https://doi.org/10.1128/mBio.00532-12

Hölldobler, B., & Wilson, E. O. (1990). *The ants*. Harvard University Press.

Hongoh, Y. (2011). Toward the functional analysis of uncultivable, symbiotic microorganisms in the termite gut. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *68*(8), 1311-1325. https://doi.org/10.1007/s00018-011-0648-z

Hongoh, Y., Deevong, P., Inoue, T., Moriya, S., Trakulnaleamsai, S., Ohkuma, M., … Kudo, T. (2005). Intra- and interspecific comparisons of bacterial diversity and community structure support coevolution of gut microbiota and termite host. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(11), 6590-6599. https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6590-6599.2005

Hongoh, Y., Ohkuma, M., & Kudo, T. (2003). Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *FEMS Microbiology Ecology*, *44*(2), 231-242. https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00026-6

Hongoh, Y., Sato, T., Noda, S., Ui, S., Kudo, T., & Ohkuma, M. (2007). *Candidatus* Symbiothrix dinenymphae : Bristle-like Bacteroidales ectosymbionts of termite gut protists. *Environmental Microbiology*, *9*(10), 2631-2635. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01365.x

Honigberg, B. M. (1970). Protozoa associated with termites and their role in digestion. In K. Krishna & F. M. Weesner (Éd.), *Biology of termites*: *Vol. II* (p. 1-36). Academic Press.

Hooper, L. V., Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, *336*(6086), 1268-1273. https://doi.org/10.1126/science.1223490

Hosokawa, T., Kikuchi, Y., & Fukatsu, T. (2007). How many symbionts are provided by mothers, acquired by offspring, and needed for successful vertical transmission in an obligate insect-bacterium mutualism? *Molecular Ecology*, *16*(24), 5316-5325. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03592.x

Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Meng, X. Y., & Fukatsu, T. (2005). The making of symbiont capsule in the plataspid stinkbug *Megacopta punctatissima*. *FEMS Microbiology Ecology*, *54*(3), 471-477. https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.06.002

Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Nikoh, N., Shimada, M., & Fukatsu, T. (2006). Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLoS Biology*, *4*(10), e337. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040337

Hosokawa, T., Koga, R., Kikuchi, Y., Meng, X.-Y., & Fukatsu, T. (2010). *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(2), 769-774. https://doi.org/10.1073/pnas.0911476107

Howard, K. J., & Thorne, B. L. (2011). Eusocial evolution of in termites and hymenoptera. In D. E. Bignell, Y. Roisin, & N. Lo (Éd.), *Biology of termites : A modern synthesis* (p. 97-132). Springer.

Howard, R. W., Mallette, E. J., Haverty, M. I., & Smythe, R. V. (1981). Laboratory evaluation of within-species, between species, and parthenogenetic reproduction in *Reticulitermes flavipes* and *Reticulitermes virginicus*. *Psyche*, *88*(1-2), 75-87.

Hugenholtz, P. (2002). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology*, *3*(2), reviews0003.1–0003.8.

I

Iannone, L. J., Novas, M. V., Young, C. A., De Battista, J. P., & Schardl, C. L. (2012). Endophytes of native grasses from South America : Biodiversity and ecology. *Fungal Ecology*, *5*(3), 357-363. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.05.007

Iida, T., Ohkuma, M., Ohtoko, K., & Kudo, T. (2000). Symbiotic spirochetes in the termite hindgut : Phylogenetic identification of ectosymbiotic spirochetes of oxymonad protists. *FEMS Microbiology Ecology*, *34*(1), 17-26. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00750.x

Ikeda-Ohtsubo, W., & Brune, A. (2009). Cospeciation of termite gut flagellates and their bacterial endosymbionts : *Trichonympha* species and ‘ *Candidatus* Endomicrobium trichonymphae’. *Molecular Ecology*, *18*(2), 332-342. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04029.x

Inagaki, T., & Matsuura, K. (2016). Colony-dependent sex differences in protozoan communities of the lower termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera : Rhinotermitidae). *Ecological Research*, *31*(5), 749-755. https://doi.org/10.1007/s11284-016-1387-2

Inoue, J.-I., Noda, S., Hongoh, Y., Ui, S., & Ohkuma, M. (2008). Identification of endosymbiotic methanogen and ectosymbiotic spirochetes of gut protists of the termite *Coptotermes formosanus*. *Microbes and Environments*, *23*(1), 94-97. https://doi.org/10.1264/jsme2.23.94

Inoue, T., Kitade, O., Yoshimura, T., & Yamaoka, I. (2000). Symbiotic associations with protists. In T. Abe, D. E. Bignell, & M. Higashi (Éd.), *Termites : Evolution, sociality, symbioses, ecology* (p. 275-288). Springer, Dordrecht.

Inoue, T., Murashima, K., Azuma, J.-I., Sugimoto, A., & Slaytor, M. (1997). Cellulose and xylan utilisation in the lower termite *Reticulitermes speratus*. *Journal of Insect Physiology*, *43*(3), 235-242. https://doi.org/10.1016/S0022-1910(96)00097-2

Inward, D., Beccaloni, G., & Eggleton, P. (2007). Death of an order : A comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. *Biology Letters*, *3*(3), 331-335. https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0102

J

Jaenike, J., Stahlhut, J. K., Boelio, L. M., & Unckless, R. L. (2010). Association between *Wolbachia* and *Spiroplasma* within *Drosophila neotestacea* : An emerging symbiotic mutualism? *Molecular Ecology*, *19*(2), 414-425. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04448.x

James, E. R., Tai, V., Scheffrahn, R. H., & Keeling, P. J. (2013). *Trichonympha burlesquei* n. Sp. From *Reticulitermes virginicus* and evidence against a cosmopolitan distribution of *Trichonympha agilis* in many termite hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *63*(10), 3873-3876. https://doi.org/10.1099/ijs.0.054874-0

Janowiecki, M. J., Jones, S. C., & Bryant, J. L. (2013). Population growth characteristics of incipient colonies of the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera : Rhinotermitidae). *Sociobiology*, *60*, 441-445. https://doi.org/10.13102/sociobiology.v60i4.441-445

Jansen, R. P., & de Boer, K. (1998). The bottleneck : Mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *145*(1-2), 81-88. https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00173-7

Janzen, D. H. (1966). Coevolution of mutualism between ants and acacias in Central America. *Evolution*, *20*(3), 249-275. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1966.tb03364.x

Janzen, D. H. (1974). Swollen-thorn acacias of Central America. *Smithsonian Contributions to Botany*.

Jasso-Selles, D. E., De Martini, F., Freeman, K. D., Garcia, M. D., Merrell, T. L., Scheffrahn, R. H., & Gile, G. H. (2017). The parabasalid symbiont community of *Heterotermes aureus* : Molecular and morphological characterization of four new species and reestablishment of the genus *Cononympha*. *European Journal of Protistology*, *61*, 48-63. https://doi.org/10.1016/j.ejop.2017.09.001

Jeon, K. W. (1972). Development of cellular dependence on infective organisms : Micrurgical studies in amoebas. *Science*, *176*(4039), 1122-1123.

Johnson, R. A. (1981). Colony development and establishment of the fungus comb in *Microtermes* sp. Nr. *Usambaricus* (Sjöstedt) (Isoptera : Macrotermitinae) from Nigeria. *Insectes Sociaux*, *28*(1), 3-12.

Johnson, R. A., Thomas, R. J., Wood, T. G., & Swift, M. J. (1981). The inoculation of the fungus comb in newly founded colonies of some species of the Macrotermitinae (Isoptera) from Nigeria. *Journal of Natural History*, *15*, 751-756.

Johnstone, R. A., & Bshary, R. (2002). From parasitism to mutualism : Partner control in asymmetric interactions. *Ecology Letters*, *5*(5), 634-639. https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2002.00358.x

Jones, E. I., Afkhami, M. E., Akçay, E., Bronstein, J. L., Bshary, R., Frederickson, M. E., … Friesen, M. L. (2015). Cheaters must prosper : Reconciling theoretical and empirical perspectives on cheating in mutualism. *Ecology Letters*, *18*(11), 1270-1284. https://doi.org/10.1111/ele.12507

K

Kaiwa, N., Hosokawa, T., Nikoh, N., Tanahashi, M., Moriyama, M., Meng, X.-Y., … Fukatsu, T. (2014). Symbiont-supplemented maternal investment underpinning host's ecological adaptation. *Current Biology*, *24*(20), 2465-2470. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.065

Kaltenpoth, M., Goettler, W., Koehler, S., & Strohm, E. (2010). Life cycle and population dynamics of a protective insect symbiont reveal severe bottlenecks during vertical transmission. *Evolutionary Ecology*, *24*(2), 463-477. https://doi.org/10.1007/s10682-009-9319-z

Kaltenpoth, M., Herzner, G., & Strohm, E. (2005). Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. *Current Biology*, *15*, 475-479. https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.12.084

Kaltenpoth, M., Roeser-Mueller, K., Koehler, S., Peterson, A., Nechitaylo, T. Y., Stubblefield, J. W., … Strohm, E. (2014). Partner choice and fidelity stabilize coevolution in a Cretaceous-age defensive symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(17), 6359-6364. https://doi.org/10.1073/pnas.1400457111

Kaltenpoth, M., Schmitt, T., Polidori, C., Koedam, D., & Strohm, E. (2010). Symbiotic streptomycetes in antennal glands of the South American digger wasp genus *Trachypus* (Hymenoptera, Crabronidae). *Physiological Entomology*, *35*(2), 196-200. https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2010.00729.x

Kaltenpoth, M., Winter, S. A., & Kleinhammer, A. (2009). Localization and transmission route of *Coriobacterium glomerans*, the endosymbiont of pyrrhocorid bugs : Localization and transmission route of firebug symbionts. *FEMS Microbiology Ecology*, *69*(3), 373-383. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00722.x

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7 : Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(4), 772-780. https://doi.org/10.1093/molbev/mst010

Keeling, P. J. (2002). Molecular phylogenetic position of *Trichomitopsis termopsidis* (Parabasalia) and evidence for the Trichomitopsiinae. *European Journal of Protistology*, *38*(3), 279-286. https://doi.org/10.1078/0932-4739-00874

Kenkel, C. D., & Bay, L. K. (2018). Exploring mechanisms that affect coral cooperation : Symbiont transmission mode, cell density and community composition. *PeerJ*, *6*, e6047. https://doi.org/10.7717/peerj.6047

Kennedy, E. P., & Lehninger, A. L. (1949). Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *179*(2), 957-972.

Kiers, E. T., Rousseau, R. A., West, S. A., & Denison, R. F. (2003). Host sanctions and the legume–rhizobium mutualism. *Nature*, *425*(6953), 78-81. https://doi.org/10.1038/nature01931

Kikuchi, Y., Hosokawa, T., Nikoh, N., Meng, X.-Y., Kamagata, Y., & Fukatsu, T. (2009). Host-symbiont co-speciation and reductive genome evolution in gut symbiotic bacteria of acanthosomatid stinkbugs. *BMC Biology*, *7*(1), 2. https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-2

Kirby, H. (1949). Systematic differentiation and evolution of flagellates in termites. *Revista de La Sociedad Mexicana de Historia Natural*, *10*, 57-79.

Kitade, O. (2004). Comparison of symbiotic flagellate faunae between termites and a wood-feeding cockroach of the genus *Cryptocercus*. *Microbes and Environments*, *19*(3), 215-220. https://doi.org/10.1264/jsme2.19.215

Kitade, O., Hoshi, M., Odaira, S., Asano, A., Shimizu, M., Hayashi, Y., & Lo, N. (2010). Evidence for genetically influenced caste determination in phylogenetically diverse species of the termite genus *Reticulitermes*. *Biology Letters*, *7*(2), 257-260. https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.0856

Kitade, O., & Matsumoto, T. (1998). Characteristics of the symbiotic flagellate composition within the termite family Rhinotermitidae (Isoptera). *Symbiosis*, *25*(1), 271-278.

Koch, H., Abrol, D. P., Li, J., & Schmid-Hempel, P. (2013). Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees. *Molecular Ecology*, *22*(7), 2028-2044. https://doi.org/10.1111/mec.12209

Koch, H., & Schmid-Hempel, P. (2011). Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(48), 19288-19292. https://doi.org/10.1073/pnas.1110474108

Koga, R., Meng, X.-Y., Tsuchida, T., & Fukatsu, T. (2012). Cellular mechanism for selective vertical transmission of an obligate insect symbiont at the bacteriocyte–embryo interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(20), E1230-E1237. https://doi.org/10.1073/pnas.1119212109

König, H., & Varma, A. (Éd.). (2006). *Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates* (Vol. 6). Springer Science & Business Media.

Konrad, M., Grasse, A. V., Tragust, S., & Cremer, S. (2015). Anti-pathogen protection versus survival costs mediated by an ectosymbiont in an ant host. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1799), 20141976. https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1976

Körner, M., Diehl, J. M. C., & Meunier, J. (2016). Growing up with feces : Benefits of allo-coprophagy in families of the European earwig. *Behavioral Ecology*, *27*(6), 1775-1781. https://doi.org/10.1093/beheco/arw113

Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(17), 5112-5120. https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13

Krishna, K., Grimaldi, D. A., Krishna, V., & Engel, M. S. (2013). Treatise on the Isoptera of the world. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, *377*, 1-2704.

Kutnik, M., Uva, P., Brinkworth, L., & Bagnères, A.-G. (2004). Phylogeography of two European *Reticulitermes* (Isoptera) species : The Iberian refugium. *Molecular Ecology*, *13*(10), 3099-3113. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02294.x

L

Lai, C. Y., Baumann, L., & Baumann, P. (1994). Amplification of trpEG: adaptation of *Buchnera aphidicola* to an endosymbiotic association with aphids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(9), 3819-3823.

Lainé, L. V., & Wright, D. J. (2003). The life cycle of *Reticulitermes* spp. (Isoptera : Rhinotermitidae): what do we know? *Bulletin of Entomological Research*, *93*(4), 267-278. https://doi.org/10.1079/BER2003238

Lamb, P. D., Hunter, E., Pinnegar, J. K., Creer, S., Davies, R. G., & Taylor, M. I. (2019). How quantitative is metabarcoding : A meta-analytical approach. *Molecular Ecology*, *28*(2), 420-430. https://doi.org/10.1111/mec.14920

Lee, M. J., Schreurs, P. J., Messer, A. C., & Zinder, S. H. (1987). Association of methanogenic bacteria with flagellated protozoa from a termite hindgut. *Current Microbiology*, *15*(6), 337-341.

Leeks, A., dos Santos, M., & West, S. A. (2019). Transmission, relatedness, and the evolution of cooperative symbionts. *Journal of Evolutionary Biology*, jeb.13505. https://doi.org/10.1111/jeb.13505

Lefebvre, T., Vargo, E. L., Zimmermann, M., Dupont, S., Kutnik, M., & Bagnères, A.-G. (2016). Subterranean termite phylogeography reveals multiple postglacial colonization events in southwestern Europe. *Ecology and Evolution*, *6*(16), 5987-6004. https://doi.org/10.1002/ece3.2333

Legendre, F., Nel, A., Svenson, G. J., Robillard, T., Pellens, R., & Grandcolas, P. (2015). Phylogeny of Dictyoptera : Dating the origin of cockroaches, praying mantises and termites with molecular data and controlled fossil evidence. *PLoS ONE*, *10*(7), e0130127. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130127

Leidy, J. (1881). *Parasites of the termites*. Collins, Printer.

Leitão-Gonçalves, R., Carvalho-Santos, Z., Francisco, A. P., Fioreze, G. T., Anjos, M., Baltazar, C., … Ribeiro, C. (2017). Commensal bacteria and essential amino acids control food choice behavior and reproduction. *PLOS Biology*, *15*(4), e2000862. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000862

Lenz, M. (1976). Dependence of hormone effects in termite caste determination on external factors. In M. Lüscher (Éd.), *Phase and caste determination in insects : Endcrine aspects* (p. 73-89). Pergamon.

Lewis, J. L., & Forschler, B. T. (2004). Protist communities from four castes and three species of <I>Reticulitermes</I> (Isoptera : Rhinotermitidae). *Annals of the Entomological Society of America*, *97*(6), 1242-1251. https://doi.org/10.1603/0013-8746(2004)097[1242:PCFFCA]2.0.CO;2

Light, S. F., & Weesner, F. M. (1955). The production and replacement of soldiers in incipient colonies of *Reticulitermes hesperus* Banks. *Insectes Sociaux*, *2*(4), 347-354. https://doi.org/10.1007/BF02331511

Lin, D., & Koskella, B. (2015). Friend and foe : Factors influencing the movement of the bacterium *Helicobacter pylori* along the parasitism-mutualism continuum. *Evolutionary Applications*, *8*(1), 9-22. https://doi.org/10.1111/eva.12231

Lindenberg, F., Krych, L., Fielden, J., Kot, W., Frøkiær, H., van Galen, G., … Hansen, A. K. (2019). Expression of immune regulatory genes correlate with the abundance of specific Clostridiales and Verrucomicrobia species in the equine ileum and cecum. *Scientific Reports*, *9*(1), 12674. https://doi.org/10.1038/s41598-019-49081-5

Lipsitch, M., Nowak, M. A., Ebert, D., & May, R. M. (1995). The population dynamics of vertically and horizontally transmitted parasites. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *260*(1359), 321-327.

Lombardo, M. P. (2008). Access to mutualistic endosymbiotic microbes : An underappreciated benefit of group living. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *62*(4), 479-497.

Louca, S., Polz, M. F., Mazel, F., Albright, M. B. N., Huber, J. A., O'Connor, M. I., … Parfrey, L. W. (2018). Function and functional redundancy in microbial systems. *Nature Ecology & Evolution*, *2*(6), 936-943. https://doi.org/10.1038/s41559-018-0519-1

Lu, H., Chang, C., & Wilson, A. C. C. (2016). Amino acid transporters implicated in endocytosis of *Buchnera* during symbiont transmission in the pea aphid. *EvoDevo*, *7*(1), 24. https://doi.org/10.1186/s13227-016-0061-7

Luan, J. B., Shan, H. W., Isermann, P., Huang, J. H., Lammerding, J., Liu, S. S., & Douglas, A. E. (2016). Cellular and molecular remodelling of a host cell for vertical transmission of bacterial symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *283*(1833), 20160580. https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0580

Lüscher, M. (1960). Hormonal control of caste differentiation in termites. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *89*(3), 549-563. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1960.tb27577.x

M

Maekawa, K., Matsumoto, T., & Nalepa, C. A. (2008). Social biology of the wood-feeding cockroach genus *Salganea* (Dictyoptera, Blaberidae, Panesthiinae) : Did ovoviviparity prevent the evolution of eusociality in the lineage? *Insectes Sociaux*, *55*(2), 107-114. https://doi.org/10.1007/s00040-008-0997-2

Maignien, L., DeForce, E. A., Chafee, M. E., Eren, A. M., & Simmons, S. L. (2014). Ecological succession and stochastic variation in the assembly of *Arabidopsis thaliana* phyllosphere communities. *mBio*, *5*(1), e00682-13. https://doi.org/10.1128/mBio.00682-13

Makiola, A., Dickie, I. A., Holdaway, R. J., Wood, J. R., Orwin, K. H., Lee, C. K., & Glare, T. R. (2019). Biases in the metabarcoding of plant pathogens using rust fungi as a model system. *MicrobiologyOpen*, *8*(7), e00780. https://doi.org/10.1002/mbo3.780

Maritz, J. M., Rogers, K. H., Rock, T. M., Liu, N., Joseph, S., Land, K. M., & Carlton, J. M. (2017). An 18S rRNA workflow for characterizing protists in sewage, with a focus on zoonotic trichomonads. *Microbial Ecology*, *74*(4), 923-936. https://doi.org/10.1007/s00248-017-0996-9

Marsh, S. E., Poulsen, M., Pinto-Tomás, A., & Currie, C. R. (2014). Interaction between workers during a short time window is required for bacterial symbiont transmission in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *PLoS ONE*, *9*(7), e103269. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103269

Martinez, J., Longdon, B., Bauer, S., Chan, Y.-S., Miller, W. J., Bourtzis, K., … Jiggins, F. M. (2014). Symbionts commonly provide broad spectrum resistance to viruses in insects : A comparative analysis of *Wolbachia* strains. *PLoS Pathogens*, *10*(9), e1004369. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004369

Martinson, V. G., Danforth, B. N., Minckley, R. L., Rueppell, O., Tingek, S., & Moran, N. A. (2011). A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology*, *20*(3), 619-628. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04959.x

Matsuura, K. (2001). Nestmate recognition mediated by intestinal bacteria in a termite, *Reticulitermes speratus*. *Oikos*, *92*(1), 20-26. https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2001.920103.x

Matsuura, K., Himuro, C., Yamamoto, Y., Vargo, E. L., & Keller, L. (2010). Identification of a pheromone regulating caste differentiation in termites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(29), 12963-12968. https://doi.org/10.1073/pnas.1004675107

Matsuura, K., Mizumoto, N., Kobayashi, K., Nozaki, T., Fujita, T., Yashiro, T., … Vargo, E. L. (2018). A genomic imprinting model of termite caste determination : Not genetic but epigenetic inheritance influences offspring caste fate. *The American Naturalist*, *191*(6), 677-690. https://doi.org/10.1086/697238

Matsuura, K., & Nishida, T. (2001). Comparison of colony foundation success between sexual pairs and female asexual units in the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera : Rhinotermitidae). *Population Ecology*, *43*(2), 119-124. https://doi.org/10.1007/PL00012022

Maynard Smith, J. (1989). *Evolutionary genetics*. Oxford: Oxford University Press.

Mays Jr, H. L., & Hill, G. E. (2004). Choosing mates : Good genes versus genes that are a good fit. *Trends in Ecology & Evolution*, *19*(10), 554-559. https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.07.018

McFall-Ngai, M. (2014). Divining the essence of symbiosis : Insights from the squid-Vibrio model. *PLoS Biology*, *12*(2), e1001783. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001783

McFall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C. G., Carey, H. V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A. E., … Wernegreen, J. J. (2013). Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(9), 3229-3236. https://doi.org/10.1073/pnas.1218525110

Michalik, A., Szklarzewicz, T., Jankowska, W., & Wieczorek, K. (2014). Endosymbiotic microorganisms of aphids (Hemiptera : Sternorrhyncha: Aphidoidea): ultrastructure, distribution and transovarial transmission. *European Journal of Entomology*, *111*(1), 91-104. https://doi.org/10.14411/eje.2014.011

Michaud, C., Hervé, V., Dupont, S., Dubreuil, G., Bézier, A. M., Meunier, J., … Dedeine, F. (2020). Efficient but occasionally imperfect vertical transmission of gut mutualistic protists in a wood-feeding termite. *Molecular Ecology*, 29(2), 308-324. https://doi.org/10.1111/mec.15322

Mikaelyan, A., Dietrich, C., Köhler, T., Poulsen, M., Sillam-Dussès, D., & Brune, A. (2015). Diet is the primary determinant of bacterial community structure in the guts of higher termites. *Molecular Ecology*, *24*(20), 5284-5295. https://doi.org/10.1111/mec.13376

Mikaelyan, A., Köhler, T., Lampert, N., Rohland, J., Boga, H., Meuser, K., & Brune, A. (2015). Classifying the bacterial gut microbiota of termites and cockroaches : A curated

phylogenetic reference database (DictDb). *Systematic and Applied Microbiology*, *38*(7), 472-482. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.07.004

Mira, A., & Moran, N. A. (2002). Estimating population size and transmission bottlenecks in maternally transmitted endosymbiotic bacteria. *Microbial Ecology*, *44*(2), 137-143. https://doi.org/10.1007/s00248-002-0012-9

Mitsuhashi, J., & Kono, Y. (1975). Intracellular microorganisms in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* Uhler (Hemiptera : Deltocephalidae). *Applied Entomology and Zoology*, *10*(1), 1-9.

Miura, T. (2001). Morphogenesis and gene expression in the soldier-caste differentiation of termites: *Insectes Sociaux*, *48*(3), 216-223. https://doi.org/10.1007/PL00001769

Miura, T., Braendle, C., Shingleton, A., Sisk, G., Kambhampati, S., & Stern, D. L. (2003). A comparison of parthenogenetic and sexual embryogenesis of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Hemiptera : Aphidoidea). *Journal of Experimental Zoology*, *295B*(1), 59-81. https://doi.org/10.1002/jez.b.3

Miura, T., & Scharf, M. E. (2011). Molecular basis underlying caste differentiation in termites. In D. E. Bignell, Y. Roisin, & N. Lo (Éd.), *Biology of termites : A modern synthesis* (p. 211-253). Springer.

Montllor, C. B., Maxmen, A., & Purcell, A. H. (2002). Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrthosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology*, *27*(2), 189-195. https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2002.00393.x

Moran, N. A. (2007). Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(Supplement 1), 8627-8633. https://doi.org/10.1073/pnas.0611659104

Moran, N. A., & Dunbar, H. E. (2006). Sexual acquisition of beneficial symbionts in aphids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(34), 12803-12806. https://doi.org/10.1073/pnas.0605772103

Moran, N. A., McCutcheon, J. P., & Nakabachi, A. (2008). Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts. *Annual Review of Genetics*, *42*(1), 165-190. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130119

Moran, N. A., Munson, M. A., Baumann, P., & Ishikawa, H. (1993). A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *253*(1337), 167-171. https://doi.org/10.1098/rspb.1993.0098

Moran, N. A., Ochman, H., & Hammer, T. J. (2019). Evolutionary and ecological consequences of gut microbial communities. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *50*(1), annurev-ecolsys-110617-062453. https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110617-062453

Mouton, L., Henri, H., Boulétreau, M., & Vavre, F. (2003). Strain-specific regulation of intracellular *Wolbachia* density in multiply infected insects. *Molecular Ecology*, *12*(12), 3459-3465. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02015.x

Munson, M. A., Baumann, P., & Kinsey, M. G. (1991). *Buchnera* gen. Nov. And *Buchnera aphidicola* sp. Nov., a taxon consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of aphids. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *41*(4), 566-568. https://doi.org/10.1099/00207713-41-4-566

N

Nagarkar, M., Countway, P. D., Du Yoo, Y., Daniels, E., Poulton, N. J., & Palenik, B. (2018). Temporal dynamics of eukaryotic microbial diversity at a coastal Pacific site. *The ISME Journal*, *12*(9), 2278-2291. https://doi.org/10.1038/s41396-018-0172-3

Najarro, M. A., Sumethasorn, M., Lamoureux, A., & Turner, T. L. (2015). Choosing mates based on the diet of your ancestors : Replication of non-genetic assortative mating in *Drosophila melanogaster*. *PeerJ*, *3*, e1173. https://doi.org/10.7717/peerj.1173

Nakabachi, A., Yamashita, A., Toh, H., Ishikawa, H., Dunbar, H. E., Moran, N. A., & Hattori, M. (2006). The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella*. *Science*, *314*(5797), 267. https://doi.org/10.1126/science.1134196

Nakashima, K., Watanabe, H., Saitoh, H., Tokuda, G., & Azuma, J.-I. (2002). Dual cellulose-digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *32*(7), 777-784. https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00160-6

Nalepa, C. A. (2015). Origin of termite eusociality : Trophallaxis integrates the social, nutritional, and microbial environments. *Ecological Entomology*, *40*(4), 323-335. https://doi.org/10.1111/een.12197

Nalepa, C. A. (2017). What kills the hindgut flagellates of lower termites during the host molting cycle? *Microorganisms*, *5*(4), 82. https://doi.org/10.3390/microorganisms5040082

Nalepa, C. A., Bignell, D. E., & Bandi, C. (2001). Detritivory, coprophagy, and the evolution of digestive mutualisms in Dictyoptera. *Insectes Sociaux*, *48*(3), 194-201. https://doi.org/10.1007/PL00001767

Nardon, P. (1971). Contribution a l'etude des symbiotes ovariens de *Sitophilus sasakii* : Localisation, histochemie et ultrastructure chez la femelle adulte. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*.

Naucke, T. J., & Lorentz, S. (2012). First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasites & Vectors*, *5*(1), 67. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-67

Neves Proença, D., Francisco, R., Kublik, S., Schöler, A., Vestergaard, G., Schloter, M., & Morais, P. V. (2017). The microbiome of endophytic, wood colonizing bacteria from pine trees as affected by pine wilt disease. *Scientific Reports*, *7*(1), 4205. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04141-6

Ni, J., & Tokuda, G. (2013). Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. *Biotechnology Advances*, *31*(6), 838-850. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.005

Noda, H., Watanabe, K., Kawai, S., Yukuhiro, F., Miyoshi, T., Tomizawa, M., … Fukatsu, T. (2012). Bacteriome-associated endosymbionts of the green rice leafhopper *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera : Cicadellidae). *Applied Entomology and Zoology*, *47*(3), 217-225. https://doi.org/10.1007/s13355-012-0110-1

Noda, S., Hongoh, Y., Sato, T., & Ohkuma, M. (2009). Complex coevolutionary history of symbiotic *Bacteroidales* bacteria of various protists in the gut of termites. *BMC Evolutionary Biology*, *9*(1), 158. https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-158

Noda, S., Iida, T., Kitade, O., Nakajima, H., Kudo, T., & Ohkuma, M. (2005). Endosymbiotic Bacteroidales bacteria of the flagellated protist *Pseudotrichonympha grassii* in the gut of the termite *Coptotermes formosanus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(12), 8811-8817. https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8811-8817.2005

Noda, S., Inoue, T., Hongoh, Y., Kawai, M., Nalepa, C. A., Vongkaluang, C., … Ohkuma, M. (2005). Identification and characterization of ectosymbionts of distinct lineages in Bacteroidales attached to flagellated protists in the gut of termites and a wood-feeding cockroach. *Environmental Microbiology*, *8*(1), 11-20. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00860.x

Noda, S., Kawai, M., Nakajima, H., Kudo, T., & Ohkuma, M. (2006). Identification and in situ detection of two lineages of Bacteroidales ectosymbionts associated with a termite gut protist, <i>Oxymonas<i> sp. *Microbes and Environments*, *21*(1), 16-22. https://doi.org/10.1264/jsme2.21.16

Noda, S., Kitade, O., Inoue, T., Kawai, M., Kanuka, M., Hiroshima, K., … Ohkuma, M. (2007). Cospeciation in the triplex symbiosis of termite gut protists (*Pseudotrichonympha* spp.), their hosts, and their bacterial endosymbionts. *Molecular Ecology*, *16*(6), 1257-1266. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03219.x

Noda, S., Ohkuma, M., Yamada, A., Hongoh, Y., & Kudo, T. (2003). Phylogenetic position and in situ identification of ectosymbiotic spirochetes on protists in the termite gut. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(1), 625-633. https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.625-633.2003

Noë, R., & Hammerstein, P. (1994). Biological markets : Supply and demand determine the effect of partner choice in cooperation, mutualism and mating. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *35*, 1-11.

Nogge, G. (1981). Significance of symbionts for the maintenance of an optimal nutritional state for successful reproduction in hematophagous arthropods. In *Parasitology* (Vol. 82). Cambridge University Press.

Nutting, W. L. (1956). Reciprocal protozoan transfaunations between the roach, *Cryptocercus*, and the termite, *Zootermopsis*. *The Biological Bulletin*, *110*(1), 83-90. https://doi.org/10.2307/1538895

Nutting, W. L. (1969). Flight and colony foundation. In K. Krishna & F. M. Weesner (Éd.), *Biology of termites*: *Vol. I* (p. 233-282). Academic Press.

O

Odelson, D. A., & Breznak, J. A. (1983). Volatile fatty acid production by the hindgut microbiota of xylophagous termites. *Applied and Environmental Microbiology*, *45*(5), 1602-1613.

Ohkuma, M. (2008). Symbioses of flagellates and prokaryotes in the gut of lower termites. *Trends in Microbiology*, *16*(7), 345-352. https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.04.004

Ohkuma, M., & Brune, A. (2011). Diversity, structure, and evolution of the termite gut microbial community. In D. E. Bignell, Y. Roisin, & N. Lo (Éd.), *Biology of termites : A modern synthesis* (p. 413-438). Springer.

Ohkuma, M., & Kudo, T. (1996). Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(2), 461-468.

Ohkuma, M., Noda, S., Hattori, S., Iida, T., Yuki, M., Starns, D., … Hongoh, Y. (2015). Acetogenesis from H2 plus CO2 and nitrogen fixation by an endosymbiotic spirochete of a termite-gut cellulolytic protist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(33), 10224-10230. https://doi.org/10.1073/pnas.1423979112

Ohkuma, M., Noda, S., Hongoh, Y., Nalepa, C. A., & Inoue, T. (2009). Inheritance and diversification of symbiotic trichonymphid flagellates from a common ancestor of termites and the cockroach *Cryptocercus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *276*(1655), 239-245. https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1094

Oliver, K. M., Russell, J. A., Moran, N. A., & Hunter, M. S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(4), 1803-1807. https://doi.org/10.1073/pnas.0335320100

Oliver, K. M., & Russell, J. A. (2016). Symbiosis, introduction to. *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, *4*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800049-6.00186-4

Onchuru, T. O., Javier Martinez, A., Ingham, C. S., & Kaltenpoth, M. (2018). Transmission of mutualistic bacteria in social and gregarious insects. *Current Opinion in Insect Science*, *28*, 50-58. https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.05.002

Osborne, S. E., San Leong, Y., O'Neil, S., & Johnson, K. N. (2009). Variation in antiviral protection mediated by different *Wolbachia* strains in *Drosophila simulans*. *PLoS Pathogens*, *5*(11), e1000656. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000656

P

Park, Y. I., & Raina, A. K. (2004). Juvenile hormone III titers and regulation of soldier caste in *Coptotermes formosanus* (Isoptera : Rhinotermitidae). *Journal of Insect Physiology*, *50*(6), 561-566. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.04.002

Perdereau, E., Bagnères, A.-G., Bankhead-Dronnet, S., Dupont, S., Zimmermann, M., Vargo, E. L., & Dedeine, F. (2013). Global genetic analysis reveals the putative native source of the invasive termite, *Reticulitermes flavipes,* in France. *Molecular Ecology*, *22*(4), 1105-1119. https://doi.org/10.1111/mec.12140

Perdereau, E., Bagnères, A.-G., Dupont, S., & Dedeine, F. (2010). High occurrence of colony fusion in a European population of the American termite *Reticulitermes flavipes*. *Insectes Sociaux*, *57*(4), 393-402. https://doi.org/10.1007/s00040-010-0096-z

Perdereau, E., Bagnères, A.-G., Vargo, E. L., Baudouin, G., Xu, Y., Labadie, P., … Dedeine, F. (2015). Relationship between invasion success and colony breeding structure in a subterranean termite. *Molecular Ecology*, *24*(9), 2125-2142. https://doi.org/10.1111/mec.13094

Perotti, M. A., Allen, J. M., Reed, D. L., & Braig, H. R. (2007). Host-symbiont interactions of the primary endosymbiont of human head and body lice. *The FASEB Journal*, *21*(4), 1058-1066. https://doi.org/10.1096/fj.06-6808com

Perotti, M. A., Clarke, H. K., Turner, B. D., & Braig, H. R. (2006). *Rickettsia* as obligate and mycetomic bacteria. *The FASEB Journal*, *20*(13), 2372-2374. https://doi.org/10.1096/fj.06-5870fje

Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In S. A. Bustin (Éd.), *A-Z of quantitative PCR* (p. 89-113). La Jolla, CA: International University Line.

Port, J. A., O'Donnell, J. L., Romero-Maraccini, O. C., Leary, P. R., Litvin, S. Y., Nickols, K. J., … Kelly, R. P. (2016). Assessing vertebrate biodiversity in a kelp forest ecosystem using environmental DNA. *Molecular Ecology*, *25*(2), 527-541. https://doi.org/10.1111/mec.13481

Powell, J. E., Martinson, V. G., Urban-Mead, K., & Moran, N. A. (2014). Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(23), 7378-7387. https://doi.org/10.1128/AEM.01861-14

Prado, S. S., Rubinoff, D., & Almeida, R. P. P. (2006). Vertical transmission of a Pentatomid caeca-associated symbiont. *Annals of the Entomological Society of America*, *99*(3), 577-585. https://doi.org/10.1603/0013-8746(2006)99[577:VTOAPC]2.0.CO;2

Pramono, A. K., Sakamoto, M., Iino, T., Hongoh, Y., & Ohkuma, M. (2015). *Dysgonomonas termitidis* sp. Nov., isolated from the gut of the subterranean termite *Reticulitermes speratus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *65*(2), 681-685. https://doi.org/10.1099/ijs.0.070391-0

Q

QGIS Development Team. (2019). *QGIS Geographic Information System. Open source Geospatial Foundation Project*. http://qgis.osgeo.org

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., … Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project : Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D590-D596. https://doi.org/10.1093/nar/gks1219

R

Radek, R., Meuser, K., Strassert, J. F. H., Arslan, O., Teßmer, A., Šobotník, J., … Brune, A. (2018). Exclusive gut flagellates of Serritermitidae suggest a major transfaunation event in lower termites : Description of *Heliconympha glossotermitis* gen. nov. spec. nov. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *65*(1), 77-92. https://doi.org/10.1111/jeu.12441

Radek, R., & Nitsch, G. (2007). Ectobiotic spirochetes of flagellates from the termite *Mastotermes darwiniensis* : Attachment and cyst formation. *European Journal of Protistology*, *43*(4), 281-294. https://doi.org/10.1016/j.ejop.2007.06.004

Raina, A. K., Park, Y. I., & Gelman, D. (2008). Molting in workers of the Formosan subterranean termite *Coptotermes formosanus*. *Journal of Insect Physiology*, *54*(1), 155-161. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.08.015

Reveillaud, J., Maignien, L., Eren, A. M., Huber, J. A., Apprill, A., Sogin, M. L., & Vanreusel, A. (2014). Host-specificity among abundant and rare taxa in the sponge microbiome. *The ISME Journal*, *8*(6), 1198-1209. https://doi.org/10.1038/ismej.2013.227

Rio, R. V. M., Symula, R. E., Wang, J., Lohs, C., Wu, Y., Snyder, A. K., … Aksoy, S. (2012). Insight into the transmission biology and species-specific functional capabilities of tsetse (Diptera : Glossinidae) obligate symbiont *Wigglesworthia*. *MBio*, *3*(1), e00240-11. https://doi.org/10.1128/mBio.00240-11

Rochaix, J. D. (1985). Genetic organization of the chloroplast. In *International review of cytology* (Vol. 93, p. 57-91). Academic Press.

Rock, D. I., Smith, A. H., Joffe, J., Albertus, A., Wong, N., O'Connor, M., … Russell, J. A. (2018). Context-dependent vertical transmission shapes strong endosymbiont community structure in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Molecular Ecology*, *27*(8), 2039-2056. https://doi.org/10.1111/mec.14449

Roger, A. J., Muñoz-Gómez, S. A., & Kamikawa, R. (2017). The origin and diversification of mitochondria. *Current Biology*, *27*(21), R1177-R1192. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.015

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, *4*, e2584.

Rosenkranz, W. (1939). Die symbiose der Pentatomiden. *Zoomorphology*, *36*(2), 279-309.

Rosenthal, A. Z., Zhang, X., Lucey, K. S., Ottesen, E. A., Trivedi, V., Choi, H. M. T., … Leadbetter, J. R. (2013). Localizing transcripts to single cells suggests an important role of uncultured deltaproteobacteria in the termite gut hydrogen economy. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *110*(40), 16163-16168. https://doi.org/10.1073/pnas.1307876110

Rouland-Lefèvre, C. (2000). Symbiosis with fungi. In T. Abe, D. E. Bignell, & M. Higashi (Éd.), *Termites : Evolution, sociality, symbioses, ecology* (p. 289-306). Springer, Dordrecht.

Rudgers, J. A., Afkhami, M. E., Rúa, M. A., Davitt, A. J., Hammer, S., & Huguet, V. M. (2009). A fungus among us : Broad patterns of endophyte distribution in the grasses. *Ecology*, *90*(6), 1531-1539. https://doi.org/doi.org/10.1890/08-0116.1

Russell, J. A., & Moran, N. A. (2005). Horizontal transfer of cacterial symbionts : Heritability and fitness effects in a novel aphid host. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(12), 7987-7994. https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.7987-7994.2005

Russell, S., Chappell, L., & Sullivan, W. (2019). A symbiont's guide to the germline. *Current Topics in Developmental Biology.*, *135*, 315-351. https://doi.org/10.20944/preprints201901.0149.v1

Russell, S. L. (2019). Transmission mode is associated with environment type and taxa across bacteria-eukaryote symbioses : A systematic review and meta-analysis. *FEMS Microbiology Letters*, *366*(3), fnz013. https://doi.org/10.1093/femsle/fnz013

S

Sacchi, L., Grigolo, A., Laudani, U., Ricevuti, G., & Dealessi, F. (1985). Behavior of symbionts during oogenesis and early stages of development in the German cockroach, *Blattella germanica* (Blattodea). *Journal of Invertebrate Pathology*, *46*(2), 139-152. https://doi.org/10.1016/0022-2011(85)90142-9

Sachs, J. L., Essenberg, C. J., & Turcotte, M. M. (2011). New paradigms for the evolution of beneficial infections. *Trends in Ecology & Evolution*, *26*(4), 202-209. https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.01.010

Sachs, J. L., Mueller, U. G., Wilcox, T. P., & Bull, J. J. (2004). The evolution of cooperation. *The Quarterly Review of Biology*, *79*(2), 135-160.

Sachs, J. L., & Wilcox, T. P. (2005). A shift to parasitism in the jellyfish symbiont *Symbiodinium microadriaticum*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *273*(1585), 425-429.

Sakamoto, M., & Ohkuma, M. (2013). *Bacteroides reticulotermitis* sp. Nov., isolated from the gut of a subterranean termite (*Reticulitermes speratus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *63*(2), 691-695. https://doi.org/10.1099/ijs.0.040931-0

Salem, H., Bauer, E., Kirsch, R., Berasategui, A., Cripps, M., Weiss, B., … Kaltenpoth, M. (2017). Drastic genome reduction in an herbivore's pectinolytic symbiont. *Cell*, *171*(7), 1520-1531.e13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.029

Salem, H., Florez, L., Gerardo, N., & Kaltenpoth, M. (2015). An out-of-body experience : The extracellular dimension for the transmission of mutualistic bacteria in insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1804), 20142957. https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2957

Sato, T., Hongoh, Y., Noda, S., Hattori, S., Ui, S., & Ohkuma, M. (2009). *Candidatus* Desulfovibrio trichonymphae, a novel intracellular symbiont of the flagellate *Trichonympha agilis* in termite gut. *Environmental Microbiology*, *11*(4), 1007-1015. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01827.x

Sato, T., Kuwahara, H., Fujita, K., Noda, S., Kihara, K., Yamada, A., … Hongoh, Y. (2014). Intranuclear verrucomicrobial symbionts and evidence of lateral gene transfer to the host protist in the termite gut. *The ISME Journal*, *8*(5), 1008-1019. https://doi.org/10.1038/ismej.2013.222

Sauer, C., Stackebrandt, E., Gadau, J., Hölldobler, B., & Gross, R. (2000). Systematic relationships and cospeciation of bacterial endosymbionts and their carpenter ant host species : Proposal of the new taxon *Candidatus* Blochmannia gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *50*(5), 1877-1886. https://doi.org/10.1099/00207713-50-5-1877

Scharf, M. E., Buckspan, C. E., Grzymala, T. L., & Zhou, X. (2007). Regulation of polyphenic caste differentiation in the termite Reticulitermes flavipes by interaction of intrinsic and extrinsic factors. *The Journal of Experimental Biology*, *210*(24), 4390-4398. https://doi.org/10.1242/jeb.010876

Scharf, M. E., Ratliff, C. R., Hoteling, J. T., Pittendrigh, B. R., & Bennett, G. W. (2003). Caste differentiation responses of two sympatric *Reticulitermes* termite species to juvenile hormone homologs and synthetic juvenoids in two laboratory assays. *Insectes Sociaux*, *50*(4), 346-354. https://doi.org/10.1007/s00040-003-0690-4

Schauer, C., Thompson, C. L., & Brune, A. (2012). The bacterial community in the gut of the cockroach *Shelfordella lateralis* reflects the close evolutionary relatedness of cockroaches and termites. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(8), 2758-2767. https://doi.org/10.1128/AEM.07788-11

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., … Weber, C. F. (2009). Introducing mothur : Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(23), 7537-7541. https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09

Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., & Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews*, *90*(3), 859-904.

Shapira, M. (2016). Gut microbiotas and host evolution : Scaling up symbiosis. *Trends in Ecology & Evolution*, *31*(7), 539-549. https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.03.006

Sharon, G., Segal, D., Ringo, J. M., Hefetz, A., Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2010). Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(46), 20051-20056. https://doi.org/10.1073/pnas.1009906107

Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y., & Ishikawa, H. (2000). Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature*, *407*(6800), 81.

Shimada, K., Lo, N., Kitade, O., Wakui, A., & Maekawa, K. (2013). Cellulolytic protist numbers rise and fall dramatically in termite queens and kings during colony foundation. *Eukaryotic Cell*, *12*(4), 545-550. https://doi.org/10.1128/EC.00286-12

Shukla, S. P., Vogel, H., Heckel, D. G., Vilcinska, A., & Kaltenpoth, M. (2018). Burying beetles regulate the microbiome of carcasses and use it to transmit a core microbiota to their offspring. *Molecular Ecology*, *27*(8), 1980-1991. https://doi.org/doi.org/10.1111/mec.14269

Simms, E. L., & Taylor, L. D. (2002). Partner choice in nitrogen-fixation mutualisms of legumes and rhizobia. *Integrative & Comparative Biology*, *42*(2), 369-380. https://doi.org/10.1093/icb/42.2.369

Singh, T., & Singh, D. K. (2018). Assessing the bacterial community structure in the rhizoplane of wetland plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *101*(4), 521-526. https://doi.org/10.1007/s00128-018-2426-1

Smith, C. R., Anderson, K. E., Tillberg, C. V., Gadau, J., & Suarez, A. V. (2008). Caste determination in a polymorphic social insect : Nutritional, social, and genetic factors. *The American Naturalist*, *172*(4), 497-507. https://doi.org/10.1086/590961

Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Welch, D. M., Huse, S. M., Neal, P. R., … Herndl, G. J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored ‘‘rare biosphere’’. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(32), 12115-12120.

Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note : A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *44*(4), 846-849. https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-846

Staerkle, M., & Kölliker, M. (2008). Maternal food regurgitation to nymphs in earwigs (*Forficula auricularia*). *Ethology*, *114*(9), 844-850. https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2008.01526.x

Stammer, H. J. (1929). Die symbiose der Lagriiden (Coleoptera). *Zoomorphology*, *15*(1), 1-34.

Stammer, H. J. (1936). Studien an symbiosen zwischen käfern und mikroorganismen. *Zoomorphology*, *31*(4), 682-697.

Stewart, A. D., Logsdon, J. M., & Kelley, S. E. (2005). An empirical study of the evolution of virulence under both horizontal and vertical transmission. *Evolution*, *59*(4), 730-739. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb01749.x

Stingl, U., & Brune, A. (2003). Phylogenetic diversity and whole-cell hybridization of oxymonad flagellates from the hindgut of the wood-feeding lower termite *Reticulitermes flavipes*. *Protist*, *154*(1), 147-155. https://doi.org/10.1078/143446103764928530

Stingl, U., Maass, A., Radek, R., & Brune, A. (2004). Symbionts of the gut flagellate *Staurojoenina* sp. From *Neotermes cubanus* represent a novel, termite-associated lineage of Bacteroidales : Description of '*Candidatus* Vestibaculum illigatum'. *Microbiology*, *150*(7), 2229-2235. https://doi.org/10.1099/mic.0.27135-0

Stingl, U., Radek, R., Yang, H., & Brune, A. (2005). "*Endomicrobia*" : Cytoplasmic symbionts of termite gut protozoa form a separate phylum of prokaryotes. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(3), 1473-1479. https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1473-1479.2005

Strassert, J. F. H., Desai, M. S., Brune, A., & Radek, R. (2009). The true diversity of devescovinid flagellates in the termite *Incisitermes marginipennis*. *Protist*, *160*(4), 522-535. https://doi.org/10.1016/j.protis.2009.04.002

Strassert, J. F. H., Desai, M. S., Radek, R., & Brune, A. (2010). Identification and localization of the multiple bacterial symbionts of the termite gut flagellate *Joenia annectens*. *Microbiology*, *156*(7), 2068-2079. https://doi.org/10.1099/mic.0.037267-0

Strassert, J. F. H., Köhler, T., Wienemann, T. H. G., Ikeda-Ohtsubo, W., Faivre, N., Franckenberg, S., … Brune, A. (2012). *Candidatus* Ancillula trichonymphae, a novel lineage of endosymbiotic Actinobacteria in termite gut flagellates of the genus Trichonympha. *Environmental Microbiology*, *14*(12), 3259-3270. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12012

Sugimoto, A., Bignell, D. E., & MacDonald, J. A. (2000). Global impact of termites on the carbon cycle and atmospheric trace gases. In T. Abe, D. E. Bignell, & M. Higashi (Éd.), *Termites : Evolution, sociality, symbioses, ecology* (p. 409-435). Springer, Dordrecht.

T

Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, *21*(8), 2045-2050. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x

Taerum, S. J., De Martini, F., Liebig, J., & Gile, G. H. (2018). Incomplete co-cladogenesis between *Zootermopsis termites* and their associated protists. *Environmental Microbiology*, *47*(1), 184-195. https://doi.org/10.1093/ee/nvx193

Tai, V., James, E. R., Nalepa, C. A., Scheffrahn, R. H., Perlman, S. J., & Keeling, P. J. (2015). The role of host phylogeny varies in shaping microbial diversity in the hindguts of lower termites. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(3), 1059-1070. https://doi.org/10.1128/AEM.02945-14

Tamschick, S., & Radek, R. (2013). Colonization of termite hindgut walls by oxymonad flagellates and prokaryotes in *Incisitermes tabogae*, *I. marginipennis* and *Reticulitermes flavipes*. *European Journal of Protistology*, *49*(1), 1-14. https://doi.org/10.1016/j.ejop.2012.06.002

Thompson, C. L., Vier, R., Mikaelyan, A., Wienemann, T., & Brune, A. (2012). '*Candidatus* Arthromitus' revised : Segmented filamentous bacteria in arthropod guts are members of Lachnospiraceae. *Environmental Microbiology*, *14*(6), 1454-1465. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02731.x

Thorne, B. L. (1997). Evolution of eusociality in termites. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *28*(1), 27-54.

Thorne, B. L., Breisch, N. L., & Traniello, J. F. A. (1997). Incipient colony development in the subterranean termite *Reticulitermes flavipes* (Isoptera : Rhinotermitidae). *Sociobiology*, *30*(2), 145-159.

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 Microbiology Ecology*, *33*(3), 233-240. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00745.x

Travisano, M., & Velicer, G. J. (2004). Strategies of microbial cheater control. *Trends in Microbiology*, *12*(2), 72-78. https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.12.009

Trivers, R. L. (1971). The evolution of reciprocal altruism. *The Quarterly Review of Biology*, *46*(1), 35-57.

Tsuchida, T., Koga, R., Shibao, H., Matsumoto, T., & Fukatsu, T. (2002). Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Molecular Ecology*, *11*(10), 2123-2135. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01606.x

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, *444*(7122), 1027-1031. https://doi.org/10.1038/nature05414

Tzagoloff, R. J. (1982). Mitochondria. In P. Siekevitz (Éd.), *Cellular organelles* (p. 41-59). Plenum, New York.

U

Usher, K. M., Sutton, D. C., Toze, S., Kuo, J., & Fromont, J. (2005). Inter-generational transmission of microbial symbionts in the marine sponge *Chondrilla australiensis* (Demospongiae). *Marine and Freshwater Research*, *56*(2), 125. https://doi.org/10.1071/MF04304

V

Van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M., … Speelman, P. (2013). Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *New England Journal of Medicine*, *368*(5), 407-415.

Vargo, E. L., & Husseneder, C. (2011). Genetic structure of termite colonies and populations. In D. E. Bignell, Y. Roisin, & N. Lo (Éd.), *Biology of termites : A modern synthesis* (p. 321-347). Springer.

Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R. J., Flaberg, E., Szekely, L., & Olofsson, T. C. (2012). Symbionts as major modulators of insect health : Lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS ONE*, *7*(3), e33188. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033188

Vautrin, E., & Vavre, F. (2009). Interactions between vertically transmitted symbionts : Cooperation or conflict? *Trends in Microbiology*, *17*(3), 95-99. https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.12.002

Venter, P. C., Nitsche, F., & Arndt, H. (2018). The hidden diversity of flagellated protists in soil. *Protist*, *169*(3), 432-449. https://doi.org/10.1016/j.protis.2018.04.007

Vieau, F. (2001). Comparison of the spatial distribution and reproductive cycle of *Reticulitermes santonensis* Feytaud and *Reticulitermes lucifugus grassei* Clément (Isoptera, Rhinotermitidae) suggests that they represent introduced and native species, respectively. *Insectes Sociaux*, *48*(1), 57-62. https://doi.org/10.1007/PL00001746

Vincent, F. J., Colin, S., Romac, S., Scalco, E., Bittner, L., Garcia, Y., … Bowler, C. (2018). The epibiotic life of the cosmopolitan diatom *Fragilariopsis doliolus* on heterotrophic ciliates in the open ocean. *The ISME Journal*, *12*(4), 1094-1108. https://doi.org/10.1038/s41396-017-0029-1

Vogel, H., Shukla, S. P., Engl, T., Weiss, B., Fischer, R., Steiger, S., … Vilcinskas, A. (2017). The digestive and defensive basis of carcass utilization by the burying beetle and its microbiota. *Nature Communications*, *8*(1), 15186. https://doi.org/10.1038/ncomms15186

W

Waidele, L., Korb, J., Voolstra, C. R., Künzel, S., Dedeine, F., & Staubach, F. (2017). Differential ecological specificity of protist and bacterial microbiomes across a set of termite species. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 2518. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02518

Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(16), 5261-5267. https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07

Wang, Y., & Rozen, D. E. (2017). Gut microbiota colonization and transmission in the burying beetle *Nicrophorus vespilloides* throughout development. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*(9), e03250-16. https://doi.org/10.1128/AEM.03250-16

Watanabe, H., & Tokuda, G. (2010). Cellulolytic systems in insects. *Annual Review of Entomology*, *55*(1), 609-632. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085319

Watanabe, K., Yukuhiro, F., Matsuura, Y., Fukatsu, T., & Noda, H. (2014). Intrasperm vertical symbiont transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(20), 7433-7437. https://doi.org/10.1073/pnas.1402476111

Weesner, F. M. (1956). The biology of colony foundation in *Reticulitermes hesperus* Banks. *University of California publications in zoology*, *61*, 253-314.

Weiblen, G. D. (2002). How to be a fig wasp. *Annual Review of Entomology*, *47*(1), 299-330. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145213

Weiss, S., Xu, Z. Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., Gonzalez, A., … Knight, R. (2017). Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome*, *5*(1), 27. https://doi.org/10.1186/s40168-017-0237-y

Weldon, S. R., Strand, M. R., & Oliver, K. M. (2013). Phage loss and the breakdown of a defensive symbiosis in aphids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *208*(1751), 20122103. https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2103

Wenzel, M., Radek, R., Brugerolle, G., & König, H. (2003). Identification of the ectosymbiotic bacteria of *Mixotricha paradoxa* involved in movement symbiosis. *European Journal of Protistology*, *39*(1), 11-23. https://doi.org/10.1078/0932-4739-00893

West, S. A., Kiers, E. T., Simms, E. L., & Denison, R. F. (2002). Sanctions and mutualism stability : Why do rhizobia fix nitrogen? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *269*, 685-694. https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1878

Wilson, D. S. (1975). Theory of group selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *72*(1), 143-146.

Wilson, E. O., & Hölldobler, B. (2005). Eusociality : Origin and consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(38), 13367-13371. https://doi.org/10.1073/pnas.0505858102

Y

Yaffe, M. P. (1999). The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science*, *283*(5407), 1493-1497. https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1493

Yamamura, N. (1993). Vertical transmission and evolution of mutualism from parasitism. *Theoretical Population Biology*, *44*(1), 95-109. https://doi.org/10.1006/tpbi.1993.1020

Yamin, M. A. (1979). Flagellates of the orders Trichomonadida Kirby, Oxymonadida Grassé, and Hypermastigida Grassi & Foa reported from lower termites (Isoptera families Masotermitidae, Kalotermitidae, Hodoternitidae, Termopsidae, Rhinotermitidae, and Serritermitidae) and from the wood-feeding roach *Cryptocercus* (Dictyoptera : Cryptocercidae). *Sociobiology*, *4*(1), 5-119.

Yang, H., Schmitt-Wagner, D., Stingl, U., & Brune, A. (2005). Niche heterogeneity determines bacterial community structure in the termite gut (*Reticulitermes santonensis*). *Environmental Microbiology*, *7*(7), 916-932. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00760.x

Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., … Glöckner, F. O. (2014). The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), D643-D648. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209

Z

Zaremba-Niedzwiedzka, K., Caceres, E. F., Saw, J. H., Bäckström, D., Juzokaite, L., Vancaester, E., … Ettema, T. J. G. (2017). Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*, *541*(7637), 353-358. https://doi.org/10.1038/nature21031

Zchori-Fein, E., & Brown, J. K. (2002). Diversity of prokaryotes associated with <I>Bemisia tabaci</I> (Gennadius) (Hemiptera : Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, *95*(6), 711-718. https://doi.org/10.1603/0013-8746(2002)095[0711:DOPAWB]2.0.CO;2

Zchori-Fein, E., Geden, C. J., & Rutz, D. A. (1992). Microsporidioses of *Muscidifurax raptor* (Hymenoptera : Pteromalidae) and other pteromalid parasitoids of muscoid flies. *Journal of Invertebrate Pathology*, *60*(3), 292-298.

Zhang, H., & Luo, X. M. (2015). Control of commensal microbiota by the adaptive immune system. *Gut Microbes*, *6*(2), 156-160. https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1031946

Annexes

Annexe 1 : Analyses comparatives et traitement statistique des données

Cette annexe explique les traitements statistiques réalisés pour analyser les données des trois études présentées dans ce manuscrit de thèse. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées sous R v3.5.3 (R Core Team, 2019).

ÉTUDE 1 : EFFICACITE DE TRANSMISSION VERTICALE PAR FONDATION DE COLONIES EN LABORATOIRE (θ)

Dans cette première étude, nous avons suivi pendant 92 semaines la survie et la reproduction de 630 couples intra- et inter-espèce de *R. grassei* et *R. flavipes* pour estimer le succès de fondation des colonies en laboratoire. Les données de suivi ont été traitées avec les packages *emmeans* (Lenth, 2019), *frailtypack* (Rondeau & Gonzalez, 2005), *lme4* (Bates, Maechler, Bolker, & Walker, 2015), *survival* (Therneau, 2015) et *survminer* (Kassambara & Kosinski, 2019). Le graphique de Kaplan-Meier a été réalisé avec le package *survminer*. Les autres graphiques ont été réalisés avec *ggplot2* (Wickham, 2016).

Un modèle de Cox a été utilisé pour tester les différences entre les courbes de survie en fonction du facteur 'type de croisement' (intra-grassei, intra-flavipes ou hybrides) et avec le facteur 'modalité de croisement' en aléatoire (packages *survival* et *frailtypack*). Des comparaisons post-hoc entre paires ont ensuite été réalisées en apportant une correction par le taux de fausse découverte (Benjamini & Hochberg, 1995) pour calculer les p-values ajustées (fonction *pairwise.survdiff* du package *survminer*).

Des analyses ont ensuite été réalisées pour tester si des différences de mortalité existaient entre les types de traitement après 14, 65 et 92 semaines de fondation (correspondant aux semaines de suivi de reproduction). Un modèle mixte généralisé en famille binomiale a été utilisé pour tester l'effet 'type de croisement' et le facteur aléatoire 'modalité de croisement' à ces trois dates (package *lme4*). Des tests post-hoc de comparaison de paires ont ensuite été réalisés avec une correction de Tuckey (package *emmeans*).

Aux trois dates de suivi de reproduction, le pourcentage de colonies présentant au moins une larve et le pourcentage de colonies présentant au moins un ouvrier ont été calculés par type de croisement, cette partie est uniquement descriptive. Les nombres de larves et d'ouvriers ont

été moyennés entre les colonies en possédant, et le nombre total des membres de la colonie (parents et descendants) a également été estimé par date et par type de croisement, toutes colonies confondues. Un modèle mixte généralisé a été utilisé pour tester l'effet des facteurs 'type de croisement', 'date' et 'caste des descendants' sur le nombre de larves ou d'ouvriers par colonie en possédant, avec le facteur 'modalité de croisement' en facteur aléatoire et une distribution de Poisson (package *lme4*). Des comparaisons de paires ont été réalisées pour les facteurs significatifs avec une p-value ajustée estimée par la méthode de Tuckey (package *emmeans*).

ÉTUDES 2 ET 3 : ESTIMATION DE LA COMPOSANTE α DU TAUX DE TRANSMISSION DES PROTISTES ET DES BACTÉRIES

Les deuxième et troisième études de cette thèse avaient pour objectifs d'estimer les valeurs de la composante α de transmission des protistes et des bactéries dans deux populations du termite *R. grassei* en caractérisant les communautés symbiotiques intestinales de pools d'ouvriers et d'alates individuels provenant de 24 colonies. Les analyses réalisées sur les données de métabarcoding et de PCRq ont été chargées avec les packages *ade4* (Dray & Dufour, 2007), *exactRankTests* (Horthorn & Hornik, 2017), *lme4* (Bates *et al*., 2015), *lmerTest* (Kuznetsova, Brockhoff, & Christensen, 2017), *microbiome* (Lathi, Shetty, Blake, & Salojarvi, 2017), *mvabund* (Wang, Naumann, Wright, & Warton, 2012), *phyloseq* (McMurdie & Holmes, 2013), *stats* et *vegan* (Oksanen *et al*., 2018). Le package *ggplot2* (Wickham, 2016) a été utilisé pour le design des graphiques. Les deux jeux de données protistes (étude 2) ont été analysés indépendamment car les deux régions ribosomales 18S étudiées ne sont pas les mêmes. Cependant, les modèles statistiques des jeux de données oxymonades et parabasaliens ont été construits en parallèle.

Diversité et structure des communautés symbiotiques

La richesse observée en bactéries, oxymonades et parabasaliens a été estimée par le nombre d'OTUs dans les échantillons. Cette richesse a été analysée de façon indépendante entre les pools d'ouvriers et les alates individuels. Pour les trois jeux de données, la richesse observée dans les 24 pools d'ouvriers a été analysée par un modèle linéaire testant les effets 'population' et 'haplotype mitochondrial'. Un modèle linéaire mixte a été utilisé sur la richesse observée dans les alates individuels pour tester les effets 'population', 'sexe' et 'haplotype mitochondrial' ainsi que l'effet 'colonie' comme facteur aléatoire. Une transformation au carré

de la richesse observée en oxymonades et parabasaliens dans les alates a été réalisée pour répondre aux conditions requises de normalité et d'homoscédasticité des résidus. La structure globale des communautés de bactéries et de protistes (*i.e.*, la composition prenant en compte l'abondance relative des différents OTUs) dans les échantillons a été analysée avec des modèles linéaires généralisés (GLMs) pour les données d'abondance multivariées en utilisant le package *mvabund*. Après l'étude des données, une distribution binomiale négative a été assumée. La significativité statistique des GLMs a été testée par une analyse de la déviance des GLMs, réalisée avec un test de rééchantillonnage de Monte Carlo (1 000 itérations) et un test de ratio de vraisemblance. Ces GLMs ont été utilisées pour tester (i) les effets 'population' et 'haplotype mitochondrial' sur la structure en OTUs des ouvriers, (ii) les effets 'population', 'sexe' et 'haplotype mitochondrial' sur la structure en OTUs des alates, et (iii) les effets 'colonie' et 'sexe' sur la structure en OTUs des alates. Pour le jeu de données des alates, les effets 'population' et 'colonie' n'ont pas pu être testés dans la même analyse GLMs car ce sont des facteurs confondants. La structure des communautés symbiotiques dans les échantillons a graphiquement été représentée par une analyse en coordonnées principales basée sur une matrice de dissimilarité de Bray-Curtis (prenant en compte les abondances relatives des échantillons) calculée avec le package *vegan*.

Corrélation entre protistes et bactéries

Dans les intestins de termites, de nombreuses bactéries sont ecto- ou endosymbiotes de protistes. Afin d'analyser si une corrélation existait entre les bactéries et protistes présents dans un même échantillon, des tests de Mantel ont été réalisés avec le package *vegan* entre les matrices d'OTUs bactérienne et parabasalienne et entre les matrices d'OTUs bactérienne et oxymonade. Les matrices de dissimilarité ont tout d'abord été générées avec la méthode de Bray-Curtis puis ont été comparées par la méthode de Pearson avec 999 permutations.

Variation de la composition des communautés symbiotiques entre les colonies

La composition (*i.e.*, présence ou absence) des communautés de symbiotes de chaque colonie a été déterminée pour les OTUs (bactéries et protistes) et les taxa niveau espèce (protistes uniquement). Afin d'augmenter la probabilité d'inclure tous les OTUs ou espèces présents dans une colonie ; tous les taxa détectés dans les 14 alates et le pool d'ouvriers ont été additionnés. Les cores symbiotiques bactérien, oxymonade et parabasalien de *R. grassei* ont été déterminés avec le package *microbiome* comme les OTUs partagés par au moins 95 % des colonies des deux populations. Pour les jeux de données oxymonades et parabasaliens, une

analyse de cluster hiérarchique des colonies a été réalisée par méthode complète avec une distance binaire avec le package *stats* (fonction *hclust*) afin de voir la clusterisation des colonies en fonction de leur communauté de protistes (aux niveaux OTUs et espèce).

Dans un second temps, la composition de ces communautés par colonie a permis de déterminer la prévalence (p_o) de tous les OTUs, et de toutes les espèces, dans la population qui représente simplement la fréquence d'un OTU donné, ou d'une espèce, parmi les 12 colonies étudiées dans la population.

Proportion de *Trichonympha* dans les ouvriers individuels

Les proportions respectives de *Trichonympha* TgA et TgB dans chaque ouvrier individuel a été estimé en divisant l'abondance relative des *Trichonympha* TgA, ou TgB, par l'abondance relative totale des *Trichonympha* (TgA + TgB) quantifiée par PCRq. La différence de proportion entre les deux espèces de *Trichonympha* dans chaque ouvrier a été testée avec un test de rangs signés de Wilcoxon (*i.e.*, avec données appariées). La différence de proportion en *Trichonympha* TgA dans les individus entre les colonies a été analysée avec un test de rangs exact de Wilcoxon (package *exactRankTests*).

Composantes du taux de transmission

L'efficacité de la transmission verticale des symbiotes d'une colonie à la descendance peut être définie comme la probabilité θ qu'un symbiote présent dans une colonie parentale soit également présent dans la colonie fondée par un alate provenant de cette colonie parentale. Avec (i) la probabilité α qu'un symbiote présent dans une colonie soit également présent dans un alate essaimant de cette colonie, et (ii) la probabilité β qu'un symbiote présent dans un alate soit également présent dans la colonie fondée par cet alate, alors $\theta = \alpha . \beta$. Dans cette thèse, seule la probabilité α a été mesurée. Ce paramètre a été estimé de façon empirique pour chaque OTU présent dans une colonie donnée comme la fréquence de cet OTU parmi les 14 alates (7 femelles et 7 mâles) essaimant de cette colonie. La probabilité α est également appelée 'composante α du taux de transmission' et a simplement été mentionnée comme 'valeur α' dans le texte, les tables et les figures.

Taux de transmission par colonie

Dans un premier temps, nous avons étudié les valeurs α à l'échelle des colonies. Pour cela, nous avons étudié par colonie la proportion d'OTUs en fonction de la fréquence des OTUs dans les alates de cette colonie, c'est-à-dire la proportion d'OTUs du pool colonial présents

dans les 14 alates, la proportion de ceux présents dans 13 alates et ce jusqu'à la proportion d'OTUs uniquement présents dans le pool d'ouvriers. Pour calculer ces proportions, le nombre d'OTUs par fréquence dans les alates (valeur α) a été rapporté au nombre total d'OTUs dans la colonie. Ces proportions d'OTUs en fonction de leur fréquence dans les alates à l'échelle coloniale ont été estimées pour les 14 alates confondus (femelles et mâles confondus) et par sexe pour étudier le potentiel effet de celui-ci sur les valeurs α. Afin de comprendre les facteurs influençant ces proportions d'OTUs, un modèle linéaire mixte a été utilisé sur les jeux de données oxymonade et parabasalien pour tester les effets 'population', 'sexe', 'valeurs α' et 'haplotype mitochondrial' ainsi que l'effet 'colonie' comme facteur aléatoire (package *lme4*). Des transformations log(x+1) ont été réalisées sur les variables réponses des jeux de données bactérien et protiste, respectivement, pour qu'elles satisfassent aux conditions prérequises (normalité et homoscédasticité des résidus du modèle). Un modèle linaire mixte a ensuite été utilisé pour voir si les effets 'sexe' et 'OTU' comme facteurs fixes et 'colonie' comme facteur aléatoire avaient une influence sur les valeurs α des protistes. Cette dernière analyse est la seule incluant à la fois les données des oxymonades et des parabasaliens. Ces analyses ont été construites avec le package *lme4*.

Pour le jeu de données bactérien, les OTUs ont été classés en deux groupes selon leur assignation taxonomique : le groupe I représentant les OTUs spécifiques aux intestins de termites et blattes subsociales, et le groupe II représentant les autres OTUs. La proportion d'OTUs de groupe I et la proportion d'OTUs de groupe II ont été déterminées par colonie en fonction de leur fréquence dans les alates. Un modèle linéaire mixte a ensuite été construit avec le package *lme4* pour savoir si les effets 'population', 'sexe', 'valeur α', 'haplotype mitochondrial' et 'groupe de l'OTU' influençaient ces proportions d'OTUs, avec le facteur 'colonie' en aléatoire. Une transformation log(x+1) de la variable réponse a permis de répondre aux conditions d'homoscédasticité et de normalité des résidus du modèle.

Taux de transmission moyen par population

Dans un second temps, nous avons travaillé sur les valeurs α à l'échelle des populations. Pour cela, les valeurs α ont été moyennées pour chaque OTU (ou espèce) entre les colonies d'une population portant cet OTU (ou espèce). Ces valeurs α moyennes ont été calculées pour les populations d'Oléron et de Pissos par sexe, mais également en prenant en compte tous les alates (femelles et mâles confondus) pour les jeux de données protistes. Les proportions d'OTUs en fonction de leur fréquence dans les alates de la colonie ont également été estimées. Pour les deux jeux de données protistes, ces résultats ont uniquement été descriptifs. Pour le jeu

de données bactérien, un modèle linéaire généralisé avec une famille quasi-Poisson a permis de tester les facteurs 'population', valeur α moyenne' et 'sexe' sur la proportion d'OTUs de la population dans les alates. Pour les bactéries, le groupe des OTUs (I ou II) a également été testé. La variable réponse a été transformé en log(x+0.1). Des descriptions et heatmaps sur la transmission des OTUs des cinq phyla bactériens les plus abondants dans le jeu de données ont été réalisées. Nous avons également regardé si tous les alates partaient avec toutes les grandes fonctions métaboliques des bactéries.

Lien entre taux de transmission et prévalence des symbiotes dans les populations

Une analyse globale a été réalisée afin de déterminer si les valeurs α moyennes des OTUs sont un facteur pertinent pour expliquer leur prévalence (p_o) dans les populations. Cette analyse a permis de tester les effets 'valeurs α moyennes', 'sexe' et 'population' sur la prévalence des OTUs dans les populations. Pour les données oxymonade et parabasalien, cette analyse a été réalisée en deux temps car les données de prévalence comportaient une grande quantité de 1 (biais envers les 1). Dans la première partie de l'analyse, les OTUs avec une prévalence parfaite (p_o=1) ont été comparés avec les autres OTUs (p_o<1) en utilisant une GLM avec une famille binomiale. La seconde partie de l'analyse a été focalisée uniquement sur les OTUs avec une prévalence inférieure à 1 en utilisant un modèle linéaire. Les données de la variable réponse ont été transformées au carré pour répondre aux conditions de normalité et d'homoscédasticité des résidus. Pour les bactéries, cette analyse a été réalisée avec un modèle linéaire testant les trois facteurs cités précédemment ainsi que le facteur 'spécificité'. Une transformation au carré a été réalisée sur les données de prévalence pour satisfaire aux conditions prérequises.

Une seconde analyse a également été menée pour les jeux de données oxymonades et parabasaliens. Un modèle simple a été développé pour tester si les taux de transmission estimés étaient un facteur majeur expliquant la prévalence des espèces de protistes dans les populations. Les prévalences théoriques (p_e) des espèces de protistes ont été estimées à partir des valeurs α moyennes et des prévalences observées (p_o) dans les populations, en se plaçant dans un système panmictique sans pression de sélection. Les valeurs des prévalences théoriques et observées ont ensuite été comparées avec un test de rangs exact de Wilcoxon en données appariées (package *exactRankTests*).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, *67*(1), 1-48. https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01

Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate : A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Societies: Series B (Methodological)*, *57*(1), 289-300. https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x

Dray, S., & Dufour, A. (2007). The ade4 package : Implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, *22*(4), 1-20. https://doi.org/10.18637/jss.v022.i04

Horthorn, T., & Hornik, K. (2017). exactRankTests : Exact distributions for rank and permutation tests (R package version 0.8-29). https://CRAN.R-project.org/package=exactRankTests

Kassambara, A., & Kosinski, M. (2019). survminer : Drawing survival curves using « ggplot2 » (R package version 0.4.4). https://CRAN.R-project.org/package=survminer

Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., & Christensen, R. H. B. (2017). lmerTest package : Tests in linear mixed effects models. *Journal of Statistical Software*, *82*(13), 1-26. https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13

Lathi, L., Shetty, S., Blake, T., & Salojarvi, J. (2017). *Microbiome R package*. http://microbiome.github.io

Lenth, R. (2019). emmeans : Estimated marginal means, aka least-squares means (R package version 1.3.5.1). https://CRAN.R-project.org/package=emmeans

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq : An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, *8*(4), e61217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., … Wagner, H. (2018). vegan : Community ecology package (R package version 2.5-2). https://CRAN.R-project.org/package=vegan

R Core Team. (2019). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*. https://www.R-project.org/

Rondeau, V., & Gonzalez, J. R. (2005). frailtypack : A computer program for the analysis of correlated failure time data using penalized likelihood estimation. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, *80*(2), 154-164. https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2005.06.010

Therneau, T. M. (2015). A package for survival analysis in R (Version 2.38). https://CRAN.R-project.org/package=survival

Wang, Y. I., Naumann, U., Wright, S. T., & Warton, D. I. (2012). Mvabund–an R package for model-based analysis of multivariate abundance data. *Methods in Ecology and Evolution*, *3*(3), 471-474. https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00190.x

Wickham, H. (2016). *ggplot2 : Elegant graphics for data analysis*. Springer

Annexe 2 : Article 1 publié dans *Molecular Ecology*

Cette annexe est l'article présentant les données de transmission sur les protistes soumis dans *Molecular Ecology* le 11 septembre 2019 et qui a définitivement été accepté le 27 novembre 2019.

Received: 11 September 2019 | Revised: 26 November 2019 | Accepted: 27 November 2019

DOI: 10.1111/mec.15322

ORIGINAL ARTICLE

MOLECULAR ECOLOGY WILEY

Efficient but occasionally imperfect vertical transmission of gut mutualistic protists in a wood-feeding termite

Caroline Michaud[1] | Vincent Hervé[2] | Simon Dupont[1] | Géraldine Dubreuil[1] | Annie M. Bézier[1] | Joël Meunier[1] | Andreas Brune[2] | Franck Dedeine[1]

[1]Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, UMR 7261, CNRS – Université de Tours, Tours, France

[2]Research Group Insect Gut Microbiology and Symbiosis, Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology, Marburg, Germany

Correspondence
Franck Dedeine, Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, UMR 7261, CNRS – Université de Tours, Tours, France.
Email: franck.dedeine@univ-tours.fr

Funding information
French Research Foundation (ANR), Grant/Award Number: JC08_331895; Région Centre Val de Loire (*Xylobiotic* IA 2015-2017); Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); Deutscher Akademischer Austauschdienst; Deutsche Forschungsgemeinschaft; Max Planck Society

Abstract

Although mutualistic associations between animals and microbial symbionts are widespread in nature, the mechanisms that have promoted their evolutionary persistence remain poorly understood. A vertical mode of symbiont transmission (from parents to offspring) is thought to ensure partner fidelity and stabilization, although the efficiency of vertical transmission has rarely been investigated, especially in cases where hosts harbour a diverse microbial community. Here we evaluated vertical transmission rates of cellulolytic gut oxymonad and parabasalid protists in the wood-feeding termite *Reticulitermes grassei*. We sequenced amplicons of the 18S rRNA gene of protists from 24 colonies of *R. grassei* collected in two populations. For each colony, the protist community was characterized from the gut of 14 swarming reproductives and from a pool of 10 worker guts. A total of 98 operational taxonomic units belonging to 13 species-level taxa were found. The vertical transmission rate was estimated for each protist present in a colony based on its frequency among the reproductives. The results revealed that transmission rates were high, with an average of 0.897 (±0.164) per protist species. Overall, the protist community did not differ between reproductive sexes, suggesting that both the queen and the king could contribute to the gut microbiota of the offspring. A positive relationship between the transmission rate of protists and their prevalence within populations was also detected. However, transmission rates alone do not explain the prevalence of protists. In conclusion, these findings reveal key forces behind a conserved, multispecies mutualism, raising further questions on the roles of horizontal transfer and negative selection in shaping symbiont prevalence.

KEYWORDS
biparental transmission, gut microbiota, nutritional mutualism, Rhinotermitidae, symbiont prevalence, symbiosis

1 | INTRODUCTION

Beneficial symbiotic microorganisms are widespread among multicellular eukaryotes and often confer novel phenotypic traits that allow the hosts to enlarge or even change their ecological niche (Bosch & Miller, 2016; Douglas, 2014; Margulis & Fester, 1991; Maynard Smith, 1989; McFall-Ngai et al., 2013; Moran, 2007). This unique access to novel phenotypic traits helps to explain why microbial mutualistic symbioses, in which both the host and its symbionts benefit from the association, are broadly considered keystones of

many ecosystems (Kenkel & Bay, 2018; Kiers, Palmer, Ives, Bruno, & Bronstein, 2010). However, despite the large amount of research conducted on host–symbiont interactions, the mechanisms by which mutualistic symbioses persist and evolve remain poorly understood in many nonmodel symbiotic systems.

The perpetuation of host–symbiont associations typically requires the transmission of symbionts to new suitable hosts, a process that can be horizontal, vertical or mixed (Bright & Bulgheresi, 2010; Ebert, 2013; Russell, 2019). On the one hand, vertically transmitted (VT) symbionts are passed from one parent (usually the mother) or, more rarely, from both parents to the offspring (Fine, 1975). On the other, horizontally transmitted (HT) symbionts are transferred between host individuals that have no direct filial relationship, although the host donor and receiver of symbionts can be related (Fine, 1975). HT symbionts can be transferred between hosts directly through contacts or indirectly via the environment. The horizontal and vertical modes of transmission are not mutually exclusive. Many VT symbionts can indeed occasionally be transferred among unrelated hosts belonging to the same or different species (Dedeine, Boulétreau, & Vavre, 2005), while some HT symbionts can sometimes be passed to the host offspring (Naucke & Lorentz, 2012).

The symbiont transmission mode across host generations is a key factor mainly because it has major consequences for the stability and evolutionary trajectory of symbioses (Akçay, 2015; Ebert, 2013; Ewald, 1987; Fine, 1975; Sachs, Mueller, Wilcox, & Bull, 2004; Salem, Florez, Gerardo, & Kaltenpoth, 2015; Yamamura, 1993). Until recently, studies aiming to analyse the mode and efficiency of symbiont transmission were mostly conducted in simple symbiotic systems in which hosts harbour a single (or a few) symbiont species (Gundel et al., 2009; Hosokawa, Kikuchi, & Fukatsu, 2007; Jansen & de Boer, 1998). By contrast, relatively few studies have been conducted in systems where numerous symbiont taxa interact with each other and with the host. Theoretical studies indeed have indicated that interactions among symbiotic taxa within hosts can lead to competition for resources and transmission, thus potentially destabilizing the mutualistic symbiosis (Frank, 1996). The most complex examples of such host-associated microbial communities (or "microbiota") are found in the digestive tract of certain mammals or cockroaches, in which the number of interacting microbial taxa can exceed several hundreds (Browne, Neville, Forster, & Lawley, 2017; Brune & Dietrich, 2015; Engel & Moran, 2013). Further empirical studies are needed to better understand the role of vertical transmission in the maintenance of such complex mutualistic associations.

The so-called "lower" termites (i.e., all termites except members of the family Termitidae) are eusocial cockroaches that exclusively feed on wood (Bignell & Eggleton, 2000) and exhibit complex host-associated microbial communities. The evolution of their xylophagous diet was estimated to ~170–140 million years ago (Bourguignon et al., 2018; Evangelista, Thouzé, Kohli, Lopez, & Legendre, 2018), and was associated with several modifications including social life, a drastic enlargement of the hindgut, and the acquisition of a complex microbial community composed of bacteria, archaea and flagellate protists (Brune & Dietrich, 2015; Nalepa, 2015). It has become clear that protists in particular play a crucial role in lignocellulose digestion in lower termites (Brune, 2014; Brune & Ohkuma, 2011; Cleveland, 1923). Hundreds of gut protists belonging to the phylum Parabasalia and to the order Oxymonadida (phylum Preaxostyla) have been described (Cepicka, Hampl, & Kulda, 2010; Hampl, 2016; Ohkuma & Brune, 2011; Yamin, 1979). At the genus level, these protists have only been found in the hindgut of termites and they depend strictly on their hosts for the anoxic habitat and food supplies. The hindgut of termite workers typically harbours several protist species, which may act synergistically for optimal degradation of lignocellulose (Inoue, Kitade, Yoshimura, & Yamaoka, 2000; Yoshimura,1995). Initial investigations on these symbioses suggested that termite–protist associations are rather specific and evolutionarily stable (Kitade, 2004). Recent phylogenetic analyses indicated that the evolutionary codiversification between lower termites and their gut protists is mostly characterized by cospeciation, although occasional events of host switching and symbiont loss were also evidenced (Desai et al., 2010; Noda et al., 2007; Radek et al., 2018; Taerum, De Martini, Liebig, & Gile, 2018).

Little is known about vertical transmission of gut protists in termites, although it is widely recognized that termite–protist associations represent one of the very rare examples of biparental transmission (Grassé,1982; Nalepa, Bignell, & Bandi, 2001). The foundation of new termite colonies is typically ensured by a pair of winged reproductives, hereafter called "alates," that swarmed from two distinct and usually unrelated colonies (Vargo & Husseneder, 2011). In the established royal monogamous couples, the king survives and regularly inseminates the queen even after the first larvae have hatched. Both parents can potentially pass their symbionts to the offspring by a specific behaviour called "proctodaeal trophallaxis" during which symbiont-rich fluids are transferred from the anus of the queen or king to the mouth of the larvae (Grassé & Noirot, 1945; McMahan, 1969). In growing colonies, proctodaeal trophallaxis allows symbionts to be transferred among nestmates, which include workers and future alates (i.e., nymphs). Current knowledge suggests that protists living in termite colonies are initially brought by the pair of alates, especially because it is largely assumed that these anaerobic protists are specific to lower termites and incapable of surviving outside their hosts (Inoue et al.,2000). However, one cannot rule out that horizontal transmission by direct contact among termite colonies might represent another mechanism of protists acquisition, although this hypothesis has not yet been tested. Regardless, colony foundation may represent a major but overlooked factor shaping the diversity and composition of the microbial community within termite colonies and populations.

Vertical transmission in termites can be defined as the transfer of a symbiont from a parental colony to a descendant colony. To be transmitted, a symbiont therefore needs to pass two crucial steps. First, it must be present in all swarming alates that successfully founded a new colony (transmission step 1), and second, it must be transferred from each of these successful alates (male or female) to its offspring (transmission step 2). Characterizing the gut microbial community of individual alates when swarming is crucial to estimate

symbiont transmission. However, to date, only a few studies have analysed the diversity and composition of the microbial community in these reproductives (Benjamino & Graf, 2016; Diouf et al., 2018; Lewis & Forschler, 2004).

In the present study, we aimed to estimate the transmission efficiency and prevalence of gut protists in two French populations of the lower termite *Reticulitermes grassei* Clément (Blattoidea: Termitoidea, Rhinotermitidae). This species is common in the Iberian Peninsula and along the Atlantic coast of France. Like all members of this termite genus, *R. grassei* is associated with a diverse community of oxymonad and parabasalid flagellate protists comprising 10 genera (Honigberg, 1970; Kitade & Matsumoto, 1998; Yamin, 1979). To reach our main objective, we first analysed the diversity and structure of oxymonad and parabasalid communities in populations of *R. grassei* by using a high-throughput sequencing approach of two specific regions of the 18S rRNA gene, namely one specific region for oxymonads and another specific for parabasalids. We then estimated the efficiency of the first transmission step (i.e., from colony to alates) of these protists. Our second objective was to test the hypothesis that vertical transmission rates of gut protists constitute a relevant factor to explain their prevalence within host populations.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Termite sampling

A total of 24 termite colonies of *Reticulitermes grassei* were sampled in two populations 160 km apart (Figure S1). Twelve colonies were collected in April 2017 from one population located in the area of Oléron Island (Charente-Maritime, France), and 12 colonies were collected in April 2018 from a second population located in the forest of Pissos (Landes, France). For both populations, we sampled termites during the first week of April, the period during which alate-destined seventh instar nymphs in *R. grassei* are about to moult into alates (Vieau, 2001). We sampled a fragment of each colony made up of a piece of log or dead branch containing about 500–3,000 termite individuals among which alate-destined nymphs were present. All the 24 colony fragments were collected on pine tree (*Pinus pinaster*) and directly placed in plastic boxes (24 x 18 x 10 cm) containing sterile humid sand. Species identity was confirmed by sequencing the mitochondrial cytochrome oxidase subunit 2 (COII) gene from one worker per colony as previously described (Dedeine et al., 2016). Sequences (accession numbers are given in the "data availability" section) were then compared with a set of reference sequences available in GenBank.

2.2 | Sample preparation

In the laboratory (1–3 days after the collection date), boxes containing colonies were maintained under standard conditions (i.e., 26 ± 1°C; 80% relative humidity and a 13.5-hr/10.5-hr light–dark cycle) and set up to allow alates to swarm. To do this, boxes were opened and placed in larger plastic containers (36 x 24 x 14 cm) containing sterile humid sand. This set-up allowed swarming alates to exit their initial box by flying and to land in the larger box. Within 12 hr after swarming, alates were collected, sexed and placed individually in plastic Petri dishes (50 mm in diameter) containing sterile humid sand. Within the next 12 hr, individual guts were dissected and placed in 80 µl of T1 extraction buffer (Nucleo-Spin Tissue XS, Macherey-Nagel), and stored at −80°C until DNA extraction. The guts of seven males and seven females from each colony were prepared. For each colony, we also prepared a single sample with pooled guts of 10 workers. To do this, 10 large workers, of stage L6 or L7, were chosen randomly and placed in a Petri dish (50 mm in diameter) containing sterile humid sand. After 48 hr, the 10 individuals were dissected, and guts were pooled together into 80 µl of T1 extraction buffer (Nucleo-Spin Tissue, Macherey-Nagel) and placed at −80°C until DNA extraction.

2.3 | DNA extraction, PCRs and high-throughput sequencing

Genomic DNA was extracted from pooled worker guts and individual alate guts using Nucleo-Spin Tissue and NucleoSpin Tissue XS extraction kits, respectively, following the manufacturer instructions. Before the lysis step, a sterile stainless-steel bead (5 mm, Qiagen) was placed in each tube and samples were ground using a Tissue-Lyser II (Qiagen) for 30 s at 30 Hz. Two PCR amplifications were performed for each sample in a final volume of 30 µl to amplify a 450-bp portion of the V3–V4 region of oxymonad 18S rRNA genes (Oxy_18S-F: 5′-ATCAGAWACCGYCGTAGTC-3′, Oxy_18S-R: 5′-GGGCATMACRGACCTGTTA-3′) and a 450-bp portion of the V3–V4 region of parabasalid 18S rRNA genes (Par_18S-F: 5′-GCAGCAGGCGYGAAAC-3′, Par_18S-R: 5′-CCTACTCTCGCYCTTGATCG-3′). For each PCR (polymerase chain reaction), 3 µl of MTP Taq buffer 10× (Merck), 0.6 µl of dNTP mix (10 mM, Merck), 0.6 µl of each primer (20 µM), 0.3 µl of MTP Taq DNA Polymerase (Merck) and 13.5 µl of water (Merck) were mixed with 1 µl (worker pools) or 2 µl (individual alates) of DNA template. PCR amplifications were performed with 1 min at 94°C followed by 30 cycles composed of 1 min at 94°C, 30 s at 55°C and 1 min at 72°C, and a final step at 72°C for 10 min. Fifty microlitres of PCR product was then sent to the GeT-PlaGe genomic platform (GenoToul), which performed library preparation and 2 × 250 paired-end Illumina Miseq sequencing.

2.4 | Sequence processing

Sequence denoising was performed using MOTHUR software version 1.41.1 (Schloss et al., 2009) mainly following the MiSeq data standard operation procedure (Kozich, Westcott, Baxter, Highlander, & Schloss, 2013). Contigs were assembled between pairs of reads

(16,756,548 and 16,646,584 reads were obtained for oxymonad and parabasalid data sets, respectively), and then primer sequences were removed. Reads shorter than 400 bp or longer than 420 bp and reads containing ambiguous bases or homopolymers longer than 8 bp were excluded. Sequences were aligned using SILVA version 132 as the reference database and preclustered (pre.cluster, diffs = 1). Singletons were excluded and chimeras were removed using VSEARCH (Rognes, Flouri, Nichols, Quince, & Mahé, 2016). Subsequently, sequences were classified with PR2 taxonomy version 4.11.1 (Guillou et al., 2013) for the oxymonad data set, and with SILVA taxonomy version 132 (Glöckner et al., 2017; Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014) for the parabasalid data set, using a naive Bayesian classifier (Wang, Garrity, Tiedje, & Cole, 2007). Only sequences assigned to the Oxymonadida and Parabasalia clades were retained for further analyses. Each data set was normalized by rarefaction to the lowest number of sequences present in a sample by randomly resampling 8,167 and 12,366 reads for each of the 360 samples for oxymonads and parabasalids, respectively (Weiss et al., 2017). To date, there is no clearly defined threshold of similarity to cluster oxymonad or parabasalid sequences into operational taxonomic units (OTUs) reflecting species-level identity (Duarte, Nunes, Borges, Nobre, & Waite, 2018). Thus, we decided to use an unsupervised oligotyping method, namely minimum entropy decomposition (MED), to cluster our sequences into nodes (Eren et al., 2015). In the present study, nodes were referred to as OTUs for convenience. For both oxymonad and parabasalid data sets, the default parameters of the MED algorithm were used (Eren et al., 2015). Finally, representative sequences of the OTUs were classified using a naive Bayesian classifier (Wang et al., 2007) with in-house oxymonad- and parabasalid-specific databases that include numerous clone sequences from Blattodea guts available at https://github.com/brunelab/databases.

2.5 | Specific analyses of *Trichonympha* protists

Phylogenetic diversity and abundance of the parabasalids of the genus *Trichonympha* were analysed using a cloning/sequencing standard approach (Supporting Information). The analysis of full-length 18S rRNA sequences from isolated *Trichonympha* cells allowed precise determination of the phylogenetic diversity of this genus in *R. grassei*. Results of this pilot study revealed the presence of two phylogenetically well-supported taxa of the genus *Trichonympha*, *Trichonympha* sp. A and *Trichonympha* sp. B, hereafter named "TgA" and "TgB," which coexist within termite individuals (for a detailed description of methods and results of this pilot study, see Supporting Information).

To validate the 18S rRNA gene metabarcoding approach conducted on worker pools, a quantitative PCR (qPCR) protocol was developed to detect and quantify TgA and TgB in individual workers. Genomic DNA of 18 individual worker guts from four colonies (18B30, 18B33, 18B34 and 18B35) were dissected and extracted with the Nucleo-Spin Tissue XS kit as described below, except that 10 ng of an exogenous *Orf128* gene from the *Cotesia congregata* wasp (Bézier et al., 2009) was added in the tube before the extraction step as an exogene for the normalization step. DNA elution was done using 30 µl of elution buffer and then tubes were kept at −20°C. For each individual worker sample, the relative abundance of the two *Trichonympha* species was estimated by amplifying three specific genes: one specific to TgA (qPCR_TgA-F: 5′-CCGCCAAATATTAGCTRATRYTA-3′, qPCR_TgA-R: 5′-ATTCTTTCGAAGTATAAAATATCC-3′), one specific to TgB (qPCR_TgB-F: 5′-TGGAKACATGAATACTTTAGCG-3′, qPCR_TgB-R: 5′-CCCATAAGYATGGACAATCC-3′) and one specific to *Orf128* (qPCR_Orf128-F: 5′-AGCGACCAACCTTCATTTACG-3′, qPCR_Orf128-R: TAGCGCGGAAGCTCAGTAATC). qPCR amplifications were conducted on a QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR (Thermo Scientific) with MESA Blue qPCR Mastermix Plus for SYBR Assay kit (Eurogentec). All amplifications were performed in triplicate assays and obtained after 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min. To assess the specificity of the PCR amplification, a melting curve analysis of the amplicon was performed at the end of each reaction and a single peak was always observed. Standard curves were established for the three genes with five serial dilutions of purified amplicons generated by classical PCR. To conclude for a significant amplification, three steps were conducted. Negative controls were first verified. A CT threshold value for each of the three targeted genes was defined. When the CT value was higher than the defined CT threshold value, the targeted gene was considered absent from the studied sample. The relative abundance of TgA and TgB in an individual worker sample was normalized with the amount of *Orf128* molecules detected in the same sample.

2.6 | Data analyses

All statistical analyses were performed using R version 3.5.2 (R Core Team, 2018) loaded with the packages EXACTRANKTESTS (Horthorn & Hornik, 2007), LME4 (Bates, Maechler, Bolker, & Walker, 2015), MICROBIOME (Lathi, Shetty, Blake, & Salojarvi, 2017), MVABUND (Wang, Naumann, Wright, & Warton, 2012), PHYLOSEQ (Mcmurdie & Holmes, 2013), STATS and VEGAN (Oksanen et al., 2018). The package GGPLOT2 (Wickham & Chang, 2016) was used for graphic design. All statistical models were conducted separately on the oxymonad and parabasalid datasets.

2.6.1 | Diversity and structure of protist communities

The observed richness of oxymonads and parabasalids, which were estimated by the number of characterized OTUs, were analysed separately in pooled-worker and alate samples. The effect of the "population" factor on observed richness in the 24 pooled-worker samples was tested by using an exact rank sum test (EXACTRANKTESTS package). A linear model was used on observed richness in individual-alate samples, in which population, sex and their interaction were entered as factors, while colony ID was nested in the population factor. A

squared transformation of the observed richness in alates was performed to satisfy residual normality and homoscedasticity. The global structure of protist communities was analysed with generalized linear models (GLMs) for multivariate abundance data (MVABUND package). The statistical significance of the GLMs was tested with an analysis of deviance of the GLMs, performed with Monte Carlo resampling (1,000 iterations) and likelihood ratio tests. These GLMs were used for testing (a) the effect of population on protist OTU structure in workers, (b) the respective effects of population and sex on protist OTU structure in alates, and (c) the effects of colony and sex on protist structure in alates. For the alate data set, the effects of population and colony could not be tested in the same GLMs because of confounding factors. We graphically represented the structure of protist community in samples by principal coordinates analysis (PCoA) based on Bray–Curtis dissimilarity matrices (VEGAN package).

2.6.2 | Variation of protist community composition among colonies

The composition of the protist community (i.e., the identity of all OTUs) of each colony was then determined. To increase the probability of including all OTUs present in a colony, all protist taxa detected in the 14 alates as well as in the worker pool were summed. In a second analysis, the composition of each protist community per colony was used to determine the observed prevalence (p_o) of all OTUs within a population, a parameter that represents, for a given OTU, its frequency among the 12 colonies studied within populations.

2.6.3 | Proportion of *Trichonympha* protists in individual workers

The respective proportion of the two *Trichonympha* species, TgA and TgB, in each individual worker sample was estimated by dividing the relative abundance of TgA or TgB by the total abundance of *Trichonympha* (TgA+TgB) quantified by qPCR. The difference in the proportion between species within samples was tested using a Wilcoxon signed rank test. A significant difference in the proportion of *Trichonympha* TgA between colonies was detected by performing an exact Wilcoxon rank sum test (EXACTRANKTESTS package).

2.6.4 | Components of transmission rate

Transmission rate was defined as the probability θ that a symbiont present in a parental colony is also present in a descendant colony (i.e., a colony founded by one alate that swarmed from the parental colony). If we consider: (a) the probability α that a symbiont present in a colony is also present in an alate swarming from this colony, and (b) the probability β that a symbiont present in an alate is also present in the colony founded by this alate, then we can express the equation $\theta = \alpha \cdot \beta$, with values of θ, α and β all between 0 and 1. In this study, only the probability α was empirically estimated for each OTU present in a given colony as the frequency of this OTU among the 14 alates (seven females and seven males) swarming from this colony. The probability α was thereafter designated as "the α component of the transmission rate" and its value was simply referred as "α value" in the text, tables and figures. To determine if the sex of alates influenced their protist community composition, a linear mixed model was constructed on α values for testing the effect of "sex" and "OTU" as fixed factors and "colony" as a random variable (LME4 package). This analysis included both oxymonad and parabasalid data sets.

Several analyses were conducted to determine whether the transmission rate of protists represents a relevant factor to explain their prevalence within populations. The α value of each OTU was averaged on all colonies harbouring this OTU within populations. A first analysis tested the respective effects of "average α value," "sex" and "population" on the prevalence of OTUs within populations. Because the prevalence of many OTUs in populations was 100%, a two-part model was conducted. In the first part of the analysis, OTUs that had a prevalence of 100% were compared with OTUs that had a lower prevalence by using a GLM with a binomial family. The second part of the analysis focused only on OTUs with prevalence lower than 100% and used a linear model. A squared transformation on the response variable was applied to satisfy required conditions of normality and homoscedasticity of residuals.

Finally, we developed a simple model of population genetics in order to test the hypothesis according to which the transmission rate of a protist taxon represents the main factor explaining its prevalence in a population. Theoretical values of protist prevalence (p_e) were calculated and compared with observed values of prevalence (p_o) in the Oléron and Pissos populations using an exact Wilcoxon signed rank test. The three assumptions of this model were: (a) mating system in the population was panmictic (i.e., microbiota composition does not affect mating choice); (b) there was no selection relative to gut microbiota (i.e., microbiota composition does not affect either the reproductive success or the survival of individuals and colonies); and (c) the β component of the vertical transmission rate, referred as β value, was identical among individual alates whatever the composition of their microbiota. In a population, the theoretical value of prevalence (p_e) of a given taxon was then calculated as follows:

$$p_e = 1 - [(1 - p_o) + p_o(1 - \alpha)]^2$$

where "$[(1 - p_o) + p_o(1 - \alpha)]^2$" is the probability that both the queen and the king founding the colony did not harbour the protist taxon, with "$1 - p_o$" being the probability that an alate did not bring the protist taxon because its parental colony did not harbour it, and with "$p_o(1 - \alpha)$" being the probability that an alate did not bring the protist

taxon from its parental colony because the α component of transmission rate was not perfect.

3 | RESULTS

Two sequence data sets (i.e., one for oxymonads, one for parabasalids), each including sequences obtained from the same 360 samples (i.e., 336 individual alates and 24 pools of worker guts), were generated and analysed (both sequence data sets are available via the "Data accessibility" section). After sequence processing, a total of 2,849,038 and 4,393,966 sequences were obtained for oxymonads and parabasalids, respectively.

3.1 | Taxonomic assignation

All detailed information on oxymonad and parabasalid OTUs, including their assignation scores, the associated number of sequences as well as their taxonomy, are given in Tables S1 and S2. For the oxymonad data set, MED analysis resulted in 67 OTUs assigned to seven species-level taxa belonging to two genera (*Pyrsonympha* and *Dinenympha*) of the family Pyrsonymphidae (Figure 1a). The number of sequences ranged from 741 (for OTU454) to 762,231 (for OTU605), with an average of 42,523 sequences per oxymonad OTU. For the parabasalid data set, MED analysis resulted in 31 OTUs assigned to six species-level taxa belonging to five genera (*Trichonympha*, Holomastigotoididae genus A, Trichomonadidae genus A, *Cthylla* and *Spirotrichonymphella*) and four families (Figure 1b). The number of sequences ranged from 1,467 (for OTU253) to 1,027,101 (for OTU274), with an average of 141,741 sequences per parabasalid OTU. The analysis of full-length 18S rRNA sequences from isolated *Trichonympha* cells (see Supporting Information) allowed us to complete our taxonomic reference library for this parabasalid genus. Each *Trichonympha* OTU was then assigned to *Trichonympha* TgA or TgB, respectively.

3.2 | Diversity of gut protist communities

Comparisons of the observed richness (i.e., the number of OTUs) of protist communities within colonies were first conducted using sequences from worker pools. The average number of OTUs per colony did not differ significantly between Oléron and Pissos populations (for oxymonads: $W = 82$, $p = .577$; for parabasalids: $W = 44$, $p = .103$). On average, worker pools harboured 78 OTUs (55 oxymonads and 23 parabasalids) for both populations. In alates, the individual number of oxymonad OTUs ranged from 32 to 63 with an average of 52. This number differed significantly between populations ($F_{(1,311)} = 63.025$; $p < 10^{-13}$), between sexes ($F_{(1,311)} = 4.804$; $p = .029$) and between colonies within populations ($F_{(22,311)} = 16.731$, $p < 10^{-15}$). However, the effect of sex should be taken with caution because this factor was no longer significant when two samples (17A14_fa07 and 18B22_fa09) with extreme low values were removed from the data set. The number of parabasalid OTUs per individual alate ranged from 10 to 29 with an average of 22. This number differed significantly between populations ($F_{(1,311)} = 52.261$; $p < 10^{-11}$), between colonies within populations ($F_{(22,311)} = 29.809$; $p < 10^{-15}$), but not between sexes ($F_{(1,311)} = 0.006$; $p = .937$). Overall, these analyses showed that the richness of protist communities varied significantly among colonies within and between populations. On the other hand, the richness of gut protists harboured by male and female alates seemed to be quite similar.

3.3 | Structure among protist communities

PCoAs were conducted on oxymonad and parabasalid communities using either worker pools (Figure S2a,b) or individual alates (Figure S2c,d). Statistical analyses of sequence data sets obtained from worker pools showed that the structure of communities differed significantly between Oléron and Pissos populations for both parabasalids and oxymonads (Table S3). In alates, the structure of oxymonad and parabasalid communities varied significantly between populations and among colonies (Table S3). Interestingly, this analysis highlighted the existence of a significant interaction between the factors "colony" and "sex," suggesting that the structure of protist communities can vary between sexes according to colonies (Table S3).

3.4 | Variation of protist community among colonies

The protist community composition of a given colony was assessed by the sum of all OTUs detected in the worker pool and the 14 individual alates studied in the considered colony. Somewhat surprisingly, each of the 24 colonies had a unique community of OTUs differing by at least one OTU (Figure S3a). However, 57 oxymonad OTUs out of 67 (85.1%) and 19 parabasalid OTUs out of 31 (61.2%) were shared by at least 95% of the colonies (Table S4). Furthermore, variation of protist community composition among colonies disappeared almost completely when analyses were conducted on species-level protist taxa instead of OTUs (Figure S3b). Twenty-one colonies out of 24 (87.5%) indeed harboured all species-level taxa detected in this study (seven oxymonads and six parabasalids). The three exceptions were observed in colonies from Pissos. The oxymonad species *Dinenympha fimbriata* was not found in colony 18B22, whereas the two parabasalid TgA and Trichomonadidae genus A were not detected in colony 18B25 and 18B32, respectively (Figure S3b).

3.5 | Detection and quantification of *Trichonympha* species (TgA and TgB) by qPCR

Study of protist community composition revealed several cases for which a protist taxon found in the alates of a colony was not detected (no read assigned) in the worker pool from the same colony. For instance, in four colonies of Pissos (i.e., 18B19, 18B22, 18B33

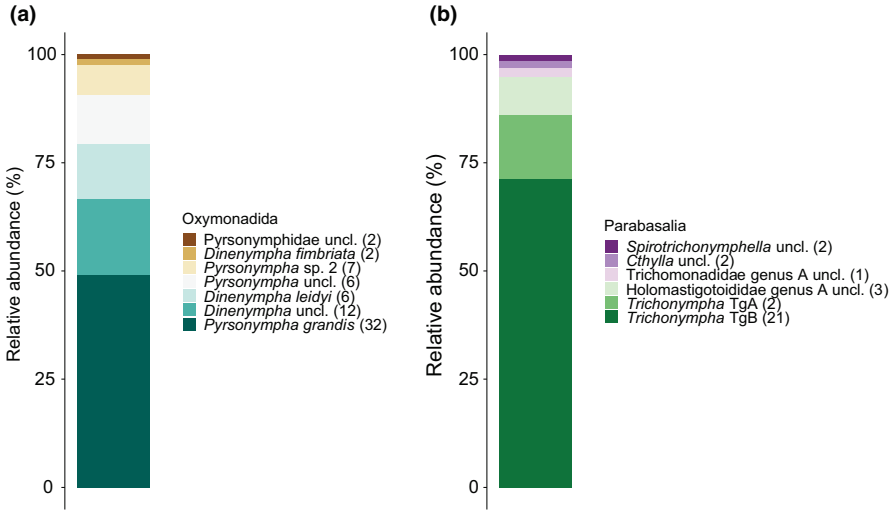


FIGURE 1 (a) Oxymonad and (b) parabasalid species-level assignation results and relative abundance in data sets. Numbers in parentheses represent corresponding OTU number assigned to the species-level taxa. Uncl.: unclassified [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

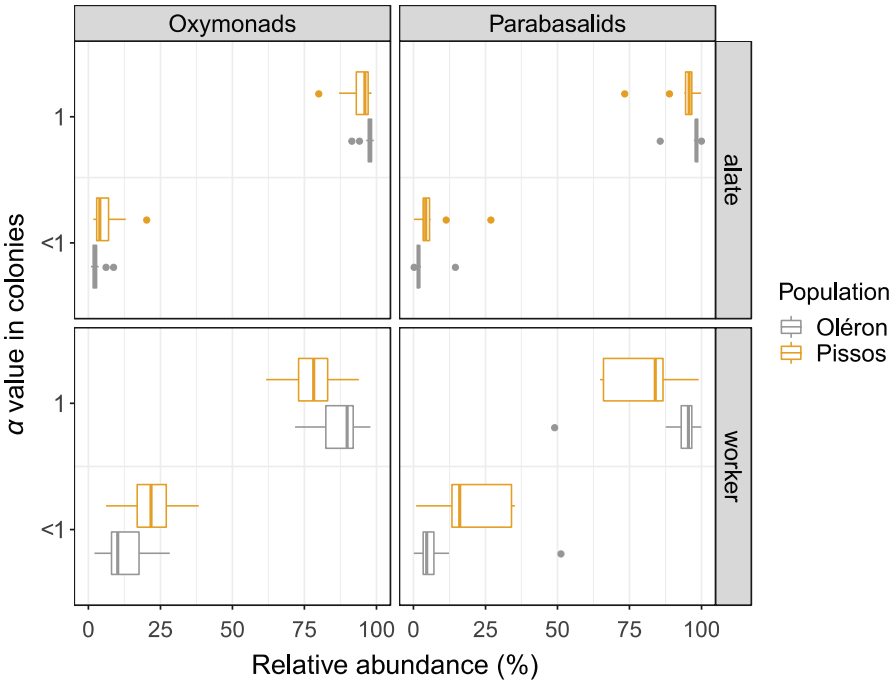


FIGURE 2 Transmission rate (α value) of OTUs according their relative abundance in alates and workers. For each OTU, an α value was estimated by colony as its frequency among the 14 alates swarming from the colony. OTUs with a null α value were detected only in workers of the colony [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

and 18B35), TgA was not detected in the pool of workers (Table S5), but yet it was detected in one or two alates. To validate or invalidate the absence of this *Trichonympha* species in workers, a qPCR protocol was developed to detect and quantify the two *Trichonympha* species in individual workers. The presence of TgA and TgB was tested in workers of two colonies (B1 and B2; Figure S4), in which the metabarcoding approach did not allow the detection of TgA in the worker pools. Results of qPCR revealed the presence of TgB in all workers, as detected with the metabarcoding approach. However, qPCR also detected TgA in 17 workers out of 18 for colonies B1 and B2. In addition, results obtained with colonies B1 and B2 were compared with those obtained with colonies AB1 and AB2, for which metabarcoding did detect the presence of TgA in the worker pools. The proportion of TgA was much lower than the proportion of TgB in all colonies ($V = 3$, $p < 10^{-13}$) (Figure S4). The results also revealed that the proportion of TgA in colonies AB1 and AB2 was significantly higher than the proportion of this protist species in colonies B1 and B2 ($W = 110$, $p < 10^{-10}$; Figure S4).

3.6 | Estimation of α values (i.e., the α component of transmission rate)

The α value was estimated for all protist OTUs present in each colony. The percentage of oxymonad OTUs having an α value equal to 1 ranged from 26.6% to 56.3% in alates per colony, whereas in parabasalids, these percentages ranged from 26.7% to 82.1%. Interestingly, OTUs with an α value equal to 1 seemed relatively more abundant in alates and workers than OTUs with an α value below 1 (Figure 2), although such comparisons have to be taken with caution because

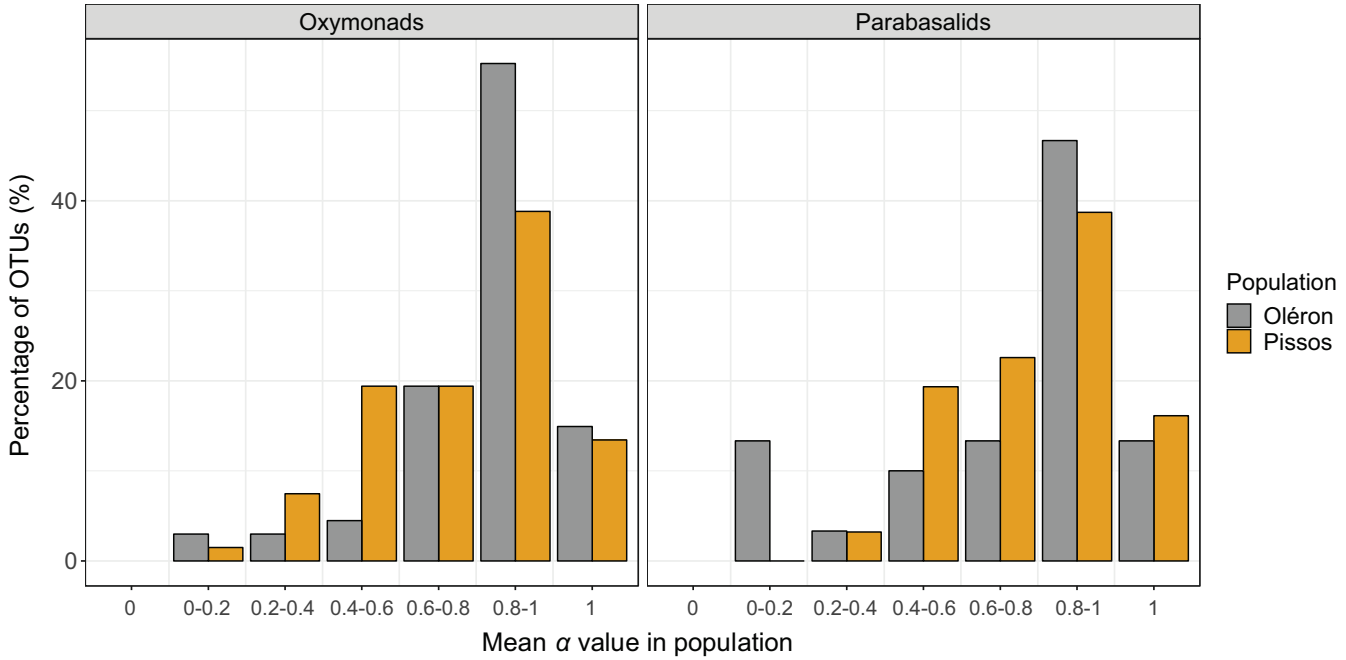


FIGURE 3 Percentage of OTUs by population present in alates according their transmission rate (mean α value). For each OTU, the mean α value represents its frequency among alates of the population [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

they were based on the number of reads obtained per OTU (Lamb et al., 2019). The α values were significantly different between OTUs ($F_{(97,4,302)}$ = 26.36; $p < 10^{-15}$) but did not differ significantly between alate sexes ($F_{(1,4,302)}$ = 1.95; p = .16).

It is worth noting that OTUs with an α value equal to 1 were not necessarily the same between colonies (results not shown). The α value of each OTU was therefore averaged among colonies within populations (Table S6). The results showed that mean α values exhibited important variation among OTUs (Figure 3). The percentage of OTUs having an α value equal to 1 over all colonies in Oléron and Pissos populations was relatively low (between 13% and 16%) for both oxymonads and parabasalids (Table S6). No OTU with a mean α value equal to zero was found. In other words, all OTUs detected in a population were found in at least one alate. OTUs had a mean α value between 0.071 and 1 in oxymonads, and between 0.155 and 1 in parabasalids (Figure 3).

Mean α values of species-level taxa were deduced from α values of OTUs (Table 1; Table S6). These values exhibited variation among protist taxa, ranging from 0.416 for TgA in Pissos to 1 for six taxa in Oléron and four taxa in Pissos, including TgB and five oxymonad taxa (i.e., *Dinenympha leidyi*, *Dinenympha* unclassified, *Pyrsonympha grandis*, *Pyrsonympha* sp. 2 and *Pyrsonympha* unclassified) (Table 1). These results also revealed that mean α values of species-level taxa were significantly lower in Pissos compared to the values observed in Oléron (V = 45; p = .003).

3.7 | Relationship between the α value and the prevalence of OTUs in populations

The results suggested that the mean α value of an OTU in a population is a relevant factor to explain the observed prevalence (p_o) of this OTU in the population. A first analysis indeed showed that mean α values were significantly higher in OTUs that are fixed within populations (p_o = 1) than those of other OTUs (p_o < 1) (Table 2, Figure 4a). The second analysis, which only included OTUs with a prevalence below 1 (i.e., comprised between 0.071 and 0.994), showed that the mean α value of OTUs was positively correlated with the prevalence of OTUs in populations (Table 2; Figure 4b). These two analyses also revealed a significant effect of "population" in oxymonad OTUs, but no effect of "sex" for both oxymonad and parabasalid OTUs (Table 2).

We constructed a simple theoretical model in which the prevalence value of each protist species within populations at a given generation (G_n) is predicted by a simple formula integrating two parameters: (a) the observed prevalence (p_o) within populations one generation before (G_{n-1}), and (b) the transmission rate of the protist estimated by its average α value (Table 1). Taking all taxa together, the results showed that the observed prevalence of OTUs was significantly higher than those expected by the model in Oléron (V = 28, p = .016) and in Pissos (V = 45, p = .004) populations.

4 | DISCUSSION

The present study first provides new knowledge on the molecular diversity of oxymonad and parabasalid protists living in the gut of the lower termite *Reticulitermes grassei*. More specifically, this study provides the first metabarcoding data on Preaxostyla protists of the order Oxymonadida. Our results revealed a high diversity of oxymonad OTUs, all of which were assigned to the two genera so far described in *Reticulitermes* species, namely *Pyrsonympha* and *Dinenympha* (Duarte, Duarte, Borges, & Nunes, 2017; Kitade & Matsumoto, 1998; Lewis &

TABLE 1 Transmission rates (mean α values) and observed (p_o) and theoretical (p_e) values of prevalence of protist species-level taxa in *Reticulitermes grassei* populations

	Oléron			Pissos		
	α	p_o	p_e	α	p_o	p_e
Oxymonadida						
Dinenympha leidyi	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Pyrsonympha grandis	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Pyrsonympha sp. 2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Dinenympha unclassified	1.000	1.000	1.000	0.994	1.000	1.000
Pyrsonympha unclassified	1.000	1.000	1.000	0.994	1.000	1.000
Pyrsonymphidae unclassified	0.970	1.000	0.999	0.899	1.000	0.990
Dinenympha fimbriata	0.810	1.000	0.964	0.662	0.917	0.846
Parabasalia						
Trichonympha TgB	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Holomastigotoididae genus A unclassified	0.988	1.000	1.000	0.976	1.000	0.999
Spirotrichonymphella unclassified	0.982	1.000	1.000	0.738	1.000	0.931
Trichomonadidae genus A unclassified	0.893	1.000	0.989	0.623	0.917	0.816
Cthylla unclassified	0.863	1.000	0.981	0.554	1.000	0.801
Trichonympha TgA	0.958	1.000	0.998	0.416	0.917	0.617

Note: For each species-level taxon, the mean α value represents its frequency among alates of the population.

Forschler, 2004; Shimada, Lo, Kitade, Wakui, & Maekawa, 2013; Stingl & Brune, 2003; Yamin, 1979). For parabasalid protists, the richness of OTUs was comparable to that of a previous metabarcoding studies on *R. grassei* (Waidele et al., 2017). Consistent with all three metabarcoding studies conducted on termite gut parabasalids (Jasso-Selles et al., 2017; Tai et al., 2015; Waidele et al., 2017), the present study did not allow the detection and assignation of all genera. Five genera were detected, whereas the parabasalid communities of *R. grassei* and related *Reticulitermes* species (i.e., the *R. lucifugus* species complex) (Luchetti, Scicchitano, & Mantovani, 2013) are presumed to be dominated by eight genera (Brugerolle & Bordereau, 2006; Duarte et al., 2017; James, Tai, Scheffrahn, & Keeling, 2013; Kitade & Matsumoto, 1998; Waidele et al., 2017; Yamin, 1979). Nevertheless, the protists characterized were representatives of genera that are well known to play major roles in digestion in their *Reticulitermes* termite host (e.g., *Trichonympha*, *Pyrsonympha*, *Dinenympha*) (Inoue, Murashima, Azuma, Sugimoto, & Slaytor, 1997). Regardless, the number and taxonomic diversity of detected protist OTUs were largely sufficient to address the main objectives of the study.

In addition to the novel insights this study provides into our knowledge of the molecular diversity of oxymonad and parabasalid protists, it also represents the first attempt to estimate vertical transmission rates of gut symbionts from the pool available in a colony to its single future reproductives in a termite species. Diouf et al. (2018) previously characterized the bacterial community living in the gut of alates of the higher termite *Nasutitermes arborum* (Termitidae). However, they did not provide any information regarding symbiont transmission because samples were prepared with pools of guts extracted from multiple individuals, whereas estimation of transmission efficiency requires analyses of individual alates. Our study focused on the α component of protist transmission, which estimates the probability that a protist present in a colony is also present in an individual alate swarming from this colony. Overall, estimated α values were rather high for most gut protist species. For instance, mean α values of 10 protist species out of 13 (77%) were up to 0.95 in the Oléron population (Table 1). It is worth noting that the composition of the protist community in female and male alates did not differ significantly, a general result that allowed us to estimate α values of protists based on their frequency among the 14 alates (seven females and seven males) studied per colony. Overall, our analyses suggested that α values have been underestimated because of the detection limit of metabarcoding (Coissac, Riaz, & Puillandre, 2012; Hatzenbuhler, Kelly, Martinson, Okum, & Pilgrim, 2017; Makiola et al., 2018; Port et al., 2016). Results of qPCR demonstrated the presence of TgA in workers from colonies in which our deep sequencing approach of the 18S rRNA gene did not allow detection of a single read assigned to this protist species in the pool of worker guts. Results of qPCR showed that the relative abundance of TgA was very low in these samples, suggesting that the metabarcoding approach

TABLE 2 Variance analyses of models fitting OTU prevalence (p_o) in populations

Response variable	Explanatory variables	Oxymonads				Parabasalids			
		Sum of squares	*df*	*F* value	Pr (>*F*)	Sum of squares	*df*	*F* value	Pr (>*F*)
$p_o = 1$ versus $p_o < 1$	Mean α values	61.571	1	81.0948	**<2.2e−16**	73.99	1	88.315	**4.12E−16**
	Sex	0.064	1	0.0841	.772057	0.002	1	0.0023	.962
	Population	5.403	1	7.1168	**.008109**	0.322	1	0.3841	.5366
	(Residuals)	200.443	264			102.211	122		
Only $p_o < 1$	Mean α values	1.34742	1	50.0405	**5.05E−08**	0.67218	1	12.0363	**.001371**
	Sex	0.00007	1	0.0025	.9605	0.00131	1	0.0234	.879236
	Population	0.53899	1	20.0172	**9.10E−05**	0.05103	1	0.9138	.345489
	(Residuals)	0.86165	32			2.01046	36		

Note: For each OTU, the mean α value represents its frequency among alates of the population.
Significative *p*-values are in bold.

sometimes failed to detect certain OTUs, probably because their relative abundance in original samples was below the detection threshold (Lamb et al., 2019). Such an explanation is also supported by another analysis, which revealed a positive relationship between the frequency of OTUs among alate individuals (α value) and their relative abundance in both alates and workers (Figure 2). Consequently, the α component of vertical transmission might even be higher than suggested by our estimations, especially for protist species and OTUs that have a low relative abundance in their hosts.

These results indicate that most protists circulating within colonies have a good chance of being present in dispersing alates. Whereas this step is crucial for protists to be transmitted, it is not sufficient because protists subsequently must be successfully transferred from primary reproductives to the offspring in the incipient colonies. The efficiency of this second step of protist transmission, which was previously referred as the β component of transmission (i.e., the probability β), was not studied and currently remains unknown. However, several recent studies conducted on *R. grassei* and other *Reticulitermes* species suggest that the probability β could be very high and even close to 1 (Brossette, Meunier, Dupont, Bagnères, & Lucas,2019; Shimada et al., 2013). These studies showed that the two primary reproductives founding an incipient colony have numerous opportunities to transfer their gut symbionts to the first larvae produced in the young colony. Queens and kings keep their gut protists for quite a long period (Shimada et al., 2013) and regularly exhibit proctodaeal trophallaxis with their larvae (Brossette et al., 2019). This behaviour probably allows the transfer of most gut protists to the first cohort of workers, which in turn will propagate them by proctodaeal trophallaxis to all members of the colonies and thereby ensure the perpetuation of protists within the colony . In theory, one event of proctodaeal trophallaxis from a primary reproductive to one of its larvae might be enough for the transmission of gut symbionts and thus to spread it among all members of the newly founded colony. If β is truly equal to 1, this would mean that α values actually evaluate directly the intergenerational transmission rates of protists from parental to descendant colonies ($\theta = \alpha \cdot \beta$, when β = 1, $\theta = \alpha$).

As in many other mutualistic symbioses where hosts and symbionts are mutually dependent for survival and reproduction (Moran, McCutcheon, & Nakabachi, 2008; Salem et al., 2015), it is generally assumed that co-speciation between gut protists and lower termites emerged as a direct consequence of an efficient vertical transmission of protists across termite generations (Desai et al., 2010; Noda et al., 2007; Radek et al., 2018; Taerum et al., 2018). The results of the present study constitute the first empirical evidence supporting this widely held assumption. An efficient vertical mode of protist transmission may therefore constitute a crucial mechanism ensuring the stabilization of mutualistic host–protist symbioses in lower termites.

In termites, several studies comparing phylogenetically and ecologically differentiated termite lineages have revealed that diet and the evolutionary history of hosts constitute the two main factors

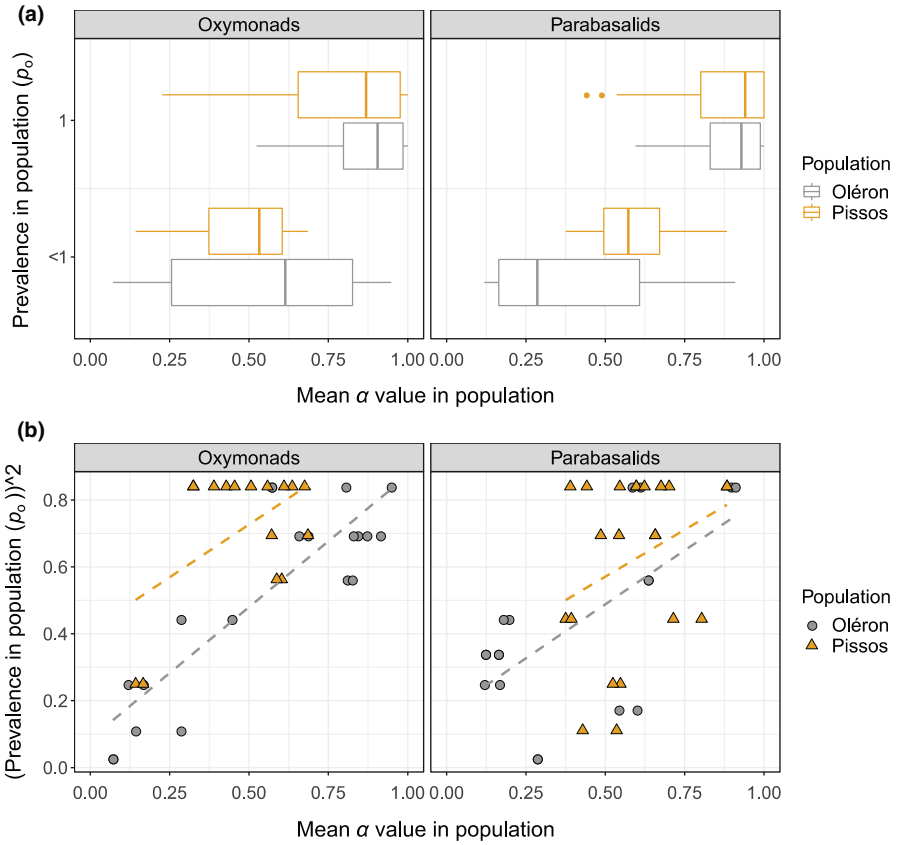


FIGURE 4 Prevalence of OTUs by population according their transmission rate (mean α value). The observed prevalence p_o was obtained for each OTU by its frequency among colonies of the population. For each OTU, the mean α value represents its frequency among alates of the population. (a) Comparison of mean α values between OTUs with a 100% prevalence and OTUs that were partially prevalent. (b) Relationship between mean α value of OTUs and their prevalence (this excludes all OTUs with a 100% prevalence); dotted lines represent linear regressions supporting statistics [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

shaping the composition of gut microbiota, although other factors such as gut microenvironment in higher termites or social structure in lower termites also could play a significant role (Brune & Dietrich, 2015; Dietrich, Köhler, & Brune, 2014; Mikaelyan et al., 2015; Rossmassler et al., 2015; Sabree & Moran, 2014; Tai et al., 2015; Waidele et al., 2017). To determine more precisely the factors and mechanisms involved in the co-evolutionary dynamics of host–microbiota symbiotic systems, comparative studies on shorter evolutionary time scales are needed, including studies evaluating variation of gut microbiota within host species. However, studies characterizing intraspecific variation in the gut microbial communities of termites are extremely rare (but see Kitade & Matsumoto, 1993; Waidele et al., 2017). In this context, our results have shown that the composition of gut protist communities varies substantially between colonies in *R. grassei* populations. In both Oléron and Pissos populations, our results indeed showed that each colony harboured a unique community of protist OTUs. Again, we cannot rule out that this variation was caused by the detection limit of our metabarcoding approach (see previous paragraph). However, this methodological limit alone seems unlikely to explain certain prevalence values. This parameter was indeed measured by the occurrence of OTUs within each colony, which was itself based on the results obtained from 15 distinct samples prepared with the gut of 24 nest-mate individuals (i.e., 14 alates and one pool of 10 workers). The probability that an OTU present in a colony is under the detection threshold in the 15 samples prepared independently might be low. Recently, Waidele et al. (2017) detected intraspecific variation of the gut protist community in five species of lower termites, including *R. grassei*. Together, this previous study as well as the results obtained here indicate that intraspecific variation of gut protist communities in lower termites is more common than previously assumed (Inoue et al.,2000; Yamin, 1979).

It is well described that the protist community, when taken as a single functional unit, actively participates in the digestion of cellulose in termite guts. However, little is known about the respective roles of each protist species in wood digestion (Ni & Tokuda, 2013). In many microbial communities, including those living in a symbiotic association with a host, functional redundancy can exist among its members, particularly if they are phylogenetically related (Louca et al., 2018). In such communities, the loss of a symbiont would not necessarily be associated with the loss of the functional capabilities expressed by this taxon as long as another symbiont present in the community can provide the same (or equivalent) functions. In theory, functional redundancy among taxa may therefore allow some degrees of flexibility in the community composition with no important impact on community functioning. In *R. grassei*, functional redundancy among related gut protists might explain variation in the composition of protist communities within populations. Some of our results are consistent with this hypothesis. When related OTUs were grouped into species-level taxa, the observed variation among colonies was drastically reduced, and we observed that the 13 characterized species-level protists were shared by 21 out of 24 colonies (87.5%). This suggests that some OTUs can be lost as long as the full assemblage of protist species is maintained in the community.

Our results also suggest that an imperfect transmission of protists may constitute a major cause of variation in the protist community composition among colonies in host populations. The transmission rate of some protist OTUs is indeed imperfect ($\alpha < 1$) and can even be rather weak ($\alpha < .5$). As already discussed, such low transmission rates could be due to the detection limit of the metabarcoding approach. However, a previous study using microscopy found similar results in three North American species of *Reticulitermes* termites (Lewis & Forschler, 2004). They suggested that protist morphotypes with a low relative abundance in workers, soldiers and nymphs were completely absent in some alate individuals (Lewis & Forschler, 2004). Together, this previous study along with ours suggest that imperfect transmission of protists exists and could even be a recurrent phenomenon in *R. grassei* populations. If imperfect transmission is indeed one cause of the intraspecific variation in *R. grassei* populations, one might expect to observe a strong positive relationship between prevalence values of OTUs and their transmission rates. The observed pattern in *R. grassei* is consistent with such a prediction. We indeed detected a significant relationship between prevalence values and transmission rates; the less prevalent OTUs in populations were also the OTUs with the lowest estimated α values (Figure 4b).

The results obtained in this study allowed us to test the hypothesis that the transmission rate of a protist species is sufficient to predict its prevalence within populations. To do this, we constructed a simple model of population genetics. Results of analyses indicated that our model underestimates the prevalence of protist species in the two populations. The most straightforward explanation for such a departure from our model is that its main assumptions are not verified in natural populations. The first assumption was the absence of selection on individuals and colonies relative to their protist community. In natural populations, selection could act against primary reproductives that do not harbour enough protist species to feed themselves until first workers in their offspring differentiated and feed them in return. In addition, it is likely that selection against colonies that have not inherited enough protist species to ensure an optimal degradation of cellulose also occurred. Each protist species detected in our study was present in at least 95% of termite colonies. Fixation of these protists in populations could result from a negative selection regime against colonies that did not carry the complete protist community, which might be essential in the nutritional mutualism with the host. The second assumption of our model was the absence of partner choice relative to their protist community. It has been shown in the fruit fly *Drosophila melanogaster* that mate choice can be mediated by gut microbiota: individuals preferentially choose a positive assortative mate partner most probably by detecting volatile compounds (Najarro, Sumethasorn, Lamoureux, & Turner, 2015; Sharon et al., 2010). In xylophagous termites, volatile fatty acids and other fermentation products of gut protists and bacteria (Odelson & Breznak, 1983) are emitted by their hosts and seem to be involved in nestmate recognition (Matsuura, 2001). It is possible that alates also use these signals to recognize the gut protist composition of potential mates and preferentially choose a negative assortative mate partner in order to complete the gut protist community in their offspring.

Imperfect vertical transmission of microbial symbionts has been widely documented across plant and animal hosts, even in mutualistic symbioses (Afkhami & Rudgers, 2008; Björk, Díez-Vives, Astudillo-García, Archie, & Montoya, 2019; Bright & Bulgheresi, 2010; Gundel et al., 2008; Gundel, Rudgers, & Ghersa, 2011; Sneck, Rudgers, Young, & Miller, 2017). In *Reticulitermes* termites, several nonexclusive hypotheses could explain why some protists are not perfectly transmitted by the alates. Lewis and Forschler (2004) showed that the total number of gut protists in alates of the North American species, *Reticulitermes flavipes*, was at least 90 times lower than the number of protists in alate-destined nymphs. The imaginal moult during which nymphs differentiated into alates could consequently provoke an important bottleneck on the protist community, which might cause the loss of certain protists. In such a random process, the probability of being lost is expected to be higher for protists with a low relative abundance in the gut of nymphs. A second hypothesis explaining how protists could be lost relates to competition between protists within hosts (Frank, 1996). It is likely that protists coexisting in the gut of nymphs compete because their survival and persistence during imaginal moult is the only way to be present in the alates and therefore to be transmitted to the next host generation. In such a competitive situation, which could be intensified by the bottleneck induced by the imaginal moult, selection occurring on the populations of protists living in the nymphs could favour protist variants that exploit the symbiotic system and therefore that replicate more rapidly than other protists. The high replication rate of a given protist variant might indeed increase its relative abundance within a nymph, which might in turn improve the probability of being present in the alates. According to this mechanism, some protists should be absent in alates because they are supplanted by more competitive ones. The third hypothesis is that the loss of protists caused by an imperfect transmission results from a direct action of the hosts, which would actively exclude some protists through specific host–symbiont interactions in the gut lumen. In the context of mutualism stability, protist variants with a high replicating rate might cause substantial fitness costs on host individuals and/or on other beneficial gut symbionts (i.e., other protists, prokaryotes). The presence of such "cheater" protists within host populations could therefore create selective pressures favouring hosts and/or other microbial symbionts that would regulate or even eliminate these cheaters (Jones et al., 2015). Although these mechanisms are unknown in termites, several studies in other gut symbiotic systems have revealed that they are highly plausible (García-Bayona & Comstock, 2018).

Another issue emerging from our study concerns the mechanisms by which the diversity of protists is maintained in populations of *R. grassei*. If some gut protists are regularly lost because of imperfect vertical transmission across generations, as suggested by our results, then how have so many protists persisted in this host lineage through evolutionary times? This question is particularly problematic for protists with a low transmission rate. We propose two nonexclusive hypothetical mechanisms that could provide preliminary answers to this question. First, recent phylogenetic analyses have revealed that protists can occasionally be transferred horizontally

between termite species (Desai et al., 2010; Noda et al., 2007; Radek et al., 2018; Taerum et al., 2018). We cannot exclude that such horizontal transmission events also occurred within termite species. Gut protists of termites are known to be incapable of living outside their hosts (Inoue et al.,2000), but horizontal transmission of gut symbionts between colonies may still occur when individuals from distinct colonies enter into direct contact in their habitat (Bourguignon et al., 2018). In this context, an important route of horizontal transmission may occur when different colonies merge and fuse together, a phenomenon that is frequent in lower termites, especially in *Reticulitermes* species (Luchetti, Dedeine, Velonà, & Mantovani, 2013; Perdereau, Bagnères, Dupont, & Dedeine, 2010; Perdereau et al., 2015). At the population level, such a mixed mode of transmission including both vertical and horizontal transmission events might explain how the diversity of these symbionts could persist across generations. The second hypothesis posits that the heterogeneity of habitat in termite populations contributes to the maintenance of protist diversity. According to this hypothesis, the transmission rate of a given protist species could depend on the nature of the wood (e.g., the tree species) ingested by their hosts. Protists would be more or less specialized to exploit particular nutritional resources, and such a specialization would affect their replication rate within the host's gut and therefore their probability of being transmitted via the alates (Duarte et al., 2017; Raychoudhury et al., 2013). In our study, colonies of *R. grassei* were all collected on the dead wood of a single pine species, *Pinus pinaster*. If colonies had been collected in more heterogeneous habitats where individuals feed on various tree species, we may have obtained intercolony variation of the transmission rates for the same protist species. At the population level, such a mechanism might allow the long-term persistence of protists in termite populations where colonies exploit different wood resources.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Carole-Anne Dubois, Justine Girardet and Samuel Pichon for help with sample dissection and DNA extraction. We thank Jacob A. Russell and four anonymous reviewers for their comments and suggestions that significantly improved the article. qPCR was conducted in the "Biological System Analysis – Genome" platform facilities at the University of Tours. We also thank Charlotte Lécureuil for her advice on qPCR analyses. This research was funded by the French Research Foundation (ANR) award "Evosymter" (JC08_331895), the Région Centre Val de Loire award "Xylobiotic," the city of Paris and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). Ph.D. work of C.M. was funded by the Région Centre Val de Loire (Ph.D. scholarship 2016 – Bourse régionale) and the Deutscher Akademischer Austauschdienst (Research Grants – Short-Term Grants 2018). V.H. and A.B. were funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft in the collaborative research centre SFB 987 (Microbial Diversity in Environmental Signal Response) and by the Max Planck Society.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.D. conceived and designed the study. C.M., S.D. and F.D. collected and prepared samples. C.M. and S.D. conducted molecular experiments. C.M., V.H. and A.B. analysed sequencing data for metabarcoding. A.B. provided all reference databases for both oxymonads and parabasalids. C.M., A.M.B. and G.D. analysed qPCR results. C.M., V.H. and J.M. conducted statistical analyses. C.M. and F.D. wrote the first draft of the manuscript. All authors edited and approved the final version of the manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

COII sequences are available in GenBank with accession numbers MN107060 to MN107083. The raw metabarcoding sequence data have been deposited in the NCBI Sequence Read Archive under the BioProject PRJNA552405 with BioSample accession numbers SAMN12205929 to SAMN12206288. The in-house oxymonad and parabasalid databases contain sequences from GenBank as well as sequences from clone libraries generated during this project; they are available at https://github.com/brunelab/databases.

ORCID

Caroline Michaud https://orcid.org/0000-0002-6470-028X
Vincent Hervé https://orcid.org/0000-0002-3495-561X
Simon Dupont https://orcid.org/0000-0003-4760-6811
Géraldine Dubreuil https://orcid.org/0000-0002-5410-8776
Annie M. Bézier https://orcid.org/0000-0002-2528-4260
Joël Meunier https://orcid.org/0000-0001-6893-2064
Andreas Brune https://orcid.org/0000-0002-2667-4391
Franck Dedeine https://orcid.org/0000-0002-0646-4725

REFERENCES

Afkhami, M. E., & Rudgers, J. A. (2008). Symbiosis lost: Imperfect vertical transmission of fungal endophytes in grasses. *The American Naturalist*, *172*(3), 405–416. https://doi.org/10.1086/589893

Akçay, E. (2015). Evolutionary models of mutualism. In J. L. Bronstein (Ed.), *Mutualism* (pp. 57–76). New York, NY: Oxford University Press.

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. M., & Walker, S. C. (2015). Fitting linear mixed-effects models using LME4. *Journal of Statistical Software*, *67*(1), 1–48. https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01

Benjamino, J., & Graf, J. (2016). Characterization of the core and caste-specific microbiota in the termite, *Reticulitermes flavipes*. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1–14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00171

Bézier, A., Annaheim, M., Herbiniere, J., Wetterwald, C., Gyapay, G., Bernard-Samain, S., … Drezen, J.-M. (2009). Polydnaviruses of braconid wasps derive from an ancestral nudivirus. *Science*, *323*, 926–931. https://doi.org/10.1126/science.1166788

Bignell, D. E., & Eggleton, P. (2000). Termites in ecosystems. In I. T. Abe, D. E. Bignell, & M. Higashi (Eds.), *Termites: Evolution, sociality, symbioses, ecology*. Dordrecht, the Netherlands: Springer.

Björk, J. R., Díez-Vives, C., Astudillo-García, C., Archie, E. A., & Montoya, J. M. (2019). Vertical transmission of sponge microbiota is inconsistent and unfaithful. *Nature Ecology and Evolution*, *3*, 1172–1183. https://doi.org/10.1038/s41559-019-0935-x

Bosch, T. C. G., & Miller, D. J. (2016). *The holobiont imperative*. Vienna, Austria: Springer.

Bourguignon, T., Lo, N., Dietrich, C., Šobotník, J., Sidek, S., Roisin, Y., … Evans, T. A. (2018). Rampant host switching shaped the termite gut microbiome. *Current Biology*, *28*(4), 649–654.e2. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.035

Bright, M., & Bulgheresi, S. (2010). A complex journey: Transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(3), 218–230. https://doi.org/10.1038/nrmicro2262.A

Brossette, L., Meunier, J., Dupont, S., Bagnères, A. G., & Lucas, C. (2019). Unbalanced biparental care during colony foundation in two subterranean termites. *Ecology and Evolution*, *9*(1), 192–200. https://doi.org/10.1002/ece3.4710

Browne, H. P., Neville, B. A., Forster, S. C., & Lawley, T. D. (2017). Transmission of the gut microbiota: Spreading of health. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(9), 531–543. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.50

Brugerolle, G., & Bordereau, C. (2006). Immunological and ultrastructural characterization of spirotrichonymphid flagellates from *Reticulitermes grassei* and *R. flavipes* (syn. *R. santonensis*), with special reference to *Spirotrichonympha*, *Spironympha* and *Microjoenia*. *Organisms*, *Diversity & Evolution*, *6*, 109–123. https://doi.org/10.1016/j.ode.2005.07.004

Brune, A. (2014). Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(3), 168–180. https://doi.org/10.1038/nrmicro3182

Brune, A., & Dietrich, C. (2015). The gut microbiota of termites: Digesting the diversity in the light of ecology and evolution. *Annual Review of Microbiology*, *69*, 145–166. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155715

Brune, A., & Ohkuma, M. (2011). Role of the termite gut microbiota in symbiotic digestion. In D. E. Bignell, Y. Roisin, & N. Lo (Eds.), *Biology of termites: A modern synthesis* (pp. 439–476). Dordrecht, the Netherlands: Springer. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3977-4

Cepicka, I., Hampl, V., & Kulda, J. (2010). Critical taxonomic revision of parabasalids with description of one new genus and three new species. *Protist*, *161*(3), 400–433. https://doi.org/10.1016/j.protis.2009.11.005

Cleveland, L. R. (1923). Symbiosis between termites and their intestinal protozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *9*(12), 424–428. https://doi.org/10.1073/pnas.9.12.424

Coissac, E., Riaz, T., & Puillandre, N. (2012). Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals. *Molecular Ecology*, *21*, 1834–1847. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05550.x

R Core Team. (2018). *R: A language and environment for statistical computing*. Retrieved from https://www.r-project.org

Dedeine, F., Boulétreau, M., & Vavre, F. (2005). *Wolbachia* requirement for oogenesis: Occurrence within the genus *Asobara* (Hymenoptera, Braconidae) and evidence for intraspecific variation in *A. tabida*. *Heredity*, *95*, 394–400. https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800739

Dedeine, F., Dupont, S., Guyot, S., Matsuura, K., Wang, C., Habibpour, B., … Luchetti, A. (2016). Historical biogeography of *Reticulitermes* termites (Isoptera: Rhinotermitidae) inferred from analyses of mitochondrial and nuclear loci. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *94*, 778–790. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.10.020

Desai, M. S., Strassert, J. F. H., Meuser, K., Hertel, H., Ikeda-ohtsubo, W., Radek, R., & Brune, A. (2010). Strict cospeciation of devescovinid flagellates and Bacteroidales ectosymbionts in the gut of dry-wood termites (Kalotermitidae). *Environmental Microbiology*, *12*(8), 2120–2132. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02080.x

Dietrich, C., Köhler, T., & Brune, A. (2014). The cockroach origin of the termite gut microbiota: Patterns in bacterial community structure reflect major evolutionary events. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(7), 2261–2269. https://doi.org/10.1128/AEM.04206-13

Diouf, M., Hervé, V., Mora, P., Robert, A., Frechault, S., Rouland-Lefèvre, C., & Miambi, E. (2018). Evidence from the gut microbiota of swarming alates of a vertical transmission of the bacterial symbionts in *Nasutitermes arborum* (Termitidae, Nasutitermitinae). *Antonie van Leeuwenhoek*, *111*(4), 573–587. https://doi.org/10.1007/s10482-017-0978-4

Douglas, A. E. (2014). Symbiosis as a general principle in eukaryotic evolution. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(2), a016113. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016113

Duarte, S., Duarte, M., Borges, P. A. V., & Nunes, L. (2017). Dietary-driven variation effects on the symbiotic flagellate protist communities of the subterranean termite *Reticulitermes grassei* Clément. *Journal of Applied Entomology*, *141*, 300–307. https://doi.org/10.1111/jen.12331

Duarte, S., Nunes, L., Borges, P. A. V., Nobre, T., & Waite, D. W. (2018). A bridge too far? An integrative framework linking classical protist taxonomy and metabarcoding in lower termites. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2620. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02620

Ebert, D. (2013). The epidemiology and evolution of symbionts with mixed-mode transmission. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *44*(1), 623–643. https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-032513-100555

Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, *37*(5), 699–735. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025

Eren, A. M., Morrison, H. G., Lescault, P. J., Reveillaud, J., Vineis, J. H., & Sogin, M. L. (2015). Minimum entropy decomposition : Unsupervised oligotyping for sensitive partitioning of high-throughput marker gene sequences. *The ISME Journal*, *9*(4), 968–979. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.195

Evangelista, D., Thouzé, F., Kohli, M. K., Lopez, P., & Legendre, F. (2018). Topological support and data quality can only be assessed through multiple tests in reviewing Blattodea phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *128*, 112–122. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.05.007

Ewald, P. W. (1987). Transmission modes and evolution of the parasitism–mutualism continuum. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *503*(1), 295–306. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb40616.x

Fine, P. E. M. (1975). Vectors and vertical transmission: An epidemiologic perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *266*(1), 173–194. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1975.tb35099.x

Frank, S. A. (1996). Models of parasite virulence. *The Quarterly Review of Biology*, *71*(1), 37–78. https://doi.org/10.1086/419267

García-Bayona, L., & Comstock, L. E. (2018). Bacterial antagonism in host-associated microbial communities. *Science*, *361*(6408), eaat2456. https://doi.org/10.1126/science.aat2456

Glöckner, F. O., Yilmaz, P., Quast, C., Gerken, J., Beccati, A., Ciuprina, A., … Ludwig, W. (2017). 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of Biotechnology*, *261*, 169–176. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1198

Grassé, P. P. (1982). *Termitologia*, *Tome 1: Anatomie - physiologie - reproduction des Termites*. paris: Ed Masson.

Grassé, P. P., & Noirot, C. (1945). La transmission des flagelles symbiotiques et les aliments des termites. *Bulletin Biologique de La France et de La Belgique*, *79*, 273–297.

Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, L., … Christen, R. (2013). The Protist Ribosomal Reference database (PR2): A catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Reasearch*, *41*, 597–604. https://doi.org/10.1093/nar/gks1160

Gundel, P. E., Batista, W. B., Texeira, M., Martinez-Ghersa, M. A., Omacini, M., & Ghersa, C. M. (2008). *Neotyphodium* endophyte infection frequency in annual grass populations: Relative importance of mutualism and transmission efficiency. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *275*, 897–905. https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1494

Gundel, P. E., Garibaldi, L. A., Tognetti, P. M., Aragón, R., Ghersa, C. M., & Omacini, M. (2009). Imperfect vertical transmission of the endophyte *Neotyphodium* in exotic grasses in grasslands of the flooding pampa. *Microbial Ecology*, *57*(4), 740–748. https://doi.org/10.1007/s00248-008-9447-y

Gundel, P. E., Rudgers, J. A., & Ghersa, C. M. (2011). Incorporating the process of vertical transmission into understanding of host–symbiont dynamics. *Oikos*, *120*(8), 1121–1128. https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2011.19299.x

Hampl, V. (2016). Preaxostyla. In J. Archibald, & E. Al (Eds.), *Handbook of the Protists* (pp. 1–36). Cham, Switzerland: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6

Hatzenbuhler, C., Kelly, J. R., Martinson, J., Okum, S., & Pilgrim, E. (2017). Sensitivity and accuracy of high-throughput metabarcoding methods for early detection of invasive fish species. *Scientific Reports*, *7*, 46393. https://doi.org/10.1038/srep46393

Honigberg, B. M. (1970). Protozoa associated with termites and their role in digestion. In K. Krishna, & F. Weesner (Eds.), *Biology of termites* (pp. 1–36). New York, NY: Academic Press.

Horthorn, T., & Hornik, K. (2007). EXACTRANKTESTS: *exact distributions for rank and permutation tests*. R package version 0.8-29. Retrieved from https://CRAN.R-project.org/package=exactRankTests

Hosokawa, T., Kikuchi, Y., & Fukatsu, T. (2007). How many symbionts are provided by mothers, acquired by offspring, and needed for successful vertical transmission in an obligate insect–bacterium mutualism? *Molecular Ecology*, *16*(24), 5316–5325. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03592.x

Inoue, T., Kitade, O., Yoshimura, T., & Yamaoka, I. (2000). Symbiotic associations with protists. In T. Abe, D. E. Bignell, & M. Higashi (Eds.), *Termites: Evolution, sociality, symbioses, ecology* (pp. 275–288). Dordrecht, the Netherlands: Springer.

Inoue, T., Murashima, K., Azuma, J.-I., Sugimoto, A., & Slaytor, M. (1997). Cellulose and xylan utilisation in the lower termite *Reticulitermes speratus*. *Journal of Insect Physiology*, *43*(3), 235–242. https://doi.org/10.1016/S0022-1910(96)00097-2

James, E. R., Tai, V., Scheffrahn, R. H., & Keeling, P. J. (2013). *Trichonympha burlesquei* n. sp. from *Reticulitermes virginicus* and evidence against a cosmopolitan distribution of *Trichonympha agilis* in many termite hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *63*, 3873–3876. https://doi.org/10.1099/ijs.0.054874-0

Jansen, R. P., & de Boer, K. (1998). The bottleneck: Mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *145*(1–2), 81–88. https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00173-7

Jasso-Selles, A. D. E., De Martini, F., Freeman, K. D., Garcia, M. D., Merrell, T. L., Scheffrahn, R. H., & Gile, G. H. (2017). The parabasalid symbiont community of *Heterotermes aureus*: Molecular and morphological characterization of four new species and reestablishment of the genus *Cononympha*. *European Journal of Protistology*, *61*, 48–63. https://doi.org/10.1016/j.ejop.2017.09.001

Jones, E. I., Afkhami, M. E., Akçay, E., Bronstein, J. L., Bshary, R., Frederickson, M. E., … Friesen, M. L. (2015). Cheaters must prosper: Reconciling theoretical and empirical perspectives on cheating in mutualism. *Ecology Letters*, *18*(11), 1270–1284. https://doi.org/10.1111/ele.12507

Kenkel, C. D., & Bay, L. K. (2018). Exploring mechanisms that affect coral cooperation: Symbiont transmission mode, cell density and community composition. *PeerJ*, *6*, e6047. https://doi.org/10.7717/peerj.6047

Kiers, E. T., Palmer, T. M., Ives, A. R., Bruno, J. F., & Bronstein, J. L. (2010). Mutualisms in a changing world: An evolutionary perspective. *Ecology Letters*, *13*, 1459–1474. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01538.x

Kitade, O. (2004). Comparison of symbiotic flagellate faunae between termites and a wood-feeding cockroach of the genus *Cryptocercus*. *Microbes and Environments*, *19*(3), 215–220.

Kitade, O., & Matsumoto, T. (1993). Symbiotic protistan faunae of *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) in the Japan Archipelago. *Sociobiology*, *23*, 135–153.

Kitade, O., & Matsumoto, T. (1998). Characteristics of the symbiotic flagellate composition within the termite family Rhinotermitidae (Isoptera). *Symbiosis*, *25*, 271–278.

Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(17), 5112–5120. https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13

Lamb, P. D., Hunter, E., Pinnegar, J. K., Creer, S., Davies, R. G., & Taylor, M. I. (2019). How quantitative is metabarcoding: A meta-analytical approach. *Molecular Ecology*, *28*, 420–430. https://doi.org/10.1111/mec.14920

Lathi, L., Shetty, S., Blake, T., & Salojarvi, J. (2017). MICROBIOME *R package*. Retrieved from http://microbiome.github.io

Lewis, J. L., & Forschler, B. T. (2004). Protist communities from four castes and three species of *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Annals of the Entomological Society of America*, *97*(6), 1242–1251. https://doi.org/10.1603/0013-8746(2004)097[1242:pcffca]2.0.co;2

Louca, S., Polz, M. F., Mazel, F., Albright, M. B. N., Huber, J. A., O'Connor, M. I., … Parfrey, L. W. (2018). Function and functional redundancy in microbial systems. *Nature Ecology and Evolution*, *2*(6), 936. https://doi.org/10.1038/s41559-018-0519-1

Luchetti, A., Dedeine, F., Velonà, A., & Mantovani, B. (2013). Extreme genetic mixing within colonies of the wood-dwelling termite *Kalotermes flavicollis* (Isoptera, Kalotermitidae). *Molecular Ecology*, *22*(12), 3391–3402. https://doi.org/10.1111/mec.12302

Luchetti, A., Scicchitano, V., & Mantovani, B. (2013). Origin and evolution of the Italian subterranean termite *Reticulitermes lucifugus* (Blattodea, Termitoidae, Rhinotermitidae). *Bulletin of Entomological Research*, *103*, 734–741. https://doi.org/10.1017/S0007485313000400

Makiola, A., Dickie, I. A., Holdaway, R. J., Wood, J. R., Orwin, K. H., Lee, C. K., & Glare, T. R. (2018). Biases in the metabarcoding of plant pathogens using rust fungi as a model system. *MicrobiologyOpen*, *8*(7), e00780. https://doi.org/10.1002/mbo3.780

Margulis, L., & Fester, R. (1991). *Symbiosis as a source of evolutionary innovation*. Cambridge, MA: MIT Press.

Matsuura, K. (2001). Nestmate recognition mediated by intestinal bacteria in a termite, *Reticulitermes speratus*. *Oikos*, *92*, 20–26. https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2001.920103.x

Maynard Smith, J. (1989). Generating novelty by symbiosis. *Nature*, *341*, 284–285. https://doi.org/10.1038/341284a0

McFall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C. G., Carey, H. V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A. E., … Wernegreen, J. J. (2013). Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(9), 3229–3236. https://doi.org/10.1073/pnas.1218525110

McMahan, E. A. (1969). Studies of termite wood-feeding preferences. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*, *19*, 239–250.

Mcmurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). PHYLOSEQ: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, *8*(4), e61227. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217

Mikaelyan, A., Dietrich, C., Köhler, T., Poulsen, M., Sillam-Dussès, D., & Brune, A. (2015). Diet is the primary determinant of bacterial community structure in the guts of higher termites. *Molecular Ecology*, *24*(20), 5284–5295. https://doi.org/10.1111/mec.13376

Moran, N. A. (2007). Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(20), 8627–8633. https://doi.org/10.1073/pnas.0611659104

Moran, N. A., McCutcheon, J. P., & Nakabachi, A. (2008). Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual Review of Genetics*, *42*(1), 165–190. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130119

Najarro, M. A., Sumethasorn, M., Lamoureux, A., & Turner, T. L. (2015). Choosing mates based on the diet of your ancestors : Replication of non-genetic assortative mating in *Drosophila melanogaster*. *PeerJ*, *3*, e1173. https://doi.org/10.7717/peerj.1173

Nalepa, C. A. (2015). Origin of termite eusociality: Trophallaxis integrates the social, nutritional, and microbial environments. *Ecological Entomology*, *40*, 323–335. https://doi.org/10.1111/een.12197

Nalepa, C. A., Bignell, D. E., & Bandi, C. (2001). Detritivory, coprophagy, and the evolution of digestive mutualisms in Dictyoptera. *Insectes Sociaux*, *48*, 194–201. https://doi.org/10.1007/PL00001767

Naucke, T. J., & Lorentz, S. (2012). First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasites & Vectors*, *5*, 67. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-67

Ni, J., & Tokuda, G. (2013). Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. *Biotechnology Advances*, *31*(6), 838–850. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.005

Noda, S., Kitade, O., Inoue, T., Kawai, M., Kanuka, M., Hiroshima, K., … Ohkuma, M. (2007). Cospeciation in the triplex symbiosis of termite gut protists (*Pseudotrichonympha* spp.), their hosts, and their bacterial endosymbionts. *Molecular Ecology*, *16*(6), 1257–1266. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03219.x

Odelson, D. A., & Breznak, J. A. (1983). Volatile fatty acid production by the hindgut microbiota of xylophagous termites. *Applied and Environmental Microbiology*, *45*(5), 1602–1613.

Ohkuma, M., & Brune, A. (2011). Diversity, structure and evolution of the termite gut microbial community. In D. E. Bignell, Y. Roisin, & N. Lo (Eds.), *Biology of termites: A modern synthesis* (pp. 413–439). Dordrecht, the Netherlands: Springer.

Oksanen, A., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., & Wagner, H. (2018). VEGAN: *Community ecology package*. R package version 2.5-2. Retrieved from https://CRAN.R-project.org/package=vegan

Perdereau, E., Bagnères, A.-G., Dupont, S., & Dedeine, F. (2010). High occurrence of colony fusion in a European population of the American termite *Reticulitermes flavipes*. *Insectes Sociaux*, *57*(4), 393–402. https://doi.org/10.1007/s00040-010-0096-z

Perdereau, E., Bagnères, A.-G., Vargo, E. L., Baudouin, G., Xu, Y., Labadie, P., … Dedeine, F. (2015). Relationship between invasion success and colony breeding structure in a subterranean termite. *Molecular Ecology*, *24*(9), 2125–2142. https://doi.org/10.1111/mec.13094

Port, J. A., O'Donnell, J. L., Romero-Maraccini, O. C., Leary, P. R., Litvin, S. Y., Nickols, K. J., … Kelly, R. P. (2016). Assessing vertebrate biodiversity in a kelp forest ecosystem using environmental DNA. *Molecular Ecology*, *25*, 527–541. https://doi.org/10.1111/mec.13481

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., … Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*, 590–596. https://doi.org/10.1093/nar/gks1219

Radek, R., Meuser, K., Strassert, J. F. H., Arslan, O., Teßmer, A., Šobotník, J., … Brune, A. (2018). Exclusive gut flagellates of Serritermitidae suggest a major transfaunation event in lower termites: Description of *Heliconympha glossotermitis* gen. nov. spec. nov. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *65*(1), 77–92. https://doi.org/10.1111/jeu.12441

Raychoudhury, R., Sen, R., Cai, Y., Sun, Y., Lietze, V.-U., Boucias, D. G., & Scharf, M. E. (2013). Comparative metatranscriptomic signatures of wood and paper feeding in the gut of the termite *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae): Termite gut metagene expression. *Insect Molecular Biology*, *22*(2), 155–171. https://doi.org/10.1111/imb.12011

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, *4*, e2584. https://doi.org/10.7717/peerj.2584

Rossmassler, K., Dietrich, C., Thompson, C., Mikaelyan, A., Nonoh, J. O., Scheffrahn, R. H., … Brune, A. (2015). Metagenomic analysis of the microbiota in the highly compartmented hindguts of six wood- or soil-feeding higher termites. *Microbiome*, *3*, 56. https://doi.org/10.1186/s40168-015-0118-1

Russell, S. L. (2019). Transmission mode is associated with environment type and taxa across bacteria–eukaryote symbioses. *FEMS Microbiology Letters*, *366*, fnz013. https://doi.org/10.1093/femsle/fnz013

Sabree, Z. L., & Moran, N. A. (2014). Host-specific assemblages typify gut microbial communities of related insect species. *SpringerPlus*, *3*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-138

Sachs, J. L., Mueller, U. G., Wilcox, T. P., & Bull, J. J. (2004). The evolution of cooperation. *The Quarterly Review of Biology*, *79*(2), 135–160. https://doi.org/10.1086/383541

Salem, H., Florez, L., Gerardo, N., & Kaltenpoth, M. (2015). An out-of-body experience: The extracellular dimension for the transmission of mutualistic bacteria in insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1804), 20142957. https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2957

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., … Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(23), 7537–7541. https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09

Sharon, G., Segal, D., Ringo, J. M., Hefetz, A., Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2010). Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(46), 20051–20056. https://doi.org/10.1073/pnas.1302980110

Shimada, K., Lo, N., Kitade, O., Wakui, A., & Maekawa, K. (2013). Cellulolytic protist numbers rise and fall dramatically in termite queens and kings during colony foundation. *Eukaryotic Cell*, *12*(4), 545–550. https://doi.org/10.1128/EC.00286-12

Sneck, M. E., Rudgers, J. A., Young, C. A., & Miller, T. E. X. (2017). Variation in the prevalence and transmission of heritable symbionts across host populations in heterogeneous environments. *Plant Microbe Interactions*, *74*, 640–653. https://doi.org/10.1007/s00248-017-0964-4

Stingl, U., & Brune, A. (2003). Phylogenetic diversity and whole-cell hybridization of oxymonad flagellates from the hindgut of the wood-feeding lower termite *Reticulitermes flavipes*. *Protist*, *154*(1), 147–155. https://doi.org/10.1078/143446103764928530

Taerum, S. J., De Martini, F., Liebig, J., & Gile, G. H. (2018). Incomplete co-cladogenesis between *Zootermopsis* termites and their associated protists. *Environmental Entomology*, *47*(1), 184–195. https://doi.org/10.1093/ee/nvx193

Tai, V., James, E. R., Nalep, C. A., Scheffrahn, R. H., Perlman, S. J., & Keelinga, P. J. (2015). The role of host phylogeny varies in shaping microbial diversity in the hindguts of lower termites. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(3), 1059–1070. https://doi.org/10.1128/AEM.02945-14

Vargo, E. L., & Husseneder, C. (2011). Genetic structure of termites colonies and populations. In D. E. Bignell, Y. Roisin, & N. Lo (Eds.), *Biology of termites: A modern synthesis* (pp. 321–348). Dordrecht, the Netherlands: Springer.

Vieau, F. (2001). Comparison of the spatial distribution and reproductive cycle of *Reticulitermes santonensis* Feytaud and *Reticulitermes lucifugus grassei* Clément (Isoptera, Rhinotermitidae) suggests that they represent introduced and native species, respectively. *Insectes Sociaux*, *48*, 57–62. https://doi.org/10.1007/PL00001746

Waidele, L., Korb, J., Voolstra, C. R., Künzel, S., Dedeine, F., & Staubach, F. (2017). Differential ecological specificity of protist and bacterial

microbiomes across a set of termite species. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02518

Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(16), 5261–5267. https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07

Wang, Y., Naumann, U., Wright, S. T., & Warton, D. I. (2012). MVABUND – An R package for model-based analysis of multivariate abundance data. *Methods in Ecology and Evolution*, *3*, 471–474. https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00190.x

Weiss, S., Xu, Z. Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., Gonzalez, A., … Knight, R. (2017). Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome*, *5*, 27. https://doi.org/10.1186/s40168-017-0237-y

Wickham, H., & Chang, W. (2016). GGPLOT2*: Elegant graphics for data analysis*. Berlin, Germany: Springer.

Yamamura, N. (1993). Vertical Transmission and evolution of mutualism from parasitism. *Theoretical Population Biology*, *44*, 95–109. https://doi.org/10.1006/tpbi.1993.1020

Yamin, M. A. (1979). Flagellates of the orders Trichomonadida Kirby, Oxymonadida Grassé, and Hypermastigida Grassi & Foa reported from lower termites (Isoptera families Masotermitidae, Kalotermitidae, Hodoternitidae, Termopsidae, Rhinotermitidae, and Serritermitidae) and from the wood-feeding roach *Cryptocercus* (Dictyoptera: Cryptocercidae). *Sociobiology*, *4*(1), 5–119.

Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., … Glöckner, F. O. (2014). The SILVA and 'all-species Living Tree Project (LTP)' taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Reasearch*, *42*, 643–648. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209

Yoshimura, T. (1995). Contribution of the protozoan fauna to nutritionalm physiology of the lower termite, Coptotermes formosanus Shiraki *(Isoptera: Rhinotermitidae). Wood Research*, *82*, 68–129.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Michaud C, Hervé V, Dupont S, et al. Efficient but occasionally imperfect vertical transmission of gut mutualistic protists in a wood-feeding termite. *Mol Ecol*. 2020;29:308–324. https://doi.org/10.1111/mec.15322

Caroline MICHAUD

DYNAMIQUE DES SYMBIOSES MUTUALISTES HÔTES-MICROBIOTES :

Mode et efficacité de transmission des symbiotes dans les populations du termite xylophage *Reticulitermes grassei*

Résumé

De nombreux animaux dont l'espèce humaine vivent en association symbiotique avec des microorganismes intestinaux participant à des fonctions essentielles (nutrition, immunité). La transmission dite 'verticale' des symbiotes (c.-à-d., des parents aux descendants) devrait stabiliser ces symbioses, notamment en renforçant la fidélité entre partenaires. Cependant, l'efficacité de la transmission verticale a rarement été étudiée, en particulier chez les hôtes hébergeant une communauté microbienne (ou 'microbiote') complexe, composée de nombreux taxa microbiens interagissant les uns avec les autres et avec leur hôte.

L'objectif de ce travail était d'étudier le mode et l'efficacité de transmission des microbes intestinaux (protistes et bactéries) aidant le termite xylophage *Reticulitermes grassei* à digérer le bois ingéré (fibres de lignocellulose). Nos résultats ont révélé des situations très contrastées entre microbes. Alors que les protistes se transmettent verticalement de manière efficace, la plupart des taxa bactériens ne se transmettent pas uniquement verticalement, mais semblent s'acquérir à partir de l'environnement.

Mots-clés : Symbiose nutritionnelle, microbiote intestinal, maintien du mutualisme, transmission verticale et horizontale, fidélité entre partenaires, Rhinotermitidae, bactéries, protistes flagellés.

Abstract

Many animals including humans live in symbiotic interaction with gut microorganisms contributing to essential functions (nutrition, immunity). The 'vertical' way of transmission of symbionts (i.e., from parents to offspring) must stabilise these symbioses, notably by strengthening partner fidelity. However, the efficiency of vertical transmission has rarely been studied, especially in the case where hosts harbour a complex microbial community (or 'microbiota') composed by many microbial taxa interacting between them and with the host.

The objective of this work was to study the mode and efficiency of transmission of gut microorganisms (protists and bacteria) helping the wood-feeding termite *Reticulitermes grassei* to digest ingested wood (lignocellulose fibres). Our results revealed contrasted situations between microorganisms. While protists are efficiently vertically transmitted, the majority of bacterial taxa is not only vertically transmitted but seems to be acquired by the environment.

Key words: Nutritional symbiosis, gut microbiota, mutualism maintenance, vertical and horizontal transmission, partner fidelity, Rhinotermitidae, bacteria, flagellate protists.