



HAL
open science

Stratégies de reproduction et de dispersion chez deux termites humivores de Guyane, *Embiratermes neotenicus* et *Silvestritermes minutus* (Termitidae, Syntermitinae)

Romain Fougeyrollas

► **To cite this version:**

Romain Fougeyrollas. Stratégies de reproduction et de dispersion chez deux termites humivores de Guyane, *Embiratermes neotenicus* et *Silvestritermes minutus* (Termitidae, Syntermitinae). Biodiversité et Ecologie. Université Paris-Est, 2016. Français. NNT : 2016PESC1112 . tel-01541566

HAL Id: tel-01541566

<https://theses.hal.science/tel-01541566v1>

Submitted on 19 Jun 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat

Champ disciplinaire : Écologie évolutive

présentée par

Romain FOUGEYROLLAS

pour l'obtention du titre de docteur de l'Université Paris-Est

soutenue le 16 décembre 2016

**Stratégies de reproduction et dispersion de deux termites
humivores de Guyane, *Embiratermes neotenicus* et
Silvestritermes minutus (Termitidae, Syntermitinae)**

Thèse dirigée par :

David SILLAM-DUSSÈS

Maître de Conférences, Université Paris 13, Villetaneuse

Co encadrée par :

Virginie ROY

Maître de Conférences, Université Paris-Est Créteil

Jury :

Anne-Geneviève BAGNÈRES

Directeur de recherche, IRBI, Tours

Rapporteur

Claudie DOUMS

Professeur, EPHE, Paris

Rapporteur

Dominique FRESNEAU

Professeur émérite, Université Paris 13,
Villetaneuse

Examinateur

Robert HANUS

Chargé de recherche, IOCHB, Prague

Examinateur

David SILLAM-DUSSÈS

Maître de Conférences, Université Paris 13,
Villetaneuse

Directeur de thèse

Virginie ROY

Maître de Conférences, Université Paris-Est
Créteil

Co encadrant

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Anne-Geneviève Bagnères, Claudie Doums, Dominique Fresneau et Robert Hanus d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, David Sillam-Dussès, de m'avoir soutenu et encouragé pendant ses trois années. Merci pour m'avoir permis de découvrir un autre aspect de la recherche à travers mes premières missions sur le terrain en Guyane et d'avoir partagé avec moi sa grande expérience de baroudeur hors pair ! Je suis très fier d'avoir été son premier thésard officiel (en espérant que la réciprocité soit vraie sinon je retire ce que j'ai dit !).

Je remercie Virginie Roy qui m'a « co encadré » pendant cette thèse et « dirigé » à plusieurs reprises dans le passé que ce soit lors de mon premier stage de L3 où elle m'a fait découvrir le monde fantastique des termites, en passant par mes stages de M1 et M2. Merci à elle d'avoir partagé ses connaissances et ses compétences scientifiques avec moi, j'ai énormément appris à ses côtés.

Je tiens également à remercier Evelyne Garnier-Zarli qui a dirigé cette thèse durant la première année.

Je tiens à remercier Myriam Harry, Lise Dupont et Chantal Poteaux-Léonard qui ont accepté de faire partie de mon comité de thèse.

Un grand merci à toute l'équipe qui m'a accueilli pendant toutes ces années (ex BIOEMCO, ex DIIM et aujourd'hui ECOTERM) : Philippe Mora, Corinne Rouland-Lefevre, Edouard Miambi, Michel Diouf, Mireille Vasseur, Stéphanie Giusti-Miller, Sophie Fréchault, Hana Nabil, Thi My Dung Jusselme, Léonide Célini. Merci à Sophie de m'avoir aidé dans les manips pendant cette thèse. Merci à eux pour leur bonne humeur et pour avoir fait régner une si bonne ambiance.

Merci également aux autres équipes de l'UPEC (IPE, GSE et BIODIS) que j'ai pu côtoyer pendant ces trois années et en particulier à mes collègues thésardes Shabnam Taheri, Charlotte Pruvost et Corinne Agapit avec qui j'ai passé de très bons moments.

Merci aux stagiaires qui ont travaillé avec moi et qui m'ont permis d'avancer dans les manips : Akil Mougammadally, Ounissa Hamidouche et Florence Grange.

Je tiens à remercier Robert Hanus (une nouvelle fois), Klára Dolejšová et Jan Křivánek avec qui j'ai eu la chance de collaborer pendant cette thèse. Un merci tout particulier à Robert qui a fait plus que collaborer à cette thèse et avec qui j'ai beaucoup appris que ce soit sur le terrain ou au travers des nombreux échanges que nous avons eu pendant ces trois ans.

Merci également à Natacha Martin, la technicienne responsable de la plateforme génomique de l'IMRB de l'hôpital Henri Mondor, pour son efficacité.

Un grand merci à tous mes amis proches, Élodie, Mélanie, Mélissa, Justine, Charlotte et Sylvain qui ont toujours été là pour moi, pour me soutenir et m'encourager.

Merci à ma famille, et en particulier à ma sœur, pour avoir toujours été là quand il le fallait, dans les bons moments comme dans les moments un peu plus difficiles.

Résumé

Chez les insectes sociaux, les reproductrices doivent faire face à un dilemme entre coûts et bénéfices de la reproduction asexuée et sexuée. Récemment, il a été montré que les reines termites pouvaient résoudre ce dilemme en optant pour l'utilisation alternée de la reproduction asexuée et sexuée, en produisant des femelles secondaires néoténiques par parthénogenèse, et les ouvriers, soldats et futurs essaimants par reproduction sexuée. Cette stratégie, appelée AQS pour « Asexual Queen Succession », a été décrite chez trois termites souterrains xylophages de la famille des Rhinotermitidae. Deux espèces humivores appartenant à la famille des Termitidae et particulièrement abondantes en forêt néotropicale, *Embiratermes neotenicus* et *Silvestritermes minutus* (Syntermitinae), semblaient être des nouvelles candidates pour cette stratégie, car elles présentaient des nids menés par de nombreuses femelles néoténiques. Pour confirmer cette hypothèse et déterminer l'origine génétique de ces femelles, des castes stériles et des futurs essaimants, nous avons développé une banque de microsatellites spécifiques pour *E. neotenicus* et *S. minutus*, et génotypé une dizaine de colonies du site de Petit Saut en Guyane, pour chaque espèce. Nous avons confirmé que les castes stériles et les imagos étaient issus pour la très grande majorité de reproduction sexuée, alors que les femelles néoténiques étaient issues de parthénogenèse avec fusion centrale, un mécanisme différent de celui décrit chez les Rhinotermitidae. La reconstruction détaillée du cycle de vie de *S. minutus* nous a permis de conclure que l'AQS, au-delà des bénéfices communs à toutes les espèces i.e. la succession de plusieurs générations de reproductrices sans dilution de la participation génétique de la reine fondatrice, l'augmentation du potentiel reproductif de la colonie et la prévention de la consanguinité chez les castes stériles et les imagos, permettait à cette espèce d'investir dans un seul événement massif d'essaimage pendant un cycle de vie très court. D'autre part, nous avons réalisé une analyse de structuration génétique des colonies et des populations d'*E. neotenicus* et de *S. minutus* dans le but de comprendre les conséquences de la dispersion, des modalités d'appariement et de la participation des différents reproducteurs sur la consanguinité des colonies et la potentialité de colonisation de ces espèces. Pour environ 40 colonies de chaque espèce, nous avons montré que les reproducteurs fondateurs étaient très majoritairement non apparentés, et une absence de viscosité à une échelle locale (1 à 11 km), suggérant une dispersion importante des essaimants. De plus, seule une très faible structuration génétique a pu être détectée sur l'ensemble du site d'échantillonnage, indiquant des flux de gènes peu contraints.

Mots-clés : Termites humivores – Termitidae – Stratégie de reproduction – Dispersion – Microsatellites

Abstract

In social insects, reproductive females have to face a dilemma between costs and advantages of asexual and sexual reproduction. Recently, termite queens were shown to be able to solve this dilemma by using alternatively asexual and sexual reproduction, with the production of secondary neotenic females by parthenogenesis, and workers, soldiers and future alate reproductives by sexual reproduction. This strategy, called AQS for Asexual Queen Succession, was described in three subterranean xylophagous termites of the Rhinotermitidae family. Two soil-feeding species belonging to the Termitidae family, and particularly abundant in Neotropical forest, *Embiratermes neotenicus* and *Silvestritermes minutus* (Syntermitinae), seemed to be new candidates for this strategy since they showed colonies headed by numerous neotenic females. In order to confirm this hypothesis and determine the genetic origin of these females, of sterile castes and future imagoes, we developed specific microsatellite libraries for *E. neotenicus* and *S. minutus*, and genotyped about ten colonies for each species, on the site of Petit Saut in French Guiana. We confirmed that sterile castes and imagoes were mostly produced by sexual reproduction, while neotenic females were produced by parthenogenesis with central fusion, a mechanism different from that described in Rhinotermitidae species. The detailed reconstruction of *S. minutus* life cycle allowed us to conclude that AQS, in addition to advantages common to all species i.e. succession of queen generations with undiluted genetic input of the foundress, multiplication of reproductive potential of the colony and prevention of inbreeding in sterile castes and dispersers, would allow this species to optimize a single dispersal event within a very short life cycle. Otherwise, we realized an analysis of colony and population genetic structuration of both species in order to understand consequences of dispersion, mating strategies and parental allocation on inbreeding and colonization abilities of both species. For about 40 colonies of each species, we showed that most of founding reproductives were not related, and absence of genetic viscosity at a local scale (1 to 11 km) suggesting long dispersal flights of alates. Furthermore, only a weak genetic structuration was detected, indicating unfettered gene flows on the sampling site.

Keywords: Soil-feeding termites – Termitidae – Reproductive strategy – Dispersion – Microsatellites

Table des matières

-Introduction-	3
-Synthese bibliographique-	7
1. Présentation générale des termites	8
1.1. Diversité, distribution et classification taxonomique	8
1.2. Classifications fonctionnelles : modes de vie et régimes alimentaires	9
1.3. Importance écologique	11
1.4. Organisation coloniale et cycle de vie.....	12
2. Stratégie reproductive chez les termites	17
2.1. Outils moléculaires.....	18
2.2. Structure reproductive des colonies	20
2.3. Dispersion et flux de gènes	28
3. Reproduction asexuée chez les termites	33
3.1. Généralités et conséquences génétiques de la reproduction asexuée	33
3.2. La parthénogenèse : définition, classification et conséquences génétiques	34
3.3. La parthénogenèse chez les termites	40
-Matériel et Méthodes-	52
1. Description du site d'étude et échantillonnage	53
1.1. Site de Petit Saut en Guyane	53
1.2. Échantillonnage et origine des colonies	54
2. Structure sociale chez <i>S. minutus</i>	57
2.1. Reconstruction du cycle de vie.....	57
2.2. Origine développementale des femelles néoténiques.....	57
2.3. Analyse du sexe-ratio et de l'allocation au sexe chez les imagos.....	58
3. Techniques moléculaires	58
3.1. Extraction de l'ADN génomique total	58
3.2. Marqueurs mitochondriaux	59
3.3. Développement et amplification des marqueurs microsatellites	60
3.4. Visualisation des produits PCR.....	66
4. Analyse des données	66
4.1. Barcoding ADN des colonies	66
4.2. Structure génétique des colonies et des populations	66
-Chapitre 1- Strategie reproductive et dispersion d'<i>Embiratermes neotenicus</i>	72
1. Description du modèle d'étude : <i>Embiratermes neotenicus</i>	73
1.1. Sous-famille des Syntermitinae.....	73
1.2. Genre <i>Embiratermes</i>	74

1.3.	<i>Embiratermes neotenicus</i>	75
2.	Observations de terrain et objectifs généraux du chapitre	76
	Article 1: « Asexual queen succession in the higher termite <i>Embiratermes neotenicus</i> »	79
	Article 2: « Breeding strategy and fine-scale population genetic structure in the soil-feeding termite <i>Embiratermes neotenicus</i> (Termitidae, Syntermitinae) »	92
3.	Principaux résultats des articles 1 et 2	114
	-Chapitre 2- Strategie reproductive et dispersion de <i>Silvestritermes minutus</i>	117
1.	Description du modèle d'étude : <i>Silvestritermes minutus</i>	118
1.1.	Le genre <i>Silvestritermes</i>	118
1.2.	<i>Silvestritermes minutus</i>	119
2.	Observations de terrain et objectifs du chapitre	120
	Article 3: « Asexual Queen Succession and its life history implications in the termite <i>Silvestritermes minutus</i> »	123
3.	Principaux résultats de l'article 3	170
	-Discussion générale-	174
1.	L'AQS chez les Termitidae	175
1.1.	Évolution du système AQS	175
1.2.	Implications du système AQS dans le cycle de vie des espèces	176
1.3.	Modes de parthénogenèse chez les espèces AQS : variabilité et conséquences	179
1.4.	Différenciation des nymphes, ce que nous apportent les nouvelles espèces AQS.	181
1.5.	Mâles néoténiques : occurrence, rôle et conséquences génétiques	184
2.	Stratégies d'accouplement et dispersion chez les Termitidae utilisant l'AQS	186
2.1.	Re-définition des structures familiales appliquées à l'AQS	186
2.2.	Apparement des reproducteurs et stratégies d'accouplement	188
2.3.	Structuration génétique des populations	191
	-Conclusion générale et perspectives-	193
	-Références bibliographiques-	196
	-Annexes-	210

Liste des figures

- Figure 1 :** Voies générales de différenciation des castes chez les non-Termitidae (a) et Termitidae (b) (d'après Hartke and Baer (2011)). 13
- Figure 2 :** Cycle de vie général des termites possédant une caste ouvrière (d'après Lo *et al.* (2009)). Les soldats néoténiques, uniquement observés dans le genre *Zootermopsis*, ne sont pas représentés ici..... 17
- Figure 3 :** Les différents modes de parthénogenèse thélytoque automictique. Sont illustrés les mécanismes avec et sans recombinaison génétique (crossing-over) : fusion centrale, fusion terminale, fusion aléatoire et duplication gamétique (d'après Pearcy *et al.* (2006))..... 38
- Figure 4 :** Schéma général de l'évolution du système AQS au cours du développement de la colonie, décrit chez le genre *Reticulitermes* (d'après Kobayashi *et al.* (2013)). S : reproduction sexuée, P : parthénogenèse..... 45
- Figure 5 :** Schémas illustrant la contribution génétique des reproducteurs à la descendance dans le cas (a) d'une production sexuée classique et (b) du système AQS chez le genre *Reticulitermes*. S : reproduction sexuée, P : parthénogenèse, H : hétérozygotie, valeur en italique : apparemment. 48
- Figure 6 :** (a) barrage de Petit Saut en Guyane, (b) et (c) milieux forestiers caractéristiques des sites échantillonnés et (d) localisation du barrage de Petit Saut. 54
- Figure 7 :** Localisation des différents sites d'échantillonnage le long de la route de Petit Saut en Guyane..... 56
- Figure 8 :** Développement des castes neutres chez *E. chagresi* (d'après Roisin (1992)). L1 – L2 : stade larvaire 1 – 2, O : ouvrier, PS : pré-soldat, S : soldat..... 75
- Figure 9 :** Photographies prises sur le terrain. (a) et (b) nids d'*E. neotenicus*, intact et ouvert pour mettre en évidence la population, respectivement, (c) ouvriers (O) et soldats (S), (d) colonie jeune avec le couple primaire, reine primaire (RP ♀) et roi primaire (RP ♂), ouvriers et soldats et (e) colonie mature avec le roi primaire entouré de nombreuses femelles néoténiques (FN)..... 77
- Figure 10 :** Schéma général de l'évolution du système AQS au cours du développement de la colonie chez *E. neotenicus* et contribution génétique des reproducteurs à la descendance. S : reproduction sexuée, P : parthénogenèse, H : hétérozygotie..... 115
- Figure 11 :** Développement des castes neutres et reproductrices chez (a) *S. heyeri* (d'après Barbosa *et al.* (2012)) et (b) *S. euamignathus* (d'après Haifig and Costa-Leonardo (2016)). L1 et L2 : stades larvaires 1 et 2, O0 : ouvrier de stade 1, O1 : ouvrier de stade 2, PS : pré-soldat, S : soldat, EN : ergatoïde néoténique , N1-N5 : stade nymphal 1 – 5, NN : nymphoïde néoténique, I : imago. Les flèches en pointillé indiquent des voies de différenciation incertaines..... 119

Figure 12 : Photographies prises sur le terrain. (a) nid de *S. minutus*, (b) colonie jeune avec le couple primaire, reine primaire (RP ♀) et roi primaire (RP ♂), ouvriers (O), soldats (S), et larve (L) et (c) colonie mature avec le roi primaire entouré d'une multitude de femelles néoténiques (FN). 121

Figure 13 : Cycle de vie de *S. minutus* reconstruit à partir de la structure sociale observée dans 132 nids collectés en saison sèche et humide au cours de quatre années. RP♂ : roi primaire, RP♀ : reine primaire, NY4 : nymphe de stade 4, FN1 : femelle néoténique de première génération, FN2 : femelle néoténique de deuxième génération, I : imago, O : ouvrier, S : soldat. 172

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste exhaustive des marqueurs microsatellites développés chez les termites. ... 20

Tableau 2 : Liste des termites identifiés comme parthénogènes. ? : mécanisme de restauration de la diploïdie non identifié. 39

Tableau 3 : Organisation en multiplexes des marqueurs microsatellites développés pour *E. neotenicus* et *S. minutus*. En : *Embiratermes neotenicus*, Sm : *Silvestritermes minutus*, Lal : *Labiotermes labralis*. 63

-Introduction-

La reproduction sexuée représente l'un des modes de reproduction les plus répandus dans le règne animal. Malgré ses avantages incontestables, ce système présente des inconvénients importants tels que les coûts liés à l'accouplement et la dilution de la contribution génétique des individus aux générations suivantes. Aussi, beaucoup d'organismes associent à ce mode de reproduction de la reproduction asexuée, aboutissant à des stratégies mixtes particulièrement intéressantes d'un point de vue évolutif (Schön *et al.*, 2009). La structure sociale complexe décrite chez les insectes eusociaux laisse penser que la meilleure option pour les reproductrices serait ainsi de combiner les deux modes de reproduction pour bénéficier de leurs avantages respectifs, à savoir une contribution génétique accrue aux générations suivantes et le maintien d'une diversité génétique suffisante dans la descendance pour faire face aux pressions environnementales, et limiter leurs inconvénients.

L'eusocialité, stade le plus évolué de l'organisation sociale chez les animaux, est caractérisée par une division complexe des rôles des individus, certains étant spécialisés dans la reproduction et d'autres, stériles, dans des actes altruistes (Wilson and Hölldobler, 2005). Ces différentes catégories, appelées castes, coexistent au sein d'une même organisation sociale, la colonie. Chez les termites ou Isoptera, insectes eusociaux diplo-diploïdes, les futurs reproducteurs ailés ou imagos essaient pour fonder de nouvelles colonies. Ils deviennent des reproducteurs primaires, produisant l'ensemble des membres de la colonie. À l'opposé des castes reproductrices, les soldats représentent une caste véritablement altruiste avec une stérilité permanente. Des stades immatures comme les larves et les nymphes, et la caste des ouvriers, le plus souvent stérile, sont également présents dans les colonies. Certains de ces individus sont capables de se différencier en reproducteurs secondaires néoténiques, comme les ouvriers (reproducteurs ergatoïdes) et les nymphes (reproducteurs nymphoïdes) (Noirot, 1956).

La présence de ces reproducteurs additionnels, se reproduisant à l'intérieur du nid, a pour conséquence d'augmenter le taux de croissance et l'expansion de la colonie (Myles, 1999). En cas de mort du roi et/ou de la reine primaires, ils peuvent également prendre la tête de la colonie. La reproduction secondaire philopatrise représente un aspect crucial dans la stratégie de reproduction de nombreuses espèces de termites, car elle est souvent associée à une forte abondance locale, une capacité de colonisation élevée et un grand succès écologique. La présence de reproducteurs secondaires est fréquente chez certaines familles de termites non-Termitidae, chez qui ils ont été décrits dans plus de 60% des genres (Myles, 1999). Cette stratégie reproductive a été particulièrement décrite chez les espèces xylophages,

comme les espèces du genre *Reticulitermes*, dont la plupart sont invasives. À l'inverse, la stratégie reproductive la plus souvent observée dans la famille des Termitidae repose sur une seule reine primaire physogastre très féconde qui va vivre longtemps et produire un grand nombre d'individus en s'accouplant avec un unique roi primaire. Aussi, la production de reproducteurs néoténiques a rarement été décrite chez les Termitidae.

Au cours de plusieurs missions de terrain en Guyane, trois espèces de Termitidae particulièrement abondantes en forêt tropicale, *Embiratermes neotenicus* (Syntermitinae), *Silvestritermes minutus* (Syntermitinae) et *Cavitermes tuberosus* (Termitinae) ont fait l'objet d'une observation approfondie. La dissection des colonies de ces trois espèces a révélé la co-existence de nombreux reproducteurs néoténiques, toutes femelles et nymphoïdes, avec le roi primaire et très rarement avec la reine primaire. Récemment, il a été montré chez trois espèces xylophages considérées comme nuisibles pour l'homme, un système de reproduction appelé AQS, pour « Asexual Queen Succession ». Dans ce système, les reines primaires produisent de nombreuses femelles secondaires nymphoïdes par parthénogenèse et les ouvriers, les soldats et les imagos par reproduction sexuée (Luchetti *et al.*, 2013b, Matsuura *et al.*, 2009, Vargo *et al.*, 2012). L'organisation coloniale particulière observée chez les trois espèces de Termitidae a soulevé un grand nombre de questions auxquelles ce travail de thèse a tenté de répondre, à savoir :

- Les femelles nymphoïdes sont-elles produites par reproduction sexuée ou par parthénogenèse et peut-on parler d'AQS chez ces espèces ?
- Cette stratégie est-elle constante dans le cycle de vie des espèces ?
- À quel moment du cycle de vie les femelles nymphoïdes apparaissent-elles et coexistent-elles avec la reine primaire ?
- Quels sont les bénéfices et les désavantages de cette stratégie en regard du cycle de vie des espèces ? Peut-on parler de valeur adaptative pour le succès écologique de ces espèces ?
- Quel est le contexte écologique et phylogénétique de l'apparition de cette stratégie reproductive ?

Les objectifs généraux de cette thèse ont donc été de (i) définir l'origine génétique des individus à l'intérieur des colonies afin d'identifier le système de reproduction, (ii) décrire la structure génétique des colonies, afin de comprendre les modalités d'accouplement et de dispersion des reproducteurs et (iii) décrire la structure génétique des populations afin de mettre en évidence la relation entre stratégie de reproduction et succès écologique. Il nous a

paru nécessaire d'étudier pour cela trois espèces plutôt qu'une seule. *E. neotenicus* est apparue dans un premier temps comme l'espèce historique et emblématique de la reproduction secondaire, puisqu'un grand nombre de néoténiques avait été décrit par Holmgren dès 1906. Elle constituait donc la première candidate pour démontrer l'existence de l'AQS chez les Termitidae. Cependant, ses colonies populeuses et son mode de vie cryptique au moment de la fondation des nids ne permettait pas de répondre à toutes les questions relatives au cycle de vie des espèces. L'étude de *S. minutus*, dans un second temps, nous a permis d'aborder une dimension plus écologique de la stratégie. L'étude de la stratégie reproductive de *C. tuberosus* a été réalisée en parallèle de ce travail, dans le cadre de la thèse de Simon Hellemans, à l'Université Libre de Bruxelles. Les résultats concernant *C. tuberosus* ont donc été intégrés à la discussion générale de ce manuscrit.

Dans la première partie de cette thèse, une synthèse bibliographique retracera l'état de l'art sur les stratégies reproductives et la dispersion chez les termites. La seconde partie sera consacrée à la présentation du site d'étude, de l'échantillonnage réalisé et des méthodes génétiques et statistiques utilisées. Les résultats obtenus seront ensuite présentés dans deux chapitres distincts, un pour chaque modèle d'étude du fait de l'organisation des publications. Enfin, une discussion générale ainsi qu'une conclusion et les perspectives de ce travail de thèse seront présentées.

-Synthèse bibliographique-

1. Présentation générale des termites

Les termites, au même titre que certaines fourmis, abeilles et guêpes, sont décrits comme des organismes eusociaux. L'eusocialité est considérée comme le plus haut niveau de la socialité et se définit comme un état avancé de l'organisation coloniale avec des membres de la colonie appartenant à au moins deux générations chevauchantes, une coopération dans le soin aux jeunes et une division des tâches, effectuées par des individus spécialisés appartenant à différentes castes (castes reproductrices et stériles) (Crespi and Yanega, 1995, Wilson and Hölldobler, 2005). À la différence des Hyménoptères sociaux qui sont haplo-diploïdes (mâles haploïdes et femelles diploïdes), les individus des deux sexes sont diploïdes chez les termites et les castes stériles (ouvriers et soldats) sont constituées de mâles et/ou de femelles selon les espèces. L'eusocialité est apparue indépendamment chez les Hyménoptères et les termites avec une apparition unique chez ces derniers tandis qu'elle a évolué au moins dix fois de façon indépendante chez les fourmis, les abeilles et les guêpes (Rabeling and Kronauer, 2013, Thorne, 1997). L'eusocialité chez les termites et les fourmis serait une des clés de leur succès écologique, ces deux groupes d'insectes sociaux représentant plus de la moitié de la biomasse des insectes (Wilson and Hölldobler, 2005).

1.1. Diversité, distribution et classification taxonomique

Avec près de 3000 espèces et 290 genres, une biomasse de 100 g/m² et une abondance 10000 individus/m² en forêt tropicale (Constantino, 1998, Eggleton *et al.*, 1996, Grimaldi and Engel, 2005, Krishna *et al.*, 2013), les termites forment un groupe écologique d'invertébrés dominant en région tropicale où le climat est favorable à leur développement (milieux chauds et humides). Dans ces milieux, la biomasse des termites représente jusqu'à 75% des insectes, 95% des insectes du sol (Watt *et al.*, 1997) et 10% des animaux terrestres (Bignell and Eggleton, 2000).

Les termites forment un groupe monophylétique ayant évolué à partir des blattes xylophages et sont aujourd'hui inclus dans l'ordre des Blattodea (Eggleton *et al.*, 2007, Inward *et al.*, 2007a, Inward *et al.*, 2007b). La monophylie des termites a été admise dans les différentes études phylogénétiques récentes (Bourguignon *et al.*, 2014, Inward *et al.*, 2007b, Ohkuma *et al.*, 2004). Ils sont notamment caractérisés par des synapomorphies morphologiques (tête des imagos et des ouvriers prognathes, réduction du pronotum,...) et un niveau social avancé (Krishna *et al.*, 2013). Les termites actuels sont répartis en neuf familles

(Bourguignon *et al.*, 2014, Engel *et al.*, 2009, Krishna *et al.*, 2013) : les Mastotermitidae, les Hodotermitidae, les Archotermopsidae, les Stolotermitidae, les Kalotermitidae, les Stylotermitidae, les Rhinotermitidae, les Serritermitidae et les Termitidae. Ces différentes familles sont traditionnellement différenciées en termites "inférieurs" (non-Termitidae) et termites "supérieurs" (Termitidae). Les Termitidae ont perdu les zooflagellés symbiotiques présents dans l'intestin des non-Termitidae. Cette perte est compensée par une symbiose uniquement bactérienne accompagnée d'une complexification du tube digestif leur permettant de digérer la cellulose sans zooflagellés. Cette différenciation entre termites « inférieurs » et « supérieurs » n'est pas valable d'un point de vue phylogénétique puisque seuls les Termitidae forment un groupe monophylétique, les termites « inférieurs » étant paraphylétiques.

La famille des Termitidae présente la radiation la plus récente, avec une diversification depuis l'ère Tertiaire à l'origine d'une hausse de l'abondance des termites à cette période (Engel *et al.*, 2009). Les Termitidae montrent la plus grande diversité, que ce soit en termes de richesse spécifique (2092 espèces réparties en 249 genres, soit 70% des espèces décrites de termites) (Krishna *et al.*, 2013), de mode de vie ou de régime alimentaire, parmi les familles de termites. Cette famille est constituée de sept sous-familles (Engel *et al.*, 2009) : les Macrotermitinae, Sphaerotermatinae, Cubitermitinae, Apicotermatinae, Syntermitinae, Termitinae et Nasutitermitinae.

1.2. Classifications fonctionnelles : modes de vie et régimes alimentaires

La grande diversité des termites s'illustre également dans leur mode de vie et leur régime alimentaire, très variables selon les familles voire les espèces. Une classification écologique des termites a été établie en se référant aux différents modes de vie décrits (Abe, 1987, Shellman-Reeve, 1997) :

- Les « **single-piece nesters** » : le nid est également la source de nourriture (bois). On y retrouve par exemple les Archotermopsidae et les Kalotermitidae.
- Les « **intermediate nesters** » : le nid et la nourriture se retrouvent dans le même substrat, principalement le bois. Cependant les termites peuvent creuser des galeries souterraines afin de trouver d'autres sources de nourriture et éventuellement changer de nid. On peut citer comme exemple les Rhinotermitidae.

- Les « **separate nesters** » : le nid et la source de nourriture sont bien séparés. Les termites vont ainsi se déplacer à l'extérieur du nid, parfois en construisant d'importantes galeries, pour chercher la nourriture. Les substrats sont très variés et la construction des termitières se fait souvent par transformation de la matière fécale dans le substrat d'origine. La grande majorité des termites de ce type appartient à la famille des Termitidae.

Donovan *et al.* (2001) ont également proposé une classification écologique des termites selon leurs régimes alimentaires. Cette classification est basée sur le gradient d'humification de la matière végétale consommée, c'est-à-dire la consommation de plantes à différents niveaux de décomposition (croissant des groupes I à IV) et sur la complexification de la morphologie de l'intestin (croissante des groupes I à IV) :

- **Le Groupe I** regroupe les termites xylophages non-Termitidae se nourrissant de bois mort, d'herbe et de litière. Leurs intestins présentent une symbiose avec des zooflagellés.
- **Le Groupe II** regroupe les Termitidae se nourrissant de bois mort, d'herbe et de litière mais aussi de micro-épiphytes. Leurs intestins présentent une symbiose avec des champignons basidiomycètes.
- **Le Groupe III**, ou humivores, regroupe les Termitidae consommant la couche supérieure du sol riche en matière organique (beaucoup de matière végétale reconnaissable). Leurs intestins présentent une symbiose avec des bactéries.
- **Le Groupe IV**, ou humivores vrais, rassemble les Termitidae qui s'alimentent du sol et de ses éléments minéraux (matière végétale peu reconnaissable).

Les différents modes d'alimentation mettent en évidence principalement des espèces xylophages (groupes I et II) et humivores (groupes III et IV). Même si ces classifications distinguent non-Termitidae et Termitidae, on retrouve par exemple chez les Termitidae, certains Nasutitermitinae, qui malgré un tube digestif complexe sont revenus à une alimentation xylophage.

1.3. Importance écologique

Les termites occupent un rôle majeur dans les écosystèmes, trop souvent négligé par rapport à l'image néfaste qu'ils renvoient. En effet, les termites sont principalement connus comme étant des insectes nuisibles qui endommagent les infrastructures humaines et les cultures agricoles, occasionnant des coûts relativement importants (Rouland-Lefèvre, 2011, Su and Scheffrahn, 2000). Toutefois, seules 12,4% des espèces sont considérées comme nuisibles, dont 3,5% sont considérées comme des menaces sérieuses capables de causer des dégâts de grande envergure (Krishna *et al.*, 2013). Ces espèces sont pour la très grande majorité des xylophages qui s'attaquent au bois sec et humide comme les Rhinotermitidae (e.g. *Reticulitermes* spp.) qui sont bien connus en milieu tempéré pour causer des problèmes dans certaines villes (e.g. dégât sur les habitations), ou encore les Nasutitermitinae qui comptent beaucoup d'espèces nuisibles en milieu tropical (Constantino, 2002).

Dans les écosystèmes tropicaux, les termites sont, avec les vers de terre, les principaux décomposeurs de matière végétale et sont responsables de près de 50% de la dégradation et de la minéralisation de la matière organique du sol (Eggleton, 2000, Eggleton *et al.*, 1996). Ils jouent un rôle important dans la dynamique et le remaniement de la matière organique mais également sur la morphologie des sols et leurs propriétés physico-chimiques (Lopes de Gerenyu *et al.*, 2015, Siebers *et al.*, 2015). Ces différentes activités ont permis de qualifier les termites d'ingénieurs des écosystèmes (Bignell, 2006, Jones *et al.*, 1996).

En particulier, les termites humivores sont les principaux acteurs de ces remaniements des sols tropicaux. La matière organique ainsi que l'action de mastication du sol par ces termites, pour l'alimentation ou la construction des termitières, jouent un rôle déterminant dans la stabilité physique des sols proches du nid et de la termitière en elle-même (Garnier-Sillam *et al.*, 1991). Ainsi, l'activité biologique des humivores, via l'incorporation au nid et au sol à proximité de micro-agrégats organo-minéraux formés, stabilise les composés humiques formés et contribue ainsi au processus d'humification dans les sols. Elle participe ainsi à la préservation de la matière organique dans les environnements tropicaux caractérisés par un processus rapide de minéralisation. Les termitières des espèces humivores sont construites avec des matériaux provenant majoritairement de l'horizon superficiel du sol. Elles sont enrichies en carbone, azote et éléments fins provenant de l'incorporation au nid des déjections plus riches en matière organique (Brauman and Fall, 1998, Garnier-Sillam and Harry, 1995). Ces caractéristiques physico-chimiques des termitières pourraient avoir un effet

très positif sur la fertilité des sols tropicaux notamment pauvres en phosphore et bases échangeables. Cependant compte-tenu de la faible répartition spatiale des termitières humivores, ces changements auraient surtout un bénéfice local (Wood, 1988).

La présence des termites humivores étant dépendante de la disponibilité en matière organique dans le milieu, ils sont donc sensibles à toute perturbation que le milieu pourrait subir que ce soit en termes de qualité et/ou d'abondance de la matière organique. Plusieurs études, la plupart menées en forêt tropicale, ont montré que la richesse spécifique des termites était considérablement réduite dans des milieux soumis à des perturbations (Bandeira *et al.*, 2003, Eggleton *et al.*, 1995, Jones *et al.*, 2003, Lawton *et al.*, 1998, Luke *et al.*, 2014). Parmi les différents groupes trophiques de termites, les espèces humivores ont été décrites comme plus sensibles en cas de modification/perturbation des habitats (e.g. anthropisation, fragmentation) avec une baisse drastique de leur diversité en fonction du degré de perturbation. La morphologie de ces espèces (petite taille et corps mou), le degré élevé dans la spécialisation des ressources et leur capacité restreinte de recolonisation sont des éléments pouvant expliquer cette sensibilité (Eggleton *et al.*, 1998, Gathorne-Hardy *et al.*, 2000). Les termites humivores représentent ainsi des bio-indicateurs potentiels de l'état de perturbation des systèmes (Brauman and Fall, 1998).

1.4. Organisation coloniale et cycle de vie

Une colonie de termite peut se définir comme une famille dont tous les membres vivent ensemble à l'intérieur d'une structure qui est la termitière. Elle est ainsi constituée de deux composantes indissociables : d'une part la vie à l'intérieur de la colonie avec l'ensemble des interactions et des fonctions assurées par les individus et d'autre part la structure biogénique. Toutes les fonctions vitales permettant à la colonie de perdurer dans le temps à savoir la reproduction et la dispersion, la construction, l'alimentation, l'entretien et la défense sont assurées par différents groupes ou catégories d'individus, appelés castes, spécialisées dans chacune de ces fonctions. Un individu seul est dans l'incapacité d'accomplir l'ensemble de ces fonctions comme pourrait le faire un insecte solitaire. Les ouvriers et les soldats ne peuvent pas se reproduire (caste stérile), les soldats et les reproducteurs ne se nourrissent pas par eux-mêmes et les ouvriers et les reproducteurs n'assurent pas la défense de la colonie de manière efficace. C'est en cela qu'une colonie de termite peut être réellement considérée comme un « superorganisme » (Eggleton, 2011).

Les termites sont des insectes hétérométaboles, la larve possédant à l'éclosion déjà la plupart des caractères des adultes, sauf les ailes et les organes reproducteurs qui se formeront, ou non, dans le cas d'une différenciation en caste sexuée ou stérile, respectivement. Chez les Termitidae, le développement des castes présente une faible plasticité. La différenciation en individus reproducteurs ou stériles se fait de manière irréversible après la première mue larvaire (voie de différenciation bifurquée, Figure 1) (Hartke and Baer, 2011, Roisin, 2000, Roisin and Korb, 2011). La voie de développement de la voie nymphale, menant à la différenciation en reproducteurs, est généralement constante tandis que la voie des individus stériles peut varier selon les espèces, tout en gardant un nombre réduit de stades ouvriers (Noirot, 1969, Roisin, 2000). Chez les termites appartenant aux autres familles, les voies de différenciation des castes présentent une plasticité beaucoup plus importante. En effet, des retours en arrière sont possibles comme par exemple chez les nymphes qui peuvent subir des mues régressives pour retourner au stade pseudergate (stade immature proche des ouvriers) plutôt que de se différencier en imago ou encore les soldats qui peuvent se différencier en reproducteurs néoténiques (reproducteurs secondaires) à travers une mue spécifique (voie de différenciation linéaire, Figure 1) (Hartke and Baer, 2011, Roisin, 2000, Roisin and Korb, 2011).

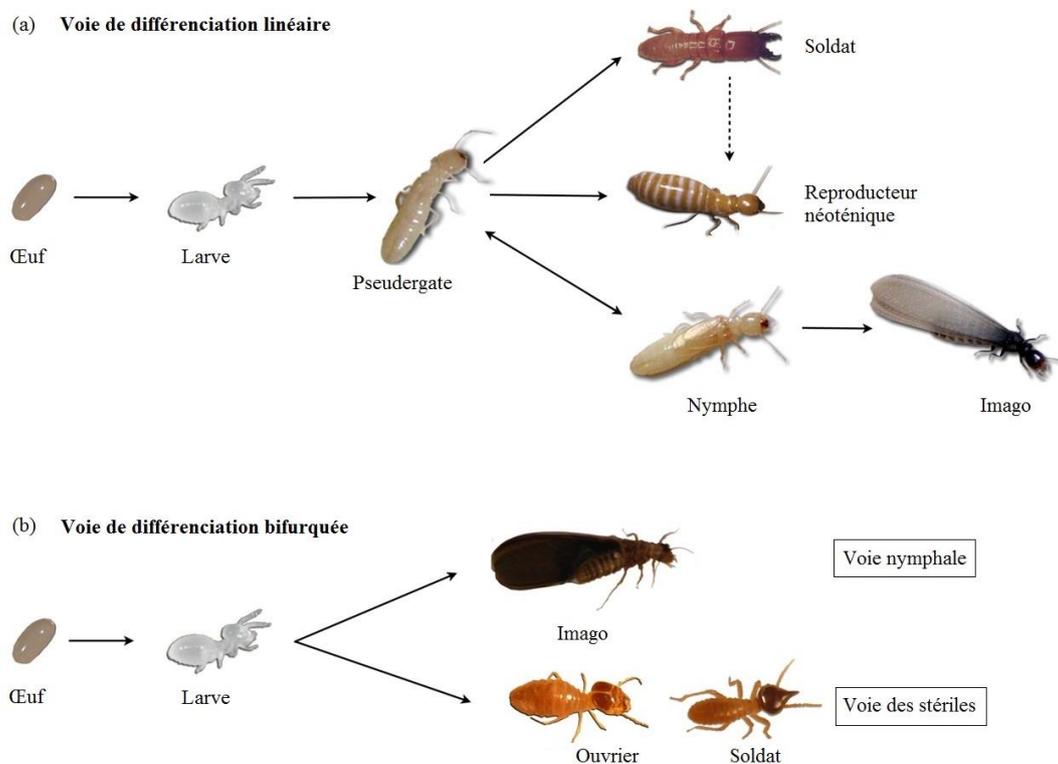


Figure 1 : Voies générales de différenciation des castes chez les non-Termitidae (a) et Termitidae (b) (d'après Hartke and Baer (2011)).

Chez beaucoup d'insectes eusociaux, la différenciation des castes fait appel à un mécanisme encore indistinct. Les castes peuvent être déterminées par des facteurs environnementaux, sans ou avec peu d'influence du génome, tels que la température, les nutriments ou encore, et essentiellement, les phéromones (Crozier and Pamilo, 1996, Lo *et al.*, 2009, Yamamoto and Matsuura, 2012). En plus des facteurs environnementaux, il existe des facteurs génétiques pouvant expliquer la complexité de l'organisation coloniale chez les insectes eusociaux (Lo *et al.*, 2009, Yamamoto and Matsuura, 2012).

Stades immatures

Les larves et les nymphes sont des individus immatures sans signes caractéristiques mis à part la présence de bourgeons alaires chez les nymphes, qui vont initier le développement des ailes. Les pseudergates ou faux-ouvriers, absents chez les Termitidae, sont des formes larvaires ayant le même rôle que les ouvriers, qui possèdent des bourgeons alaires parfois moins développés que chez les nymphes. Ces individus immatures, et parfois la caste des ouvriers, sont qualifiés d' « helpers » en anglais. Ce sont des individus non reproducteurs qui vont aider à la nutrition, à la construction ou encore aux soins des jeunes.

Caste des stériles

Les ouvriers sont issus d'une ou de plusieurs mues larvaires. Ils constituent toujours une caste bien différenciée chez les Termitidae. Ils ont des organes génitaux atrophiés, sont dépourvus d'ailes et possèdent des yeux peu développés (voire le plus souvent absents) mais parviennent à communiquer notamment grâce à la production de phéromones (Bordereau and Pasteels, 2011, Sillam-Dusses, 2011, Sillam-Dussès, 2010). Leur rôle est varié au sein de la colonie. Les ouvriers cherchent la nourriture, construisent et réparent la termitière et entretiennent les autres membres de la colonie, que ce soit les reproducteurs ou les larves.

Les soldats sont quant à eux le plus souvent issus de la différenciation de certains ouvriers. Ils sont également stériles, aptères et aveugles. Leur rôle essentiel est de protéger la colonie et ils possèdent pour cela des mécanismes de défense relativement élaborés chez certaines espèces. Ils se distinguent des autres membres de la colonie car ils sont très marqués anatomiquement et ils présentent une diversité de comportement et de morphologie selon les espèces (Grassé, 1986). De ce fait, la morphologie des soldats est très utilisée afin d'identifier les espèces.

Caste des reproducteurs

Les reproducteurs ailés, ou imagos, sont caractérisés par la présence d'ailes et d'yeux bien développés. Au cours du cycle de vie classique d'une colonie, celle-ci produit un grand nombre d'imagos qui essaieront, c'est-à-dire s'envoleront hors du nid à la recherche d'un partenaire du sexe opposé pour s'accoupler et fonder une nouvelle colonie. Cela se fait souvent en début de saison des pluies ou durant une période humide au cours de l'année (Eggleton, 2011, Hartke and Baer, 2011) (Figure 2). Une fois le couple d'imagos formé, celui-ci s'installe dans le sol ou dans du bois mort, selon les espèces, et la fondation de la nouvelle colonie débute alors. Ce couple de reproducteurs primaires (roi et reine) produit les premiers ouvriers qui assureront la construction du nid et la recherche de nourriture. Les autres castes sont ensuite produites et à maturité, de nouveaux imagos essaient pour fonder à leur tour de nouvelles colonies. Les colonies de termites sont généralement dirigées par un couple de reproducteurs monogames mais ils existent également des cas de polygamie décrits chez certaines espèces (voir 2.2.2).

Il a également été décrit un autre type de reproducteurs qui peut se développer à la sénescence, à la disparition d'au moins un des deux reproducteurs primaires ou encore en complément du couple primaire. Ces reproducteurs dits secondaires font partie de la descendance du couple primaire et il en existe deux types : les reproducteurs secondaires adultoïdes et les reproducteurs secondaires néoténiques (Myles, 1999, Thorne, 1997). Les adultoïdes dérivent d'imagos, qui restent dans la colonie et s'y reproduisent au lieu d'essaimer. Les reproducteurs secondaires néoténiques dérivent des formes stériles ou immatures ayant subi une ou plusieurs mues spécifiques qui leur permettent d'acquérir la possibilité de se reproduire (Noirot, 1956). On peut en distinguer trois types suivant leur origine (Figure 2) :

- les **ergatoïdes**, différenciés à partir d'ouvriers, se caractérisent par l'absence de bourgeons alaires et d'yeux.
- les **soldats néoténiques**, différenciés à partir des soldats, présentent les mêmes caractéristiques que les ergatoïdes. Ils ont été décrits uniquement chez le genre *Zootermopsis* (Archotermopsidae) (Myles, 1999, Thorne *et al.*, 2003).
- les **nymphoïdes**, différenciés à partir de différents stades nymphaux, se caractérisent par la présence de bourgeons alaires et d'yeux.

La production de reproducteurs néoténiques est une tendance observée principalement chez les non-Termitidae chez qui ils sont présents dans environ 61,7 % des genres, à l'exception des Serritermitidae (Myles, 1999). La production d'un grand nombre de néoténiques, qui permet aux colonies de produire une plus grande quantité d'œufs, favorise la croissance des nids et des populations sur de larges territoires et pourrait expliquer le grand nombre d'espèces xylophages invasives dans ce groupe. Cela a notamment été décrit chez les Kalotermitidae (*Cryptotermes* spp.) et les Rhinotermitidae (*Heterotermes* spp., *Reticulitermes* spp. et *Coptotermes* spp.) (Evans, 2010).

L'occurrence des reproducteurs néoténiques est beaucoup plus rare chez les Termitidae et a été décrite chez seulement 13,4% des genres. La présence de néoténiques a été décrite en particulier chez les Termitinae (e.g. *Amitermes* spp., *Termes* spp. et *Microcerotermes* spp.), les Nasutitermitinae (e.g. *Nasutitermes* spp.) et les Syntermitinae (e.g. *Embiratermes* spp. et *Silvestritermes* spp., voir Chapitre 1 et 2) (Grassé, 1982, Noirot, 1956). Les Termitidae montrent plutôt une production importante d'imagos au sein d'une colonie stable et pérenne avec une reine très féconde qui vit longtemps et produit un grand nombre d'individus. Les adultoïdes sont les principaux reproducteurs secondaires qui ont été décrits chez les Termitidae notamment chez les Macrotermitinae, Apicotermitinae, Termitinae et Nasutitermitinae (Evans, 2010, Myles, 1999).

L'organisation sociale particulièrement complexe des termites est avancée comme une des raisons du succès écologique de ce groupe. Cependant, la famille des Termitidae, de loin la plus diversifiée, reste très peu étudiée par rapport aux autres familles, notamment en ce qui concerne l'étude de la stratégie reproductive.

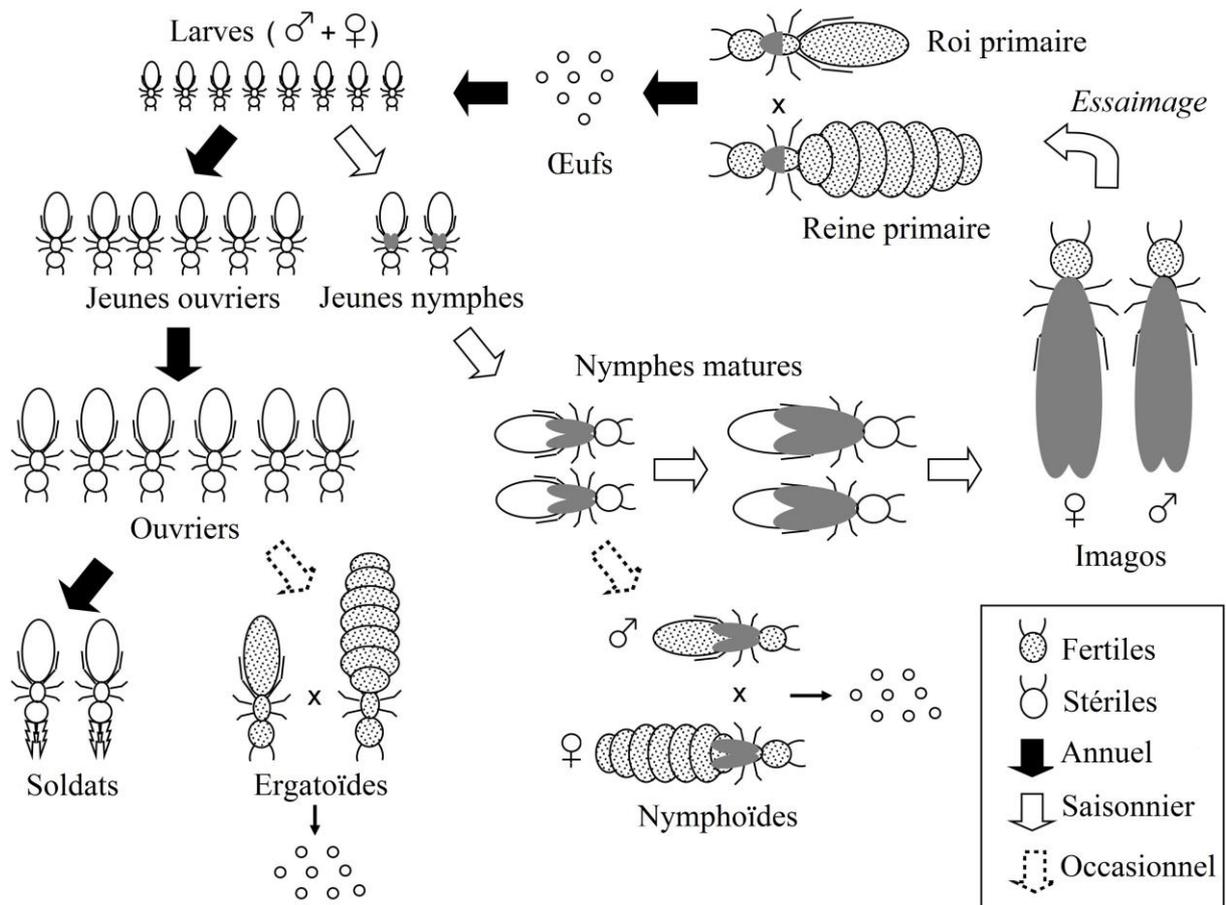


Figure 2 : Cycle de vie général des termites possédant une caste ouvrière (d'après Lo *et al.* (2009)). Les soldats néoténiques, uniquement observés dans le genre *Zootermopsis*, ne sont pas représentés ici.

2. Stratégie reproductive chez les termites

L'étude des systèmes de reproduction chez les insectes sociaux consiste à définir le nombre de reproducteurs (mâles et femelles) dans la colonie, leur apparentement et leur contribution génétique à la descendance (Ross, 2001). La structure coloniale chez les termites reste moins étudiée que chez d'autres groupes d'insectes sociaux, en particulier les Hyménoptères, mais elle est la cible d'un intérêt croissant depuis quelques années. La majorité des études se concentre principalement sur la famille des Rhinotermitidae, qui est le groupe de termites le plus largement distribué au sein des régions tropicales, subtropicales et tempérées et dont la biomasse rivalise avec beaucoup de termites tropicaux (Vargo and Husseneder, 2009, Vargo and Husseneder, 2011). L'intérêt porté à ce groupe, notamment aux genres *Reticulitermes* et *Coptotermes*, vient également du fait qu'il s'attaque aux infrastructures humaines et représente un impact économique important. Afin de bien comprendre la structure génétique coloniale et populationnelle, il est nécessaire d'avoir accès

aux individus, impliqués ou non dans la reproduction, affiliés à des colonies bien identifiées (Pamilo *et al.*, 1997, Thorne *et al.*, 1999). Chez les termites souterrains par exemple, les limites de la colonie sont souvent difficiles à définir à cause de nids dissimulés ou sans frontières bien distinctes (Thorne *et al.*, 1999). En revanche, chez les Termitidae, beaucoup d'espèces construisent de larges nids avec des colonies bien identifiables sur le terrain (Grassé, 1984) rendant l'analyse de la structure reproductive plus accessible.

2.1. Outils moléculaires

L'utilisation de marqueurs moléculaires est prépondérante dans l'étude des stratégies reproductives chez les insectes sociaux (Ross, 2001). Parmi les différents types de marqueurs classiquement utilisés, on retrouve les allozymes, les marqueurs mitochondriaux, les empreintes génétiques et les microsatellites. Les marqueurs co-dominants (i.e. qui discriminent homozygotes et hétérozygotes), tels que les allozymes et les marqueurs microsatellites, sont particulièrement utilisés pour étudier les structures reproductives car ils permettent de calculer les coefficients de consanguinité reflétant les patrons de dispersion et d'accouplement entre les reproducteurs (Bulmer and Traniello, 2002, Thorne *et al.*, 1999). Les allozymes, utilisés dans les premières études de structure génétique chez les termites, ont été exploités afin d'obtenir des informations sur l'apparentement, les variations de la structure reproductive des colonies chez quelques genres de termites tels que les *Nasutitermes* (Termitidae), les *Reticulitermes* (Rhinotermitidae) ou les *Incisitermes* (Kalotermitidae) (Bulmer and Traniello, 2002, Bulmer *et al.*, 2001, Clément, 1981, Luykx, 1993, Thompson and Hebert, 1998a, Thompson and Hebert, 1998b). Cependant, ces marqueurs sont peu variables ce qui limite leur capacité à différencier les colonies et ainsi de prodiguer des détails sur leur structure génétique (Vargo and Husseneder, 2011). De plus, l'utilisation seule de ces marqueurs ne permet pas de distinguer les cas de polygamie impliquant des reproducteurs primaires ou secondaires et c'est pourquoi ils sont souvent associés avec d'autres types de marqueurs (Thompson and Hebert, 1998b). Les marqueurs mitochondriaux (cytochrome oxidase I, II et III, 16S ADNr, NADH dehydrogenase-1 et région riche en AT, par exemple) ont souvent été utilisés pour estimer la diversité génétique d'une espèce et vont permettre notamment d'identifier les différentes lignées maternelles présentes dans une population. Ces marqueurs mitochondriaux sont souvent associés à des marqueurs nucléaires, allozymes ou microsatellites en particulier, pour étudier la structure reproductive des notamment chez *Nasutitermes*, *Reticulitermes*, *Cubitermes* et *Labiotermes* (Bankhead-Dronnet *et al.*, 2015,

Bulmer *et al.*, 2001, DeHeer and Kamble, 2008, Dupont *et al.*, 2009, Perdereau *et al.*, 2013, Thompson and Hebert, 1998b, Vargo, 2003b, Vargo and Carlson, 2006). Les empreintes génétiques permettent de différencier de manière précise les colonies et de mesurer le degré de parenté entre les membres de la colonie. Ces marqueurs ont notamment été utilisés chez *Coptotermes* (Rhinotermitidae), *Macrotermes* (Termitidae) et *Schedorhinotermes* (Rhinotermitidae) (Hacker *et al.*, 2005, Husseneder and Grace, 2001b, Husseneder and Grace, 2001a, Husseneder *et al.*, 2002, Kaib *et al.*, 1996). De nouveaux types de marqueurs moléculaires commencent à émerger grâce aux nouvelles technologies de séquençage haut débit (NGS) qui permettent de réaliser des analyses génomiques et transcriptomiques. Chez les termites, ce type d'analyse est encore peu courant à ce jour en particulier pour l'étude des systèmes de reproduction (Husseneder *et al.*, 2012).

Les marqueurs moléculaires les plus utilisés à ce jour dans l'étude de la structure reproductive chez les insectes sociaux sont les microsatellites. Les marqueurs microsatellites, ou STRs (Short Tandem Repeats), sont des régions d'ADN hautement polymorphes constituées de répétitions de nucléotides. Le polymorphisme de ces marqueurs s'exprime par la variabilité du nombre de répétitions suivant les allèles, qui vont ainsi différer par leur taille. Les marqueurs microsatellites présentent plusieurs avantages : leur co-dominance, leur présence en grand nombre dans le génome, leur variabilité (taux de mutation de 10^{-2} à 10^{-6} événements par locus par génération) et des allèles hérités de manière mendélienne et stable dans le cas d'une reproduction sexuée. La petite taille des loci microsatellites permet d'obtenir des résultats à partir d'une faible quantité d'ADN, voire à partir de matériel génétique dégradé. Cependant, ce sont des marqueurs spécifiques qui nécessitent d'être développés pour chaque espèce ou groupe d'espèces proches. Les caractéristiques de ces marqueurs en font des outils très informatifs dans la description de la structure coloniale, des systèmes de reproduction, des niveaux de consanguinité et de parenté entre individus et pour assigner les individus aux colonies (Husseneder *et al.*, 2002, Husseneder *et al.*, 2003). Chez les termites, les marqueurs microsatellites ont été développés chez 21 espèces appartenant à six familles différentes (Tableau 1).

Tableau 1 : Liste exhaustive des marqueurs microsatellites développés chez les termites.

Famille	Espèce	Nombre de loci microsatellites	Références
Mastotermitidae	<i>Mastotermes darwiniensis</i>	10	(Goodisman <i>et al.</i> , 2001)
Hodotermitidae	<i>Microhodotermes viator</i>	7	(Muna and O'Ryan, 2016)
Archotermopsidae	<i>Zootermopsis nevadensis</i>	12	(Aldrich and Kambhampati, 2004)
Kalotermitidae	<i>Incisitermes minor</i>	10	(Indrayani <i>et al.</i> , 2006)
		15	(Booth <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Cryptotermes secundus</i>	6	(Fuchs <i>et al.</i> , 2003)
Rhinotermitidae	<i>Neotermes koshunensis</i>	9	(Kobayashi and Miyaguni, 2016)
	<i>Reticulitermes flavipes</i>	9	(Vargo, 2000)
		11	(Dronnet <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Reticulitermes speratus</i>	7	(Hayashi <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Reticulitermes hesperus</i>	3	(Copren, 2007)
	<i>Coptotermes formosanus</i>	12	(Vargo and Henderson, 2000)
		17	(Li, 2014)
Termitidae	<i>Coptotermes lacteus</i>	6	(Thompson <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Cubitermes subarquatus</i>	7	(Harry <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Macrotermes gilvus</i>	11	(Singham <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Macrotermes michaelsoni</i>	4	(Kaib <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Odontotermes formosanus</i>	9	(Husseneder <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Odontotermes srinakariniensis</i>	29	(Cheng <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Labiotermes labralis</i>	6	(Harry <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Silvestritermes euamignathus</i>	12	(Haifig <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Nasutitermes corniger</i>	8	(Atkinson <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Amitermes meridionalis</i>	10	(Schmidt <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Cavitermes tuberosus</i>	17	(Fournier <i>et al.</i> , 2016)

2.2. Structure reproductive des colonies

2.2.1. Classification des colonies en structure familiale

Chez les termites, il est souvent difficile d'avoir accès aux chambres royales contenant les reproducteurs. Elles sont souvent situées au centre du nid, ce qui les rend difficile à localiser en particulier chez les espèces construisant des nids de grande taille (e.g. *Amitermes meridionalis* et *Macrotermes natalensis*) ou encore chez les espèces qui construisent leur nid dans le sol ou le bois (e.g. *Reticulitermes* spp.) (Grassé, 1984). De ce fait, la structure reproductive des colonies est souvent inférée à partir des génotypes des ouvriers ou des soldats, beaucoup plus accessibles dans la colonie, pour identifier le nombre de reproducteurs et leur degré d'appartenance (Vargo and Husseneder, 2011). Ces individus doivent être génotypés sur un grand nombre de loci afin de garantir la robustesse des analyses génétiques. L'analyse des génotypes à des locus microsatellites permet de classer les colonies en trois familles selon le nombre de reproducteurs et leur lien de parenté : familles simples, familles étendues et

familles mixées (Bulmer *et al.*, 2001, Deheer and Vargo, 2004, Thorne *et al.*, 1999, Vargo, 2003b).

- Une colonie est une **famille simple** si elle est menée par un couple de reproducteurs. Ce couple monogame, apparenté ou non apparenté, peut être constitué soit de deux reproducteurs primaires (à l'origine de la colonie), de deux reproducteurs secondaires (ergatoïdes ou nymphoïdes) ou, lorsque seulement un des deux primaires disparaît, d'un primaire et d'un secondaire. La distribution des allèles parentaux dans les génotypes des stériles issus d'une famille simple suit une répartition mendélienne avec un maximum de quatre allèles et de quatre génotypes à chacun des locus. Le taux de consanguinité attendu dans cette structure familiale est de 0 dans le cas d'un couple de reproducteurs non apparentés.
- Une colonie est une **famille étendue** si elle est menée par plus de deux reproducteurs secondaires apparentés. Les génotypes des stériles présentent un maximum de quatre allèles, avec une distribution non mendélienne avec plus de quatre génotypes, à au moins un locus. Du fait de l'apparentement entre les reproducteurs secondaires, le taux de consanguinité est plus élevé que chez les familles simples.
- Une colonie est une **famille mixée** si elle est menée par plus de deux reproducteurs non apparentés. Le nombre d'allèles et de génotypes est supérieur à quatre à au moins un locus. Chez les termites, les familles mixées peuvent être issues de pléométrie, de fusion coloniale ou en encore d'adoption de reproducteurs non apparentés.

Des simulations pour ces différentes structures familiales ont été réalisées pour les termites souterrains, dans lesquelles apparaissent les F-statistiques (voir Matériel et Méthodes pour le détail des calculs) qui permettent d'estimer la consanguinité à différents niveaux hiérarchiques (Wright, 1965) et les valeurs d'apparentement entre individus stériles (Bulmer *et al.*, 2001, Thorne *et al.*, 1999). La comparaison des données expérimentales avec les données simulées va permettre de vérifier si la situation observée peut être assignée statistiquement à un des modèles familiaux décrits, puis ensuite d'apporter plus d'informations sur la structure reproductrice comme par exemple, détecter si les reproducteurs

d'une famille simple sont apparentés ou estimer le nombre de reproducteurs dans les familles étendues et mixées.

2.2.2. Nombre et apparentement des reproducteurs

2.2.2.1. Familles simples

Chez les termites, les colonies sont le plus souvent fondées à partir d'un couple de reproducteurs (Nutting, 1969). La structure coloniale de type famille simple avec un couple monogame à la tête de la colonie est en effet la plus fréquemment décrite chez les termites. Cela a notamment été montré chez les Rhinotermitidae dans le genre *Reticulitermes* comme par exemple sur des colonies de Caroline du Sud de *R. flavipes*, *R. hageni* et *R. virginicus* à partir de marqueurs microsatellites (avec respectivement 72%, 85% et 100% de familles simples) (Vargo and Carlson, 2006). Dans le genre *Coptotermes*, *C. lacteus* montre un système de reproduction stable avec des colonies menées par un seul couple de reproducteurs apparentés (Thompson *et al.*, 2007) et les populations japonaises de *C. formosanus* affichent près de 90% de familles simples dont la plupart sont menées par un couple de reproducteurs apparentés (Vargo *et al.*, 2003).

Chez les Termitidae, l'étude de dix-sept colonies de *Labiotermes labralis* a montré à l'aide de marqueurs microsatellites et d'ADN mitochondrial que toutes les colonies avaient des génotypes qui suivaient une distribution mendélienne en accord avec une organisation monogame (Dupont *et al.*, 2009). Chez *Nasutitermes nigriceps*, l'analyse de l'ADN mitochondrial et des fréquences génotypiques obtenues grâce à des marqueurs allozymes a montré que la très grande majorité des colonies avait été fondées par un couple de reproducteurs (Thompson and Hebert, 1998a, Thompson and Hebert, 1998b).

2.2.2.2. Familles étendues

La polygamie des familles étendues, qui se traduit souvent par de la polygynie chez les termites, peut émerger lorsque des reproducteurs secondaires remplacent ou s'ajoutent aux reproducteurs primaires à la tête des colonies. La présence, parfois en grand nombre, de ces reproducteurs apparentés, puisqu'ils sont issus de la descendance du couple primaire, a des conséquences sur la consanguinité et l'apparentement chez les castes stériles. Le taux de consanguinité varie ainsi en fonction du nombre de reproducteurs secondaires qui participent

à la reproduction dans la colonie mais aussi en fonction du nombre de générations de reproducteurs.

Ce type de structure familiale a surtout été décrit chez les non-Termitidae, en particulier chez les Mastotermitidae, les Kalotermitidae, les Archotermopsidae et les Rhinotermitidae (Myles, 1999, Thorne *et al.*, 1999, Vargo and Husseneder, 2011). L'analyse des génotypes des ouvriers pour des marqueurs microsatellites chez *Mastotermes darwiniensis* (Mastotermitidae) a montré que 47% des colonies étaient menées par de multiples reproducteurs secondaires apparentés (Goodisman and Crozier, 2002). Une étude comparative de deux sous-espèces de *Zootermopsis nevadensis* (Archotermopsidae), *Z. nevadensis nevadensis* et *Z. nevadensis nuttingi*, a révélé une prédominance de la structure familiale de type étendue (61%) (Aldrich and Kambhampati, 2007). Les deux sous-espèces présentent cependant un nombre de reproducteurs et un taux de consanguinité variables avec des valeurs de F_{IC} (-0,33 pour *Z. n. nevadensis* et -0,12 pour *Z. n. nuttingi*) et de F_{IT} (0,02 pour *Z. n. nevadensis* et 0,24 *Z. n. nuttingi*) significativement différentes. Les F_{IC} négatifs indiquent cependant que le nombre de reproducteurs néoténiques reste faible. Les familles étendues identifiées dans le genre *Reticulitermes* présentent un nombre de reproducteurs néoténiques très variable allant jusqu'à six chez certaines populations de *R. hageni* et *R. virginicus* (Deheer and Vargo, 2004, Parman and Vargo, 2008, Vargo, 2003b, Vargo, 2003a, Vargo and Carlson, 2006, Vargo *et al.*, 2006), jusqu'à dix chez les populations de *R. grassei* (Bulmer *et al.*, 2001, DeHeer *et al.*, 2005) et jusqu'à une centaine dans des populations de *R. flavipes* (Perdereau *et al.*, 2015). Une autre espèce introduite en Europe, *R. urbis*, présente un système de reproduction presque similaire avec uniquement des colonies de type famille étendue menées par des reproducteurs primaires et quelques reproducteurs secondaires (Leniaud *et al.*, 2010, Perdereau *et al.*, 2013). Récemment, la structure reproductive de *R. chinensis* a été décrite à partir de trois populations chinoises avec 74% de colonies étendues menées par un maximum de dix néoténiques (Huang *et al.*, 2013).

Chez les Termitidae, peu d'espèces montrent des signes de polygamie avec des reproducteurs apparentés (Vargo and Husseneder, 2011). Chez *Nasutitermes corniger*, l'analyse du polymorphisme de conformation double-brin (DSPC) de l'ADN mitochondrial a montré qu'un grand nombre de reproducteurs, présents dans 16% des colonies étudiées, partageaient le même haplotype (Atkinson and Adams, 1997). Ces reproducteurs pourraient donc être secondaires et seraient ainsi issus d'une même mère ou d'un groupe de reines primaires apparentées, sachant que chez cette espèce il est difficile de distinguer

morphologiquement les reproducteurs primaires et secondaires (Atkinson and Adams, 1997). Chez *N. nigriceps*, 5% des colonies se sont avérées être polygames avec un haplotype mitochondrial partagé entre les multiples reproducteurs (Thompson and Hebert, 1998a, Thompson and Hebert, 1998b). La présence de reproducteurs néoténiques a aussi été suspectée chez *Amitermes meridionalis*, chez qui l'analyse des génotypes de la descendance à des loci microsatellites a montré une répartition non conforme à la présence de deux reproducteurs non apparentés et un niveau de consanguinité élevé dans les colonies (Schmidt *et al.*, 2013).

2.2.2.3. Familles mixées

La structure familiale de type mixée a été décrite chez une dizaine d'espèces seulement. En effet, ce système de reproduction est très rarement prédominant par rapport aux systèmes décrits précédemment (Vargo and Husseneder, 2011). La polygamie rencontrée dans les familles mixées peut résulter (i) de pléomérose, c'est-à-dire de l'association de plusieurs imagos pendant l'essaimage qui coopèrent dans l'établissement de la colonie et deviennent des reproducteurs primaires multiples, (ii) de fusion coloniale, fusion de deux colonies pour n'en former qu'une seule qui est ainsi constituée de la descendance de plusieurs couples de reproducteurs provenant des colonies initiales, ou (iii) d'adoption de reproducteurs non apparentés au cours de la fondation de la colonie. Ce dernier cas de figure n'a encore jamais été démontré chez les termites. Ainsi, dans le cas où les colonies sont menées par de multiples reproducteurs non apparentés, le niveau de parenté des castes stériles sera faible. C'est ce que l'on peut constater à travers les simulations pour les familles mixées avec des valeurs d'apparentement plus faibles dans les cas de pléomérose que dans les cas de reproduction secondaire (Bulmer *et al.*, 2001, Thorne *et al.*, 1999). En résumé, la pléomérose conduit à l'obtention de valeurs faibles de F_{IT} (colonies menées par des reproducteurs non apparentés), des valeurs négatives de F_{IC} (peu de reproducteurs) et à un apparentement des stériles inférieur à 0,5. Dans les cas de fusion coloniale, les valeurs de F_{IT} et F_{IC} sont globalement plus élevées en fonction du nombre de colonies impliquées dans la fusion.

Chez les *Reticulitermes*, les colonies de type famille mixée sont peu communes et n'ont été trouvées que chez quatre espèces, *R. flavipes* (DeHeer and Kamble, 2008, DeHeer and Vargo, 2004, Parman and Vargo, 2008, Perdereau *et al.*, 2015, Perdereau *et al.*, 2010, Vargo *et al.*, 2006), *R. grassei* (Nobre *et al.*, 2008), *R. speratus* (Hayashi *et al.*, 2005) et *R. chinensis* (Huang *et al.*, 2013). Dans les cas où l'origine des familles mixées a pu être clairement

identifiée, seuls des cas de fusion coloniale ont été décrits. Chez *R. flavipes*, le plus important pourcentage de colonies mixées a été relevé dans une population introduite en France avec 31% des colonies identifiées comme possédant de nombreux reproducteurs non apparentés (Perdereau *et al.*, 2010). Chez *R. speratus*, l'analyse de la structure génétique coloniale à partir de marqueurs microsatellites et de l'ADN mitochondrial a révélé que 46,7% des colonies possédaient des reproducteurs multiples issus de deux lignées maternelles (Hayashi *et al.*, 2005). Le taux de colonies polygames de type famille mixée recensé chez cette espèce reste à ce jour le plus élevé au sein des Rhinotermitidae.

Zootermopsis nevandensis, présente également un taux relativement conséquent de familles mixées chez la sous-espèce *Z. n. nuttingi* (33%) (Aldrich and Kambhampati, 2007). Récemment, Luchetti *et al.* (2013a) ont décrit la structure reproductive de *Kaloterme flavicollis* (Kalotermitidae) à l'aide de marqueurs microsatellites et mitochondriaux. Les familles mixées issues de fusion coloniale décrites jusqu'à présent n'impliquaient pas plus de deux couples de reproducteurs primaires et deux lignées maternelles suggérant une fusion entre seulement deux colonies. L'analyse génétique de la descendance issue de onze colonies de *K. flavicollis* a montré que 82% d'entre elles impliquaient au moins trois reproducteurs primaires ce qui représente le pourcentage de familles mixées le plus élevé décrit jusqu'à maintenant chez les termites. Les valeurs de F-statistiques ($F_{IT} = 0,39$ et $F_{IC} = 0,28$) et d'apparentement ($r = 0,22$) coïncident avec les valeurs attendues dans le cas d'une fusion coloniale. De plus, les marqueurs mitochondriaux ont mis en évidence un nombre d'haplotypes par colonie très élevé (jusqu'à neuf) suggérant que la descendance est bien issue de plusieurs reines.

Chez les Termitidae, seules quelques espèces ont été décrites comme polygames avec une structure familiale de type mixée (Vargo and Husseneder, 2011). Chez *Macrotermes michaelseni*, il a été montré que la polygamie était un système de reproduction courant, et en particulier la polygynie (Darlington, 1985). Une étude réalisée à partir d'empreintes génétiques et de marqueurs microsatellites a révélé que sur l'ensemble des colonies de *M. michaelseni*, les rois et les reines avaient une valeur d'apparentement proche de zéro et que les reines des colonies polygynes n'étaient pas non plus apparentées (Hacker *et al.*, 2005). L'ensemble de ces résultats converge vers l'hypothèse d'une polygynie résultant de pléométrie avec une coexistence de plusieurs reines non apparentées. De plus, l'analyse des génotypes des stériles a montré que toutes les reines participaient à la production de la descendance. La coexistence de plusieurs reines non apparentées au sein d'une même colonie

va avoir pour avantage de produire des ouvriers génétiquement diversifiés menant à une division du travail plus efficace, une meilleure croissance de la colonie ainsi qu'une résistance accrue aux maladies et aux parasites (Hacker *et al.*, 2005). Cependant, des conflits peuvent également survenir entre ces reines pouvant parfois mener à des mutilations. Il a également été montré que le taux de colonies polygynes dans une population de *M. michaelseni* pouvait varier en fonction des conditions environnementales et en particulier les précipitations (Brandl *et al.*, 2004). Des familles mixées ont également été décrites chez *N. corniger*. En effet, l'analyse de marqueurs DSCP a mis en évidence la coexistence de deux reines non apparentées avec des haplotypes différents chez cette espèce (Atkinson and Adams, 1997). L'observation de deux reines de même âge à la tête de ces colonies serait en faveur d'une fondation par pléométrise. Récemment, une étude menée à partir de marqueurs microsatellites et de l'ADN mitochondrial chez *Silvestritermes euamignathus* a mis en évidence une colonie de type mixée avec des nymphoïdes issues d'au moins quatre couples de reproducteurs appartenant à deux lignées maternelles différentes (Haifig *et al.*, 2016). Plusieurs explications possibles ont été évoquées : cette colonie a pu être fondée par pléométrise à partir de deux imagos femelles qui se sont accouplées avec plusieurs mâles (cas de polyandrie) ou à partir de plusieurs couples monogames d'imagos non apparentés ou encore par fusion de plusieurs colonies. C'est le seul cas décrit de reproducteurs secondaires non apparentés présents dans une colonie chez les Termitidae. Cependant, cette organisation particulière n'a été trouvée que dans une seule colonie sur les cinq échantillonnées pour cette étude et donc ne peut pas être généralisée en tant que stratégie reproductive adoptée par cette espèce.

2.2.3. Plasticité du système de reproduction

D'après les différents cas cités précédemment, on peut noter la grande plasticité du système de reproduction se manifestant entre les espèces de termites mais aussi entre les populations d'une même espèce. Parmi les espèces dont la structure reproductive a été la plus étudiée, *R. flavipes* présente certainement un des plus hauts niveaux de variabilité avec à la fois des familles simples, étendues et mixées. Des études sur des populations venant d'Amérique du Nord ont montré que les colonies étaient composées d'environ 75% de familles simples menées par un couple de reproducteurs non apparentés, environ 25% de familles étendues avec des reproducteurs secondaires apparentés peu nombreux et seulement 1 à 2% de familles mixées issues de la fusion entre deux colonies (Deheer and Vargo, 2004,

Parman and Vargo, 2008, Vargo, 2003b, Vargo, 2003a, Vargo and Carlson, 2006). Des analyses, à partir de marqueurs mitochondriaux et microsattellites, ont révélé que les populations européennes ont été introduites à partir d'Amérique de Nord et que la grande majorité des populations natives était constituée de familles simples tandis que toutes les populations introduites présentaient des familles étendues avec de nombreux reproducteurs néoténiques apparentés ainsi que quelques colonies fusionnées (Perdereau *et al.*, 2015, Perdereau *et al.*, 2010, Perdereau *et al.*, 2013). La production de nombreux reproducteurs néoténiques dans les populations introduites est à mettre en lien avec le caractère invasif de cette espèce car cette stratégie reproductive permet un développement et une propagation rapides des colonies (Myles, 1999). Des études récentes ont également montré que la structure reproductive de certaines espèces pouvait être influencée par les conditions environnementales (Ab Majid *et al.*, 2014, Vargo *et al.*, 2013). Ainsi, l'étude menée par Vargo *et al.* (2013) sur plusieurs populations de *R. flavipes* et *R. grassei* distribuées sur de vastes zones géographiques a montré que la structure reproductive des colonies était sensible aux conditions environnementales locales variant le long des gradients latitudinaux. Les auteurs ont montré une proportion de familles étendues qui évoluait de manière croissante avec la latitude, en particulier chez *R. flavipes*. Parmi les différents facteurs qui évoluent en fonction de la latitude, la température et l'humidité des sols ont été identifiés comme ayant un impact sur le niveau de consanguinité des colonies. Celui-ci s'est avéré être plus élevé chez les deux espèces en cas de faible température et d'environnement humide. Des différences de réponse entre *R. flavipes* et *R. grassei* ont cependant été observées en fonction de la saisonnalité avec une consanguinité associée aux variations de températures saisonnières chez *R. flavipes* et à la disponibilité en bois et à la composition du sol chez *R. grassei*.

La plasticité de la structure reproductive a été beaucoup moins étudiée dans le groupe des Termitidae mais certaines espèces montrent cependant une variabilité dans leur système reproductif. *Macrotermes michaelseni* présente à la fois des colonies monogames et des colonies menées par plusieurs reines secondaires non apparentées (Brandl *et al.*, 2004, Darlington, 1985, Hacker *et al.*, 2005). *Nasutitermes corniger* affiche des familles simples avec un couple de reproducteurs non apparentés, des colonies menées par plusieurs rois et reines secondaires issus d'une même lignée maternelle et enfin des colonies avec des reines non apparentées appartenant à deux lignées différentes (Atkinson and Adams, 1997, Atkinson *et al.*, 2008, Thorne, 1984). Il a été prédit pour cette espèce une occurrence plus forte de la

polygynie dans les habitats où la probabilité de survie est plus faible et où la croissance rapide de la colonie est avantageuse (Thorne, 1982).

2.3. Dispersion et flux de gènes

Plusieurs mécanismes peuvent déterminer l'apparementement entre les reproducteurs primaires (Vargo and Husseneder, 2011) : la capacité de dispersion (longues/courtes distances), un biais de sex-ratio dans la production des ailés (production préférentielle de mâles ou femelles, essaimage asynchrone entre mâles et femelles) et/ou un accouplement préférentiel entre individus apparentés ou non.

La distance de dispersion est un facteur important dans la mesure où elle influence la probabilité de rencontre des ailés pendant l'essaimage et détermine le niveau de consanguinité au sein des colonies. La dispersion des ailés sur une grande distance favorise la rencontre entre individus non apparentés qui fondent ensuite des colonies peu consanguines. Au contraire, les espèces qui dispersent sur de courtes distances, que ce soit par un essaimage réduit géographiquement ou par bourgeonnement (division de colonies natales en plusieurs colonies secondaires menées par des reproducteurs néoténiques), ont plus de chances de fonder de nouvelles colonies menées par des reproducteurs apparentés, potentiellement issus du même nid, avec un niveau de consanguinité plus important. Il existe très peu d'études décrivant la capacité de dispersion active des imagos mais il est admis que la distance de vol est relativement réduite chez les termites, en particulier chez les espèces humivores (Nutting, 1969) et que différents éléments peuvent influencer sur la dispersion d'une espèce, comme le transport humain ou encore le vent. De plus, les analyses génétiques de la structuration des populations fournissent des informations sur la dispersion des individus et les flux de gènes. Par exemple, une conséquence directe de la dispersion limitée est l'isolement génétique par la distance (IBD). L'IBD se traduit par des paires de populations proches géographiquement, plus proches génétiquement entre elles, qu'elles ne le sont des populations plus éloignées géographiquement. À une plus large échelle, le degré de différenciation génétique et donc les flux de gènes entre populations, se mesurent par la valeur du coefficient F_{ST} qui selon la classification de (Wright, 1978), peut indiquer une différenciation génétique faible ($0 < F_{ST} < 0,5$), modérée ($0,05 < F_{ST} < 0,15$), forte ($0,15 < F_{ST} < 0,25$) ou très forte ($F_{ST} > 0,25$) entre les populations.

Chez *Mastotermes darwiniensis*, seul représentant de la famille des Mastotermitidae, l'analyse de marqueurs microsatellites a montré que les sites séparés de 10 à 100 km étaient très fortement différenciés génétiquement ($0,42 < F_{ST} < 0,62$) (Goodisman and Crozier, 2002, Wright, 1978). Ces résultats traduisent un flux génique limité sur des distances relativement faibles. Pour tenter d'expliquer ce niveau de différenciation, les auteurs de cette étude avancent deux raisons possibles. La première serait que les imagos essaient sur de courtes distances. Cependant, il a été montré que les ailés de cette espèce possèdent une forte capacité de vol (Nalepa *et al.*, 2001). L'autre explication serait que la dispersion des colonies se fait principalement par bourgeonnement et que l'essaimage des imagos sur de grandes distances ne représenterait qu'une faible fraction des nouvelles colonies formées.

Au sein des Archotermopsidae, une forte différenciation génétique entre populations séparées de 40 à 150 km a également été révélée chez *Zootermopsis angusticollis* à partir de marqueurs microsatellites ($F_{ST} = 0.269 - 0.490$) (Booth *et al.*, 2012). S'il a été montré que les flux de gènes étaient limités à cette échelle spatiale, aucun isolement par la distance n'a été observé. Un vol nuptial sur de courtes distances ou une reproduction par bourgeonnement ont été évoqués comme hypothèses pour expliquer cette différenciation. Cependant, les sites étudiés se trouvent au sein d'un milieu fragmenté par le développement urbain et la présence de barrières géographiques impactent certainement aussi la dispersion de *Z. angusticollis*. Un cas particulier a été décrit chez *Z. nevadensis nuttingi*, chez qui les ailés s'apparient moins avec des partenaires apparentés (Shellman-Reeve, 2001). Ce mécanisme qui a pour conséquence d'abaisser le taux de consanguinité dans les colonies en limitant la formation de couples primaires apparentés, a seulement été décrit chez cette espèce.

Il est couramment admis que chez les Rhinotermitidae, la dispersion des ailés sur de courtes distances et le bourgeonnement font partie de la stratégie de dispersion (Vargo and Husseneder, 2011). Chez beaucoup d'espèces, le bourgeonnement est particulièrement favorisé par la présence de nombreux reproducteurs secondaires apparentés (Myles, 1999, Thorne *et al.*, 1999). Ce mode de reproduction permet aux colonies de se développer rapidement, favorisant ainsi la production d'un grand nombre de futurs reproducteurs ailés qui pourront disséminer les gènes de la colonie. Ces deux modalités de dispersion devraient conduire à des populations avec une viscosité importante, conduisant à un niveau de structuration plus élevé sur de petites échelles spatiales (Vargo and Husseneder, 2011). Chez *R. flavipes* (anciennement *R. santonensis*), Dronnet *et al.* (2005) ont montré à partir de marqueurs microsatellites, un isolement par la distance à l'intérieur de deux grandes colonies

de deux populations, une urbaine et une naturelle, laissant supposer un phénomène de bourgeonnement. L'absence de différenciation entre des colonies éloignées et des F_{ST} statistiquement globalement plus faible au sein de la population urbaine suggèrent que l'homme participe activement à la dispersion de l'espèce dans cette région française. De plus, un niveau de différenciation génétique modéré a été observé entre les deux populations ($F_{ST} = 0,1$) s'expliquant par la grande distance qui sépare ces deux populations (~ 500 km). Toujours chez *R. flavipes*, l'analyse de marqueurs microsatellites et de l'ADN mitochondrial de colonies présentes sur trois sites forestiers non perturbés de Caroline du Nord a montré une absence d'isolement par la distance entre 1 et 20 km sur chacun des sites ainsi qu'une faible différenciation génétique entre 1 et 38 km ($F_{ST} = 0,06$) au sein de chaque site et entre les sites (Vargo, 2003b). L'étude de Perdereau *et al.* (Perdereau *et al.*, 2015, Vargo, 2003b) menée sur des populations natives et introduites de *R. flavipes* témoigne également d'une absence d'isolement par la distance dans chacune des populations, entre des colonies distantes de quelques mètres à plusieurs centaines de kilomètres. Toujours au sein des *Reticulitermes*, l'analyse de marqueurs microsatellites chez quatre populations chinoises de *R. chinensis* ne montre pas d'isolement génétique à l'intérieur de trois populations et une différenciation génétique modérée entre elles ($F_{ST} = 0,05 - 0,12$) (~ 3 km). La quatrième population étudiée montre un isolement par la distance et une forte différenciation génétique entre cette population et les trois autres ($F_{ST} = 0,17-0,20$) qui pourrait s'expliquer par la présence d'une barrière géographique (Huang *et al.*, 2013). Chez *R. grassei*, des sous-populations ont pu être définies génétiquement par l'analyse de marqueurs microsatellites et l'absence d'isolement génétique par la distance à l'intérieur de ces sous-populations a été démontrée. Les auteurs concluent également une dispersion sur des distances importantes (jusqu'à 480 km), impliquant là aussi un impact anthropique dans la dispersion (Bankhead-Dronnet *et al.*, 2015). Une précédente étude sur trois populations de *R. grassei* avait également montré une absence d'isolement génétique par la distance avec une différenciation modérée entre populations ($F_{ST} = 0,1$) (DeHeer *et al.*, 2005).

Un autre Rhinotermitidae, *Coptotermes lacteus* montre des différenciations génétiques faibles mais significatives entre deux populations distantes de 150 km ($F_{ST} = 0,04$) mais non significatives à l'intérieur de chaque population ($F_{ST} = 0,01$), attestant d'une dispersion des gènes entre 3 et 11 km. De plus aucune viscosité à cette échelle spatiale n'a pu être démontrée. L'analyse de microsatellites des populations de *C. formosanus* de la Nouvelle-Orléans a montré une dispersion possible des ailés jusqu'à 1 km (Husseneder *et al.*, 2006). D'autre part,

une étude de la structure génétique à large échelle de treize populations chez *C. gestroi* a révélé un isolement par la distance et une différenciation génétique modérée à l'intérieur de certaines populations ($F_{ST} = 0,192$, 25 km) et un flux de gènes limité à plus large échelle (entre 100 et 600 km) avec une différenciation modérée entre les populations (Yeap *et al.*, 2011).

La viscosité a été clairement montrée chez seulement deux espèces de Rhinotermitidae. Vargo et Carlson (2006) ont mis en évidence, à l'aide de marqueurs microsatellites et de l'ADN mitochondrial, une dispersion restreinte des ailés chez *Reticulitermes hageni* avec un isolement par la distance et une différenciation génétique des populations significatifs par rapport à *R. flavipes*. L'analyse d'empreintes génétiques sur des populations de *Schedorhinotermes lamanianus* a également révélé un isolement par la distance sur une échelle spatiale inférieure à 1 km (Husseneder *et al.*, 1998).

Chez les Termitidae, le nombre d'études sur la structure génétique des populations est beaucoup plus faible et ne concerne que quelques espèces. L'analyse de marqueurs microsatellites chez *Macrotermes michaelsoni* a montré une faible différenciation génétique ($F_{ST} = 0,08$) sur une échelle géographique de 50 km (Brandl *et al.*, 2005). Au-delà de cette distance, les populations sont de plus en plus différenciées jusqu'à 100 km avec un F_{ST} qui se stabilise à 0,1 et qui n'évolue plus en fonction de la distance entre les populations. Selon les auteurs, un flux génique effectif sur de telles distances peut s'expliquer par le fait qu'il n'y ait qu'un seul essaimage massif avec un grand nombre d'ailés et que certains parviennent à parcourir de grandes distances de manière passive notamment grâce à la force du vent.

L'analyse de la structure génétique de *Nasutitermes nigriceps* avec des marqueurs allozymes a révélé une différenciation modérée entre trois sites jamaïcains séparés de 100 à 200 km ($F_{ST} = 0,107$) traduisant un flux génique restreint à cette échelle. L'analyse de marqueurs AFLP (polymorphisme de longueur des fragments ADN amplifiés) sur deux populations insulaires japonaises de *N. takasagoensis* a permis de mettre en évidence une différenciation génétique modérée ($F_{ST} = 0,057$) attestant que ces deux îles éloignées de 15 km ne sont pas complètement isolées (García *et al.*, 2002). Des échanges géniques s'opèrent donc malgré la distance et la barrière géographique qui séparent les deux îles. Parmi les hypothèses avancées pour expliquer cette faible différenciation génétique, une dispersion des ailés par migration des morceaux de bois flottants, des typhons ou une dispersion anthropique ont été évoquées. Une dernière hypothèse évoque la séparation récente de ces deux

populations, les similarités génétiques observées entre les deux populations actuelles n'ayant pas encore été effacées par la dérive génétique.

L'étude génétique de *Labiotermes labralis*, à partir d'ADN mitochondrial et de marqueurs microsatellites, sur trois sites en Guyane a révélé une forte différenciation génétique ($F_{ST} = 0.16 - 0.25$) entre ces trois populations séparées de 15 à 300 km (Dupont *et al.*, 2009). Une différenciation si élevée sur une petite échelle spatiale de l'ordre de 15 km suggère un flux génique réduit. Un des sites, montre une diversité génétique significativement plus faible et un niveau de consanguinité significatif par rapport aux autres sites pouvant s'expliquer par l'isolement de ce site à cause d'une fragmentation du milieu provoquée par l'activité humaine, qui favoriserait l'accouplement entre ailés apparentés. Une autre espèce, *Amitermes meridionalis*, présente des résultats similaires avec une différenciation élevée ($F_{ST} = 0.339$) entre des sous-populations séparées de 1 à 45 km dans un milieu fragmenté (Schmidt *et al.*, 2013).

En résumé, depuis ces vingt dernières années, l'apport des outils moléculaires a permis d'approfondir considérablement l'étude de l'organisation coloniale et populationnelle chez les termites et de mettre ainsi en évidence la très grande plasticité de leur système reproductif. En effet, l'ensemble des études citées précédemment chez les différents groupes de termites montre à quel point les stratégies reproductives sont variées, allant de colonies fondées à partir d'un seul couple de reproducteurs apparentés à des organisations bien plus complexes mêlant de multiples reproducteurs secondaires apparentés issus de la même colonie ou des reproducteurs primaires provenant de colonies différentes qui fusionnent. L'apparentement des reproducteurs et la consanguinité au sein des colonies sont deux éléments essentiels dans la détermination du mode de fondation des colonies et de la dispersion. Les termites ont longtemps été considérés comme ayant une dispersion limitée dans l'espace avec une distance de vol réduite chez les futurs reproducteurs ailés. Cependant, les analyses génétiques tendent à montrer que les flux de gènes chez les termites se maintiennent sur plusieurs dizaines de kilomètres. C'est le plus souvent seulement au-delà de centaines de kilomètres que les populations de termites apparaissent comme fortement différenciées. Différents facteurs tels que le vent ou l'homme pourraient favoriser la dispersion des gènes et des individus sur des échelles spatiales relativement importantes.

Les différents systèmes reproductifs évoqués précédemment supposent que l'ensemble des membres de la colonie sont produits de manière classique par reproduction sexuée à partir

des reproducteurs primaires et/ou secondaires. Nous allons voir maintenant qu'il existe d'autres modes de reproduction, impliquant de la reproduction asexuée, ce qui a nécessairement une incidence sur la structure génétique des colonies.

3. Reproduction asexuée chez les termites

3.1. Généralités et conséquences génétiques de la reproduction asexuée

La reproduction asexuée a fait l'objet de nombreuses études visant à comprendre les différents mécanismes impliqués, les conséquences à court/long terme, mais aussi pour tenter d'évaluer le nombre d'espèces qui utilisent ce mode de reproduction. Estimer le nombre d'organismes animaux capables de se reproduire de manière asexuée est relativement difficile. Selon les publications, il varie entre 0,1% (Kearney, 2003) et 1% (Schaefer *et al.*, 2006). La reproduction sexuée est largement décrite dans la littérature notamment grâce une plus grande facilité à repérer ce mode de reproduction, contrairement aux systèmes asexués. La capacité d'une espèce à utiliser la parthénogenèse comme mode de reproduction est soumise à deux exigences essentielles pour son évolution : une exigence biologique i.e. l'aptitude des organismes à pouvoir se passer de la fécondation pour se reproduire, et une exigence écologique i.e. la capacité pour individu parthénogène de fonder et maintenir une population sans être éliminée par la compétition ou l'hybridation (Cuellar, 1977). Généralement, les organismes se reproduisant par parthénogenèse se développent de manière plus importante que les formes sexuées, même si le nombre moyen de descendants produits par femelle reste équivalent (White, 1977). Les espèces parthénogènes prédominent particulièrement dans les milieux subissant des perturbations (e.g. inondation, sécheresse ou incendie) et dans lesquels elles doivent faire face à des conditions défavorables (Suomalainen, 1950). Ainsi, un habitat occasionnellement soumis à une perturbation peut initier l'apparition de la parthénogenèse. D'autres facteurs peuvent favoriser l'émergence de la parthénogenèse comme les milieux insulaires ou encore la modification des conditions édaphiques (Cuellar, 1977).

D'un point de vue génétique, la reproduction sexuée entre individus diploïdes mène à une distribution des génotypes qui suit l'équilibre d'Hardy-Weinberg en cas de panmixie, c'est-à-dire avec une rencontre aléatoire des gamètes (soit p^2 pour les homozygotes pp , $2pq$ pour les hétérozygotes, q^2 pour les homozygotes qq , avec p et q étant les fréquences alléliques). La reproduction asexuée tend à modifier cet équilibre, ce qui peut entraîner une

réduction de l'hétérozygotie, allant jusqu'à une homozygotie totale selon le type de reproduction asexuée. La reproduction sexuée présente un avantage sélectif, en augmentant le nombre de combinaisons indispensables à la survie dans un environnement en constante évolution et notamment dans la lutte contre les parasites, la maladie ou encore la prédation (Neaves and Baumann, 2011). Cependant, les meilleures combinaisons ne sont pas toujours conservées car sont souvent perdues d'une génération à la suivante. De plus, les variations géniques proposées par un système sexué ne sont pas nécessairement favorables, voire défavorables (Meeûs *et al.*, 2007). Il est souvent évoqué le « double coût » des systèmes sexués dû à l'investissement nécessaire des femelles pour la production de mâles, qui à leur tour investissent peu dans la descendance et à la dilution du génome parental dont seule la moitié est transférée à la génération suivante. Cependant, les avantages apportés par l'utilisation de la reproduction sexuée sont suffisants pour compenser ses effets négatifs, expliquant l'évolution et le maintien d'un tel système. La reproduction asexuée contre ce « double coût » du système sexué en limitant l'investissement pour produire des mâles et en permettant à chaque individu femelle, dans le cas de la thélytoquie (voir 3.2), de produire seule une descendance.

3.2. La parthénogenèse : définition, classification et conséquences génétiques

La parthénogenèse (du grec *parthenos* = vierge et *genesis* = naissance) est un terme générique utilisé pour parler de reproduction asexuée mais elle rassemble plusieurs types de reproduction dont certains ne correspondent pas à la définition de la reproduction asexuée. Cette dernière, aussi appelée reproduction clonale, se définit au sens strict comme la production de nouveaux individus génétiquement identiques (« clones ») à tous les loci du génome du parent à partir de cellules/structures somatiques (c'est-à-dire non impliquées dans les organes reproducteurs ou les gamètes). La parthénogenèse, relativement courante chez les animaux, a été décrite pour la première fois chez les pucerons (Bonnet, 1745). Des cas de parthénogenèse ont été décrits chez les poissons, les amphibiens, les oiseaux, les squamates ou encore les mammifères, ainsi que chez les insectes (Mittwoch, 1978). La question de l'origine évolutive de la parthénogenèse n'est pas clairement élucidée. Des études réalisées sur les chordés, les mollusques ou les arthropodes, ont montré une origine multiple de ce mode de reproduction avec une évolution indépendante apparue plusieurs fois au cours du temps (Simon *et al.*, 2003). Cependant, il existe quelques cas, comme les rotifères, chez qui la classe des Bdelloïdes est unisexuée, impliquant une origine unique de la parthénogenèse

(Simon *et al.*, 2003). Plusieurs origines possibles à la parthénogenèse ont été proposées : (i) une apparition spontanée due à une mutation sur des gènes impliqués dans la reproduction sexuée, ce qui peut générer une asexualité obligatoire ou facultative en conservant une certaine variation génétique (Schwander and Crespi, 2009), (ii) une hybridation entre deux espèces bisexuées, qui est sans doute l'origine la plus fréquemment évoquée chez les animaux et notamment chez les insectes (Simon *et al.*, 2003) ou encore (iii) une infection par un micro-organisme parasite ou symbiotique dont le plus connu est l'endosymbionte *Wolbachia*, détecté dans plusieurs centaines d'espèces d'Arthropodes, en particulier chez les Hyménoptères chez qui une induction de la parthénogenèse par cette bactérie a été montrée pour les guêpes parasitoïdes (genre *Trichogramma*) (Rabeling and Kronauer, 2013, Timmermans and Ellers, 2009).

Ce système, permettant de produire des individus par filiation sans avoir besoin de gamètes mâles, et donc de fécondation, se divise en trois catégories selon le mode de détermination du sexe : arrhénotoquie, thélytoquie et deutérotoquie.

- L'**arrhénotoquie** engendre des individus mâles à partir d'œufs non fécondés qui sont de ce fait haploïdes et génétiquement différents de la mère. Ce type de parthénogenèse est associé au système de reproduction haplo-diploïde dans lequel, les femelles diploïdes sont généralement produites par voie sexuée tandis que les mâles haploïdes se développent partir d'œufs non fécondés. Il ne s'agit donc pas de reproduction asexuée *stricto sensu* (Meeûs *et al.*, 2007, Rabeling and Kronauer, 2013). Ce processus fait partie du cycle de vie des Hyménoptères sociaux.
- La **thélytoquie**, à l'inverse de l'arrhénotoquie, produit uniquement des femelles à partir d'œufs haploïdes non fécondés (Meeûs *et al.*, 2007, Rabeling and Kronauer, 2013). On distingue deux formes : la thélytoquie apomictique (= améiotique = parthénogenèse mitotique) et la thélytoquie automictique (= parthénogenèse méiotique). La **thélytoquie apomictique** (aussi appelée apomixie) forme les gamètes sans méiose à partir d'œufs non fécondés avec une descendance qui a une composition génétique similaire à la mère et l'hétérozygotie est maintenue au cours des générations (absence de recombinaison génétique). L'apomixie peut donc être considérée comme de la reproduction asexuée véritable. Néanmoins, ce mode de parthénogenèse n'a jamais été clairement démontré chez les insectes sociaux mais simplement suspecté chez deux espèces de fourmis, *Cerapachys biroi* (Kronauer *et al.*, 2012) et

Mycocephurus smithii (Rabeling *et al.*, 2009). La **thélytoquie automictique** (aussi appelée automixie) produit des gamètes à partir d'œufs non fécondés mais en impliquant la méiose, contrairement à l'apomixie, ce qui peut entraîner des recombinaisons géniques (Meeûs *et al.*, 2007, Rabeling and Kronauer, 2013, Simon *et al.*, 2003). La restauration de la diploïdie est alors effectuée à travers quatre procédés ayant différentes conséquences sur la composition génétique de la descendance : la fusion terminale, la fusion centrale, la duplication des gamètes et la fusion aléatoire (Figure 3).

- Lors de la **fusion terminale**, la diploïdie est restaurée par la fusion de deux cellules haploïdes sœurs. Les taux moyens de transition vers l'homozygotie pour un locus hétérozygote vont de 1 (pour un locus proche du centromère, en absence de recombinaison entre le locus et le centromère) à 1/3 (pour un locus éloigné du centromère, en supposant que plusieurs événements de crossing-over séparent le locus considéré et le centromère) (Percy *et al.*, 2006). Cela a pour conséquence d'entraîner une réduction rapide de l'hétérozygotie et une homozygotie complète si aucune recombinaison n'a lieu (Rabeling and Kronauer, 2013).
- La restauration de la ploïdie par **fusion centrale** se fait par fusion des deux cellules haploïdes non-sœurs en deuxième division méiotique (Rabeling and Kronauer, 2013). Ici, le génome maternel est restitué pour tous les loci en absence de recombinaisons et l'hétérozygotie est conservée ou, en cas de crossing-over, se voit diminuer faiblement (Meeûs *et al.*, 2007, Rabeling and Kronauer, 2013). Les taux moyens de la transition à l'homozygotie vont de 0 pour un locus proche du centromère à 1/3 pour un locus éloigné du centromère (Percy *et al.*, 2006). Ainsi, en cas de faibles taux de recombinaison, l'hétérozygotie est préservée.
- La **fusion aléatoire** rassemble les mécanismes alternatifs de la restauration de la diploïdie. Ici, chaque locus hétérozygote présente un taux de transition vers l'homozygotie de 1/3, indépendamment de sa position sur le chromosome (Percy *et al.*, 2006).

- La **duplication gamétique** provoque la restauration de la diploïdie par fusion des deux cellules haploïdes qui résultent de la division de la cellule haploïde issue de la seconde division méiotique. Une des conséquences génétiques de cette forme de thélytoquie automictique est une homozygotie totale des individus avec ou sans évènements de recombinaison (Rabeling and Kronauer, 2013).
- La **deutérotoquie** produit des mâles et des femelles à partir d'ovules non fécondés mais les mâles ne jouent aucun rôle dans la reproduction.

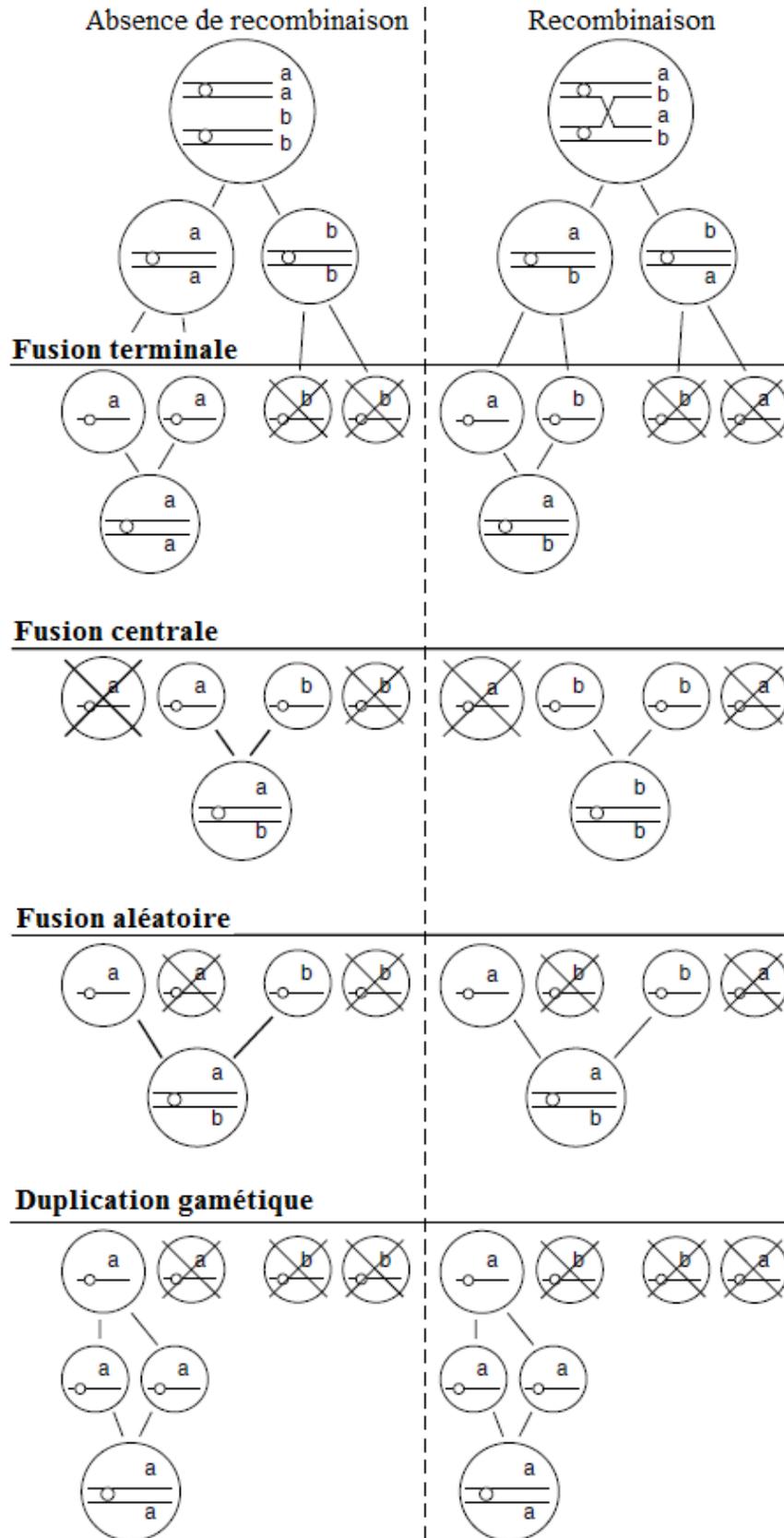


Figure 3 : Les différents modes de parthénogenèse thélytoque automictique. Sont illustrés les mécanismes avec et sans recombinaison génétique (crossing-over) : fusion centrale, fusion terminale, fusion aléatoire et duplication gamétique (d'après Pearcy *et al.* (2006)).

Chez les insectes eusociaux, la thélytoquie est un événement relativement rare. Sur près de 16000 espèces et sous-espèces de fourmis et près de 3000 espèces de termites, seulement treize espèces de fourmi (Masuko, 2013, Masuko, 2014, Rabeling and Kronauer, 2013) et dix espèces de termite ont été décrites comme capable de se reproduire via la parthénogenèse thélytoque (Tableau 2). L'évolution de la thélytoquie chez les insectes eusociaux reste difficile à comprendre car il existe une multitude de stratégies reproductives impliquant la reine fondatrice de la colonie ou encore par les ouvrières, comme cela existe chez certaines fourmis. De ce fait, il semblerait que la thélytoquie ait évolué à plusieurs reprises au cours de l'histoire évolutive des insectes eusociaux (Rabeling and Kronauer, 2013, Wenseleers and Van Oystaeyen, 2011). L'organisation coloniale rend souvent difficile l'observation et la description des systèmes de reproduction. En effet, sur le terrain, les nids sont parfois difficiles d'accès quand ils se trouvent dans le sol (nids endogés) ou quand ils n'ont pas de structure bien définie. Ainsi, l'ensemble des castes nécessaires à l'étude des systèmes de reproduction est souvent difficile à récolter.

Tableau 2 : Liste des termites identifiés comme parthénogènes. ? : mécanisme de restauration de la diploïdie non identifié.

Famille	Espèce	Thélytoquie	Mode de restauration de la diploïdie	Références
Archotermopsidae	<i>Zootermopsis nevadensis</i>	Facultative	?	Light (1944)
	<i>Z. angusticollis</i>	Facultative	?	Light (1944)
Kalotermitidae	<i>Kalotermes flavicollis</i>	Facultative	?	Grassé (1949)
	<i>Bifiditermes besoni</i>	Facultative	?	Afzal and Salihah (1985)
Rhinotermitidae	<i>Neotermes koshunensis</i>	Facultative	Fusion terminale	Kobayashi and Miyaguni (2016)
	<i>Reticulitermes hesperus</i>	Facultative	?	Weesner (1956)
	<i>R. speratus</i>	Facultative/AQS	Fusion terminale	Matsuura and Nishida (2001), Matsuura <i>et al.</i> (2004), Matsuura <i>et al.</i> (2009)
	<i>R. virginicus</i>	Facultative/AQS	Fusion terminale	Howard <i>et al.</i> (1981), Vargo <i>et al.</i> (2012)
Termitidae	<i>R. lucifugus</i>	Facultative/AQS	Fusion terminale	Buchli (1950), Luchetti <i>et al.</i> (2013b)
	<i>Velocitermes paucipilis</i>	Facultative	?	Stansly and Korman (1993)

3.3. La parthénogenèse chez les termites

La parthénogenèse chez les termites n'avait pas fait l'objet d'études approfondies jusqu'à ces dernières années, ce mode de reproduction étant jusqu'alors perçu comme un évènement rare avec une faible signification adaptative (Matsuura *et al.*, 2004). Le genre *Zootermopsis* (Archotermopsidae) a été le premier chez lequel la parthénogenèse a été démontrée (Light, 1944). Contrairement aux Hyménoptères sociaux chez qui la parthénogenèse est obligatoire (arrhénotoquie), le seul mode de parthénogenèse décrit chez les termites était la thélytoquie automictique facultative. Cependant, un nouveau système de reproduction a été décrit récemment chez quelques espèces de fourmis et de termites, qui combine reproduction sexuée et asexuée, permettant ainsi de tirer tous les bénéfices tout en réduisant les désavantages de ces deux modes de reproduction.

3.3.1. Parthénogenèse facultative

La parthénogenèse facultative se définit comme la capacité d'une femelle à produire une descendance lorsque l'accouplement avec un mâle est impossible. Ce mode de reproduction a un avantage adaptatif quand les femelles éprouvent des difficultés à s'accoupler avec des mâles, même si ce mode peut être inférieur à la reproduction sexuée à long terme en termes de valeur sélective (Kawatsu and Matsuura, 2013, Matsuura and Kobayashi, 2007). Ce système de reproduction est de plus en plus étudié car il représente un moyen d'étudier l'évolution et le maintien du sexe en comparant directement les individus capables de se reproduire de manière sexuée et asexuée (Matsuura and Nishida, 2001).

Chez les termites, la parthénogenèse facultative a été détectée chez dix espèces grâce à des expérimentations en laboratoire (Tableau 2). La première observation d'un cas de parthénogenèse chez les termites a été faite par Light (1944) qui, en isolant des larves femelles de deux espèces, *Zootermopsis nevadensis* et *Z. angusticollis*, s'est aperçu que certaines s'étaient différenciées en femelles néoténiques et avaient produit des œufs qui s'étaient à leur tour développés, pour la grande majorité, en larves femelles (28 femelles et 2 mâles). En 1949, Grassé a mis en évidence la présence de parthénogenèse chez *Kaloterme flavicollis* (Kalotermitidae) (Grassé, 1949), confirmée par Lebrun et Vieau par implantation de corps allates (glandes endocrines impliquées dans le fonctionnement des ovaires chez les insectes) supplémentaires chez des femelles non fécondées (Lebrun, 1978). Une autre étude menée chez *Bifiditermes beelsoni* (Kalotermitidae) a montré que des femelles désaillées, non

fécondées et isolées pour éviter toute fécondation ou en contact avec uniquement des nymphes femelles, ont été capables de produire des œufs (Afzal and Salihah, 1985). Cependant, cet évènement n'est pas systématique puisque 50% seulement des femelles désailées et isolées ont pondu des œufs et la viabilité, le taux de survie et d'éclosion se sont avérés relativement faibles. Une étude très récente a mis en évidence un nouveau cas de parthénogenèse facultative chez une troisième espèce de Kalotermitidae, *Neotermes koshunensis* (Kobayashi and Miyaguni, 2016). Celle-ci a montré à l'aide de marqueurs microsatellites que des couples femelle-femelle (FF) isolés des mâles étaient capables de produire une descendance viable par parthénogenèse, avec une production d'œufs et un taux d'éclosion plus faible que les couples femelle-mâle (FM). La descendance issue du couple FF présentait uniquement les allèles d'une des deux femelles, avec un taux d'homozygotie élevé pour un des deux allèles maternels. La proportion de descendants homozygotes pour les loci pour lesquels la mère était hétérozygote correspondait majoritairement à un mode de restauration de la diploïdie par fusion terminale.

Plusieurs espèces du genre *Reticulitermes* ont été décrites comme capables de se reproduire via parthénogenèse facultative. Weesner (1956) a rapporté que des femelles vierges désailées chez *R. hesperus* étaient capables de produire des œufs parthénogénétiques qui dégénéraient avant l'éclosion. Un cas similaire a également été décrit chez *R. lucifugus* (Buchli, 1950). Howard *et al.* (Howard *et al.*, 1981) ont démontré chez *R. virginicus* que des femelles désailées étaient capables d'établir seules une colonie, avec un potentiel reproductif égal à celui observé chez les couples hétérosexuels. Matsuura et Nishida (2001) ont mis en évidence la capacité de *R. speratus* à pouvoir fonder des colonies de manière asexuée en comparant différents modes de formation des colonies à partir d'une femelle seule (F), de couples FF ou de couples FM. Les femelles seules ainsi que les couples homosexuels FF ont été capables de produire une descendance par parthénogenèse. L'analyse du caryotype chez *R. speratus* a montré que cette espèce a un nombre fixe de chromosomes ($2N = 42$) et que les descendants issus de la parthénogenèse sont tous diploïdes (Matsuura *et al.*, 2004). Grâce à un marqueur microsatellite spécifique, Matsuura *et al.* (2004) ont déterminé que le mode de parthénogenèse impliqué chez cette espèce était de la thélytoquie avec une restauration de la diploïdie par fusion terminale. Ce résultat a été confirmé dans une étude ultérieure (Matsuura *et al.*, 2009). La présence de *Wolbachia* chez *R. speratus* mais également chez une espèce proche non parthénogène, *R. flavipes*, ont amené les auteurs à conclure que la parthénogenèse n'était pas induite par la présence de l'endosymbionte, celui-ci impliquant de plus une

restauration de la diploïdie par duplication gamétique (Rabeling and Kronauer, 2013), ce qui n'est pas le cas chez *R. speratus*.

Le seul cas recensé de parthénogenèse facultative chez les Termitidae a été décrit par Stansly (1993) chez le genre *Velocitermes* (Nasutitermitinae). L'étude expérimentale menée chez cette espèce a montré que les groupes de femelles non fécondées pouvaient produire une descendance viable composée en grande majorité de soldats, contrairement aux couples hétérosexuels qui produisaient une majorité d'ouvriers.

Tous les cas de parthénogenèse cités précédemment sont issus d'études expérimentales en laboratoire. De ce fait, la pertinence biologique de la parthénogenèse dans le cycle de vie naturel des espèces était encore inconnue jusqu'à très récemment. Des études réalisées sur *R. speratus* (Matsuura *et al.*, 2009) et *R. virginicus* (Vargo *et al.*, 2012) ont montré que la parthénogenèse pouvait faire partie intégrante des systèmes de reproduction en milieu naturel. C'est ce que nous allons maintenant détailler à travers la description de l'« Asexual Queen Succession » (AQS), un système particulier décrit chez seulement quelques espèces, mêlant reproduction sexuée et parthénogenèse.

3.3.2. « Asexual Queen Succession »

Le reproduction asexuée confère un avantage majeur par rapport à la reproduction sexuée, à savoir qu'elle permet la transmission de deux fois le nombre de gènes à la descendance (Roughgarden, 1991). Toutefois, la reproduction asexuée est également associée à des inconvénients, à court terme et à long terme, avec notamment une diversité génétique plus faible chez la descendance et une durée de vie plus réduite des lignées asexuées par rapport aux lignées sexuées (Bengtsson, 2009). Le système AQS réunit ainsi les avantages des deux modes de reproduction, sexuée et asexuée, tout en réduisant leurs inconvénients.

3.3.2.1. Espèces AQS

Un tel système a été décrit chez la fourmi polyandre *Cataglyphis cursor*. Comme nous l'avons vu précédemment, la parthénogenèse fait partie du cycle de reproduction naturel des Hyménoptères du fait de leur système haplo-diploïde (arrhénotoquie pour produire les mâles haploïdes). Chez cette espèce, une approche expérimentale a montré que les ouvrières étaient capables de produire par thélytoquie d'autres ouvrières et des reines de remplacement (ou gynes), dans les colonies où la reine est absente (Cagniant, 1979). L'étude génétique de 35

colonies monogames réalisée par Pearcy *et al.* (2004) à partir de marqueurs microsatellites a mis en évidence que 97,3% des ouvrières étaient issues de reproduction sexuée entre la reine et un mâle et que 96,4% des gynes étaient produites par thélytoquie à partir de la reine fondatrice (Pearcy *et al.*, 2004). Les génotypes de ces gynes ont montré qu'elles étaient toutes homozygotes pour un des deux allèles maternels sur plusieurs loci avec la reine était hétérozygote. Ainsi, il a été conclu que l'ensemble de ces gynes avait été produit par parthénogenèse thélytoque avec fusion centrale (Pearcy *et al.*, 2004). Par la suite, d'autres fourmis ont été décrites comme utilisant ce système de reproduction particulier telles que *Wasmannia auropunctata* (Fournier *et al.*, 2005), *Vollenhovia emeryi* (Ohkawara *et al.*, 2006), et *Paratrechina longicornis* (Pearcy *et al.*, 2011). Pour chaque cas avéré de thélytoquie chez les Hyménoptères, le mode de restauration de la ploïdie reste la fusion centrale des gamètes haploïdes.

Chez les termites, Matsuura *et al.* (2009) ont analysé des colonies de *R. speratus* pour lesquelles le roi primaire était présent et la reine primaire absente et remplacée par un grand nombre de reines secondaires nymphoïdes (jusqu'à 676). Le roi primaire, quant à lui, n'était remplacé par un mâle néoténique que dans une colonie. Cette première observation semblait indiquer que le roi primaire vivait plus longtemps que la reine primaire, rapidement remplacée à un certain stade de maturité de la colonie. D'autre part, cela laissait entendre que la colonie mourrait peu après la disparition du roi primaire (Matsuura, 2011, Matsuura *et al.*, 2009). L'analyse de marqueurs microsatellites a montré que 97% des femelles néoténiques étaient homozygotes pour un allèle maternel, avec une absence totale d'allèle exclusif paternel et un très fort apparentement avec la reine primaire ($r = 0.99$). Ce résultat indique que les femelles néoténiques ont été produites par parthénogenèse thélytoque avec fusion terminale à partir de la reine primaire (Matsuura *et al.*, 2004, Matsuura *et al.*, 2009). Les génotypes des ouvriers et des nymphes de dernier stade (destinées à se différencier en imagos) ont montré que ces individus étaient en grande majorité issus de reproduction sexuée (100% et 95%, respectivement), avec un apparentement entre la reine primaire qui ne différait pas significativement de 0,5, valeur attendue entre une femelle et sa descendance sexuée. Ces résultats traduisent l'existence d'un système combinant reproduction sexuée et parthénogenèse, proche de celui décrit chez les fourmis, appelé AQS chez *R. speratus* (Matsuura *et al.*, 2009). C'est également le cas chez deux autres termites du genre *Reticulitermes*, chez qui avait été observé expérimentalement de la parthénogenèse facultative.

L'étude menée par Vargo *et al.* (2012) sur cinq colonies de *R. virginicus* a également montré la présence de femelles nymphoïdes remplaçant la reine primaire. Cependant, le roi primaire n'a été trouvé que dans une colonie. L'analyse des génotypes obtenus à partir de marqueurs microsatellites a suggéré que l'ensemble des femelles néoténiques (97,4%), toutes homozygotes pour un des allèles maternels, a été produit par thélytoquie automictique avec fusion terminale, bien que l'hypothèse d'une duplication gamétique n'ait pas pu être exclue. Au contraire, 95,7% des ouvriers, 98,8% des soldats et 80% des imagos étaient issus de reproduction sexuée (Vargo *et al.*, 2012).

Une étude comparative de la structure reproductive a ciblé *R. urbis* et deux sous-espèces de *R. lucifugus*, *R. lucifugus lucifugus* et *R. lucifugus corsicus* (Luchetti *et al.*, 2013b) à partir de loci microsatellites. Trois colonies, deux de *R. lucifugus corsicus* et une de *R. lucifugus lucifugus*, possédaient uniquement des reproducteurs secondaires femelles nymphoïdes, affichant les deux classes d'homozygotes pour chacun des deux allèles maternels. Les femelles nymphoïdes d'une colonie de *R. lucifugus corsicus* présentaient une seule classe d'homozygote sur l'ensemble des loci. Au contraire, les ouvriers génotypés chez les deux sous-espèces affichaient un niveau variable d'hétérozygotie. Les auteurs ont conclu que *R. lucifugus corsicus* et *R. lucifugus lucifugus* étaient de nouvelles espèces AQS. Pour *R. urbis*, aucun biais de sex-ratio n'a été observé en faveur des femelles chez les reproducteurs secondaires nymphoïdes et aucun lien n'a été relevé entre le niveau d'homozygotie et les différentes castes, ne révélant pas de cas supplémentaire d'AQS.

La Figure 4 illustre le cycle de vie des espèces AQS de *Reticulitermes* (Kobayashi *et al.*, 2013).

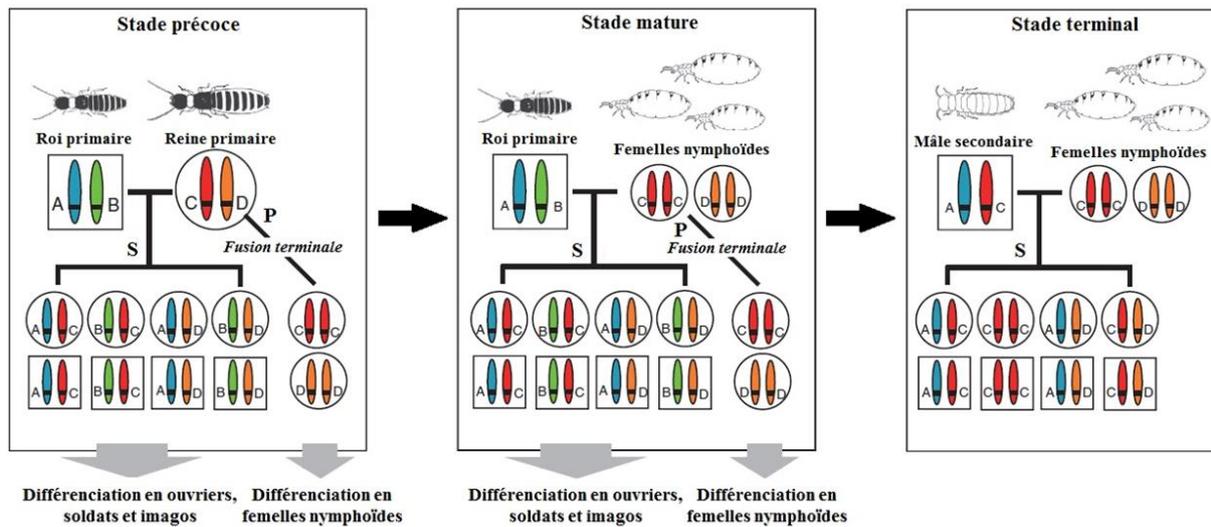


Figure 4 : Schéma général de l'évolution du système AQS au cours du développement de la colonie, décrit chez le genre *Reticulitermes* (d'après Kobayashi *et al.* (2013)). S : reproduction sexuée, P : parthénogenèse.

3.3.2.2. Avantages et conséquences génétiques de l'AQS

Chez les insectes sociaux, la capacité de combiner reproduction sexuée et asexuée pour produire les différentes castes représente un avantage considérable dans le fonctionnement de la colonie. La production d'un grand nombre de reines de remplacement permet un développement plus rapide de la colonie. En effet, la production d'œufs issue de dizaines voire de centaines de reines secondaires dépasse de loin la capacité d'une seule reine primaire (Thorne *et al.*, 1999). Ces reines de remplacement étant produites par thélytoquie, la reine primaire transmet l'ensemble de ses gènes aux générations suivantes même après sa mort, la rendant ainsi génétiquement « immortelle » au sein de la colonie. Chez les fourmis et les termites, les deux modes de restauration de la ploïdie décrits, à savoir la fusion centrale et la fusion terminale, peuvent tous deux mener à une très forte proportion d'individus homozygotes au cours des générations en fonction de la position des loci par rapport au centromère et donc du taux de recombinaison (Percy *et al.*, 2006). Une hausse du niveau d'homozygotie entraîne une baisse de la survie et de la valeur sélective due à la dépression de consanguinité dans la colonie (Hedrick and Garcia-Dorado, 2016). Chez les fourmis et les termites, les femelles de remplacement ne sont pas amenées à quitter le nid donc ne sont donc pas soumises aux contraintes environnementales et de ce fait présentent peu d'intérêt évolutif à être génétiquement diversifiées. Chez les termites, l'AQS permet la conservation du génotype maternel au cours du temps et cela même après plusieurs cycles de remplacement de la reine (Vargo *et al.*, 2012). En effet, les reines secondaires produites par parthénogenèse

peuvent également donner naissance à des filles néoténiques de seconde génération par reproduction asexuée comme cela a été montré chez *R. speratus* (Hayashi *et al.*, 2003).

Un autre avantage au système AQS réside dans la purge des allèles récessifs délétères, en empêchant leur transmission à la descendance. L'accumulation de mutation délétères est un des coûts majeurs de la reproduction asexuée entraînant une baisse rapide de la valeur sélective, ce qui peut mener à l'extinction d'une population (Gordo and Campos, 2008, Lynch and Gabriel, 1990). Le système haplo-diploïde des Hyménoptères permet la purge génétique des allèles délétères car ils sont soumis à la sélection à chaque génération de mâles haploïdes. La production de femelles néoténiques parthénogènes majoritairement homozygotes peut également représenter un moyen efficace pour éliminer ces mutations en empêchant leur transmission aux prochaines générations sexuées, dans le cas où la parthénogenèse fait partie du cycle de vie naturel de ces espèces (Matsuura, 2011, Vargo *et al.*, 2012).

Le système AQS permet également de réduire la consanguinité chez les ouvriers, les soldats et les ailés au sein des colonies, par comparaison avec la succession d'une reine par reproduction sexuée. En effet, chez les termites monogames, il peut exister des conflits entre le roi et la reine primaire sur l'investissement parental et la contribution génétique de chacun à la descendance (Matsuura, 2011). Si les femelles secondaires néoténiques sont issues de reproduction sexuée, cela conduit à une consanguinité père-fille qui entraîne une baisse de la valeur sélective de la descendance sexuée issue de ce couple (Matsuura, 2011, Matsuura *et al.*, 2009). La Figure 5 illustre cette hypothèse dans le cas d'un couple de reproducteurs non apparentés. Ici, les gènes de la reine primaire n'étant pas totalement conservés chez les reines secondaires sexuées, la descendance issue d'un accouplement père-fille n'est apparentée que d'un quart avec la reine primaire et de trois quarts avec le roi primaire. Cela entraîne un déséquilibre dans la contribution génétique à la descendance de chacun des reproducteurs primaires. Dans les colonies AQS, le roi primaire est amené à se reproduire avec les femelles néoténiques parthénogènes. Celles-ci étant génétiquement semblables à la mère, il n'y a pas de consanguinité due à des accouplements père-fille. Ainsi, la descendance issue du couple père-fille et celle issue du couple primaire sont apparentées de manière égale avec le couple primaire (Figure 5).

Enfin, les ouvriers, les soldats et les futurs essaimants doivent faire face à des conditions environnementales variées et ont un avantage à être produits par reproduction sexuée et donc à être génétiquement diversifiés, contrairement aux femelles secondaires. Une baisse de cette

variabilité au sein des castes neutres aurait un impact majeur en réduisant à la fois la défense contre les pathogènes, la division du travail ainsi que le taux de variations environnementales toléré par la colonie (Matsuura, 2011).

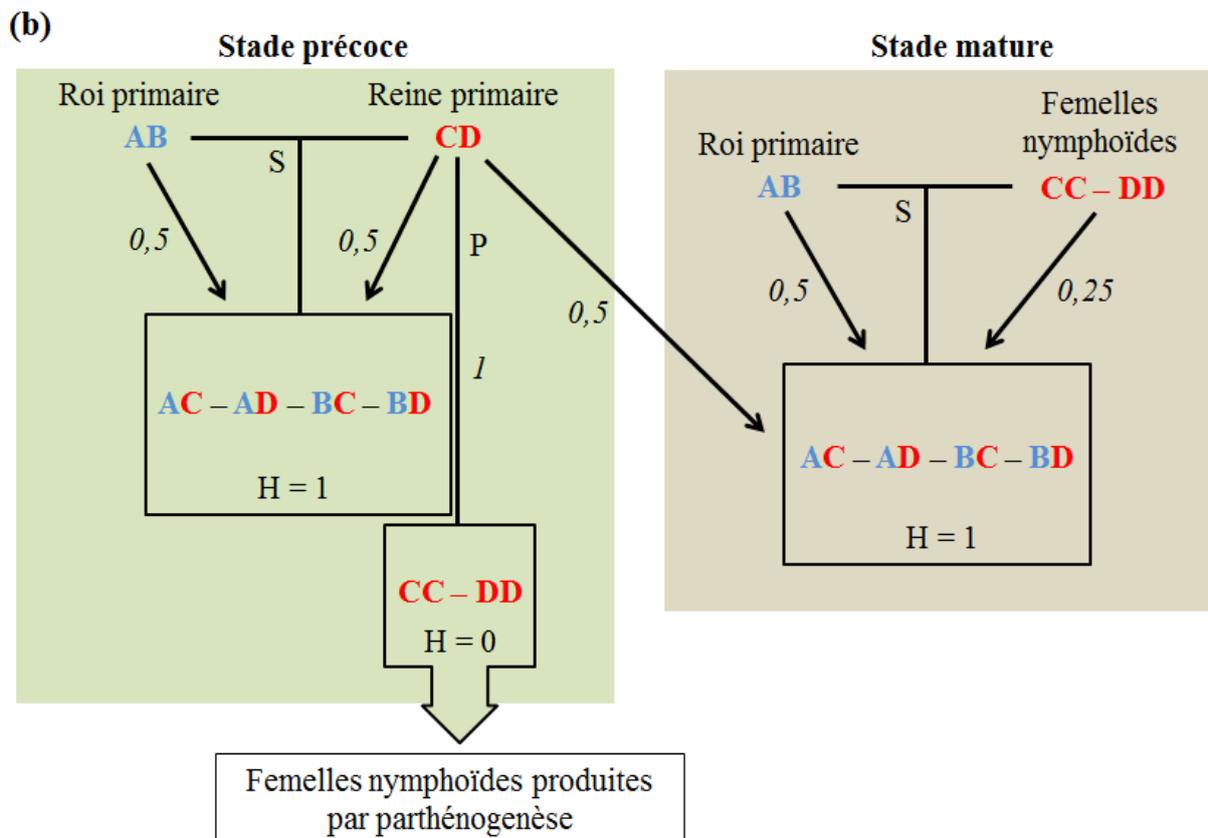
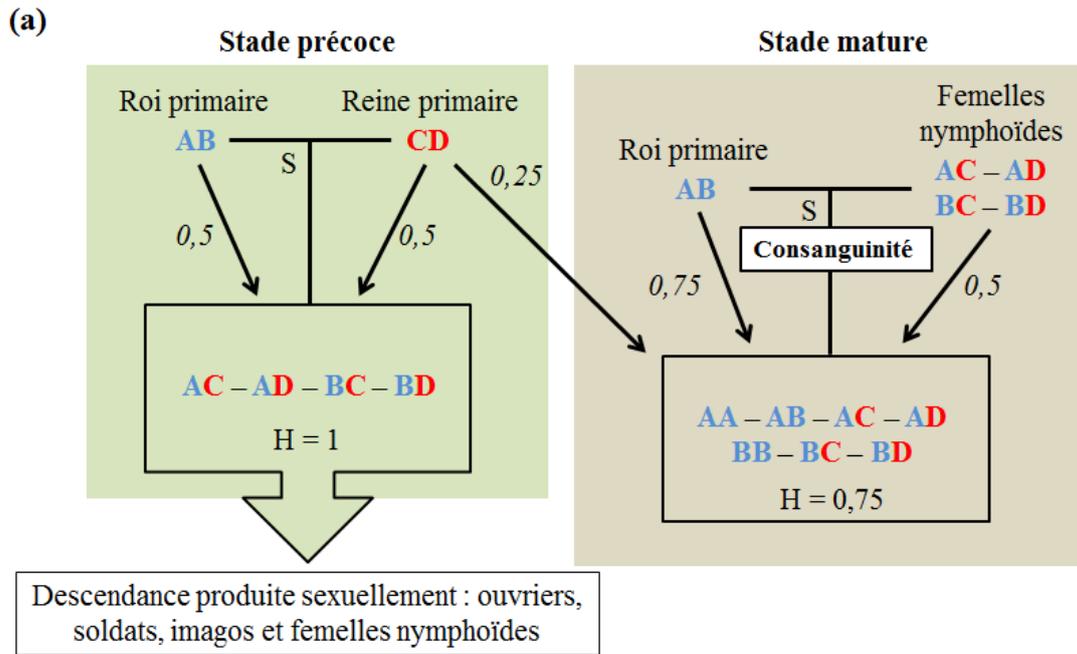


Figure 5 : Schémas illustrant la contribution génétique des reproducteurs à la descendance dans le cas (a) d'une production sexuée classique et (b) du système AQS chez le genre *Reticulitermes*. S : reproduction sexuée, P : parthénogenèse, H : hétérozygotie, valeur en italique : apparentement.

Les avantages et les conséquences génétiques du système AQS sont maintenant bien connus grâce à l'étude de la structure génétique des espèces décrites précédemment. Cependant, on ignore encore quels peuvent être les mécanismes à l'origine de ce système. Matsuura (2011) avance l'hypothèse qu'un élément génétique égoïste pourrait être à l'origine de conflits génétiques chez les termites parthénogènes. Un élément égoïste se définit comme un élément privilégiant sa propre survie et sa transmission au détriment du reste du génome de l'individu, en ayant un impact neutre ou désavantageux pour l'organisme dans son ensemble. Les éléments égoïstes comptent plusieurs catégories (Werren, 2011, Werren *et al.*, 1988) : les éléments transposables, les éléments induisant une conversion génique biaisée, les distorceurs méiotiques, les distorceurs de post-ségrégation et les facteurs cytoplasmiques. La thélytoquie automictique avec une restauration de la diploïdie par fusion terminale décrite chez les termites et donnant des femelles néoténiques homozygotes pour chaque allèle maternel peut entraîner des conflits génétiques au niveau de la première division méiotique (Figure 3). La présence d'un élément égoïste aurait pour conséquence de favoriser une des deux classes d'homozygotes et donc d'induire un biais dans les fréquences des génotypes de la descendance sexuée issue du roi primaire et des femelles néoténiques. On retrouve chez les trois espèces AQS décrites chez les termites des cas illustrant la présence possible d'un élément égoïste. Chez *R. speratus*, 91% des femelles néoténiques parthénogènes sont homozygotes pour un seul des allèles maternel sur un locus, pour une des colonies analysées, ce qui entraîne un biais dans les fréquences génotypiques des nymphes ailées issues de reproduction sexuée (Matsuura, 2011, Matsuura *et al.*, 2009). Un cas similaire a été décrit chez *R. virginicus* dont l'ensemble des femelles néoténiques de chaque colonie est apparu comme homozygotes pour un unique allèle maternel sur plusieurs loci (Matsuura, 2011, Vargo *et al.*, 2012). La même situation a été observée dans une colonie de *R. lucifugus* dans laquelle 100% des femelles néoténiques étaient homozygotes pour un unique allèle sur six loci analysés (Luchetti *et al.*, 2013b). On peut noter que cette hypothèse reste dépendante du mode de restauration de la diploïdie ainsi que de la position des loci sur le chromosome (plus ou moins proches du centromère et donc plus ou moins sujets aux recombinaisons) et est difficilement démontrable dans le cas d'une fusion centrale, par exemple, dans laquelle les femelles néoténiques produites par une mère hétérozygote sont en grande majorité hétérozygotes (Figure 3).

Une autre hypothèse a été avancée quant à l'origine génétique de la différenciation des femelles néoténiques. Chez les espèces AQS, le biais engendré par la présence d'un grand

nombre de femelles néoténiques parthénogènes homozygotes suggère qu'il puisse y avoir une différenciation orientée des nymphes, en femelles néoténiques ou en femelles ailées, selon leur génotype (Matsuura, 2011). Une étude expérimentale menée chez *R. speratus* a effectivement suggéré une influence génétique sur la détermination des castes (Matsuura, 2011, Yamamoto and Matsuura, 2012). Chez cette espèce, l'analyse de femelles nymphoïdes différenciées à partir de nymphes produites par voie sexuée et issues de colonies orphelines, a révélé que celles étant homozygotes sur deux loci microsatellites indépendants montraient un meilleur développement des ovaires et donc une meilleure capacité reproductive que les femelles hétérozygotes. De plus, les nymphes homozygotes pour un de ces loci ont une priorité développementale à se différencier en femelles néoténiques. Ainsi, les auteurs de cette étude ont conclu à l'existence d'un système « multi-loci » chez les termites qui influencerait sur la fécondité de la reine et orienterait la différenciation des individus parthénogènes en néoténiques (Yamamoto and Matsuura, 2012).

3.3.3. Occurrence des espèces AQS et évolution

Jusqu'à aujourd'hui, le système AQS avait été décrit chez seulement cinq espèces de fourmis et trois espèces de termites. Chez les termites, une étude menée sur six espèces de *Reticulitermes* (*R. speratus*, *R. kanmonensis*, *R. miyatakei*, *R. amamianus*, *R. okinawanus* et *R. yaeyamanus*) s'est interrogée sur l'évolution de la parthénogenèse dans le genre. Elle a permis de montrer que même si ces espèces étaient toutes capables de former des couples FF qui produisent des œufs en absence de mâle, seul *R. speratus* produisait une descendance viable par parthénogenèse (Kawatsu and Matsuura, 2013). Dedeine *et al.* (2016) ont établi une phylogénie moléculaire regroupant les espèces AQS, *R. speratus*, *R. virginicus* et *R. lucifugus* ainsi que les autres espèces non-AQS mentionnées précédemment, en plus de *R. chinensis*, également décrite comme non parthénogène (Huang *et al.*, 2013). Les auteurs ont montré que les trois espèces AQS ne forment pas un groupe monophylétique et appartiennent à trois lignées différentes, comprenant chacune des espèces non-AQS. Ainsi, l'AQS semble avoir évolué de manière indépendante à au moins trois reprises au cours de la diversification du genre.

L'une des premières pistes à exploiter pour trouver de nouvelles espèces AQS serait d'approfondir l'examen des espèces capables de faire de la parthénogenèse facultative, celles-ci étant les premières candidates pour la présence d'AQS. En effet, certaines de ces espèces décrites comme parthénogènes dans des études antérieures se sont révélées être en mesure de

combiner reproduction sexuée et parthénogenèse. Cependant, la parthénogenèse facultative n'implique pas nécessairement la présence d'AQS comme cela a été récemment montré chez *Neotermes koshunensis* (Kobayashi and Miyaguni, 2016). Cette dernière représente d'ailleurs un cas particulier car non seulement cette espèce parthénogène n'utilise pas la stratégie AQS mais une étude expérimentale a montré que la production de reproducteurs secondaires était inhibée par la présence d'au moins un reproducteur primaire, mâle ou femelle, dans la colonie (Miyaguni *et al.*, 2013). De plus, dans toutes les colonies orphelines observées qui ont développé des néoténiques, seuls des mâles néoténiques ont été produits. Ainsi, contrairement à la majorité des termites chez qui on trouve la présence de reproducteurs néoténiques, *N. koshunensis* semble adopter une stratégie différente en favorisant la production de femelles parthénogènes seulement en cas de disparition des reproducteurs primaires, empêchant ainsi toute possibilité de reproduction sexuée entre le roi et les femelles néoténiques et donc d'AQS.

Un autre élément décrit comme indice potentiel dans la détection d'espèces AQS serait la présence d'un biais dans le sexe-ratio des ailés en faveur des femelles (Matsuura, 2011, Vargo *et al.*, 2012). Dans le cas où le roi primaire est remplacé par un mâle secondaire néoténique produit sexuellement à partir du couple primaire au stade terminal de la colonie, événement rarement décrit, il en découle une consanguinité mère-fils. Cela a pour conséquence d'entraîner un biais dans la contribution des sexes à la descendance sexuée puisque l'apparement avec la reine primaire est plus important, et un biais de sexe-ratio en faveur des imagos femelles est attendu (Kobayashi *et al.*, 2013). Ainsi, les espèces pour lesquelles a été relevé un nombre plus important de femelles chez les ailés comme *R. speratus*, *R. virginicus* et *R. lucifugus* se sont révélées être des espèces AQS (Luchetti *et al.*, 2013b, Matsuura, 2011, Vargo *et al.*, 2012).

-Matériel et Méthodes-

1. Description du site d'étude et échantillonnage

1.1. Site de Petit Saut en Guyane

La Guyane présente un climat de type équatorial avec des températures avoisinant les 26°C à l'année. L'humidité est comprise entre 80% et 90% et peut atteindre 98% en saison humide. Les précipitations sont assez variables suivant les régions, soit 1700 à 3800 millimètres par an. La Guyane est recouverte à 94 % de forêts tropicales humides et à 6 % de savanes, marécages ou massifs forestiers (Ensaf, 2010).

La région de Petit Saut, située à 120 km de Cayenne, s'étend sur près de 50 km le long du fleuve Sinnamary (Figure 6). Les forêts de cette région sont soumises à des précipitations d'environ 3000 millimètres par an, survenant principalement entre janvier et juin avec une saison sèche de juillet à novembre. La température annuelle moyenne est de 26°C. Le site de Petit Saut est recouvert par de la forêt mature sur un sol bien drainé avec une hauteur moyenne de la canopée atteignant 30 à 40 m. Ce site est principalement connu pour la présence de son barrage hydraulique mis en service en 1995 afin de répondre aux besoins en énergie. Il fournit aujourd'hui plus de 80 % de l'électricité consommée en Guyane. La construction de ce barrage a eu des conséquences sur l'écosystème forestier en causant une forte perturbation de ce milieu. En effet, la retenue d'eau créée par le barrage a noyé plus de 300 km² de forêt tropicale nécessitant des opérations de sauvetages pour la faune environnante, avec près de 6000 animaux capturés et déplacés. L'essentiel de la forêt est constitué de forêts de terre ferme placées sur des reliefs hors de l'eau mais il existe aussi des groupements forestiers qui sont liés à la présence d'eau sur le site tels que des forêts marécageuses (hydromorphie permanente), des forêts inondables (sous-bois constitués essentiellement d'épiphytes) et des forêts ripicoles (végétation dense le long des cours d'eau).

Situé à proximité du barrage de Petit Saut, le bureau d'étude en environnement HYDRECO a été implanté en 1991 pendant sa construction. Il a été chargé du suivi écologique du site, en particulier de la qualité de l'eau grâce à l'installation de plusieurs stations disposées en amont et en aval du barrage (mesures hydrobiologiques et hydrochimiques). Ce laboratoire possède une infrastructure et une logistique lui permettant d'accueillir des équipes de recherches (carbets, matériels, laboratoires, espaces de travail) et sa localisation nous a donné un accès facilité aux différents sites alentours, au cours des différentes missions d'échantillonnage.

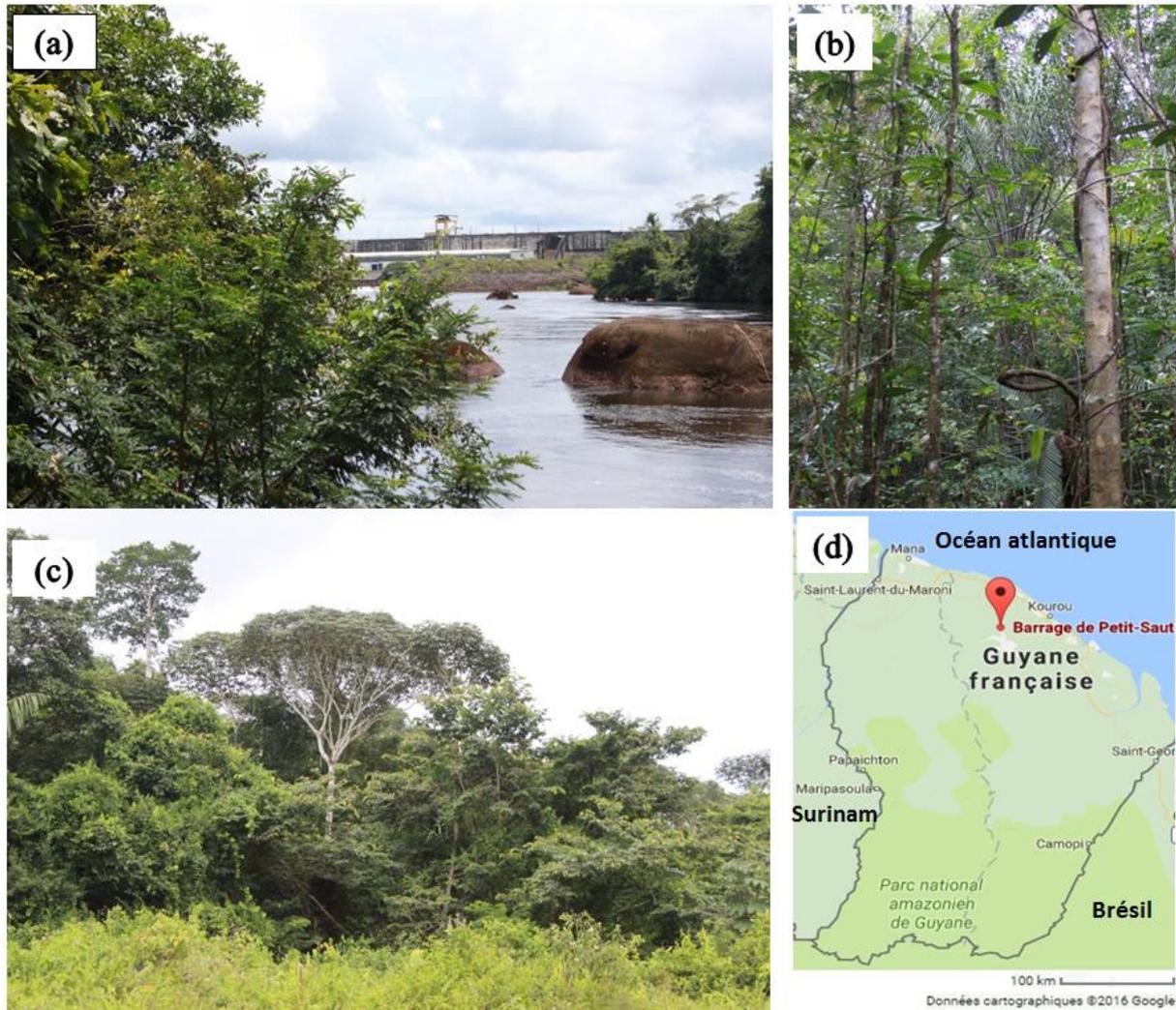


Figure 6 : (a) barrage de Petit Saut en Guyane, (b) et (c) milieux forestiers caractéristiques des sites échantillonnés et (d) localisation du barrage de Petit Saut.

1.2. Échantillonnage et origine des colonies

Un total de 43 colonies ou fragments de colonies d'*E. neotenicus* a été collecté au cours de trois campagnes d'échantillonnages organisées en octobre 2012, mai 2013 et mars 2014 sur dix sites, séparés de 0.8 à 11 km, le long de la route de Petit Saut (Figure 7, Annexe 1). Les 43 colonies ont été utilisées pour la caractérisation des marqueurs moléculaires, 41 pour l'analyse de structuration génétique des colonies et des populations, et 10 pour la démonstration de l'AQS chez cette espèce.

Un total de 164 colonies de *S. minutus* réparties sur 13 sites, a également été échantillonné le long de la route de Petit Saut pendant cinq campagnes de collectes en mars-avril 2014, octobre 2014, mars-avril 2015, novembre 2015 et juin 2016 (Figure 7, Annexe 2).

132 colonies ont été utilisées pour la description de l'organisation sociale, 85 pour l'estimation de la taille des nids, 74 pour la caractérisation des marqueurs moléculaires, 42 pour l'analyse de structuration génétique des colonies et des populations, et 12 pour l'étude de l'AQS et l'origine génétique des ailés.

Chaque nid ou morceau de nid a été soigneusement disséqué dans le but d'extraire les individus d'intérêt pour les différentes études, et tous ont été conservés dans l'éthanol 96% ou 100% à 4°C. Le sexe des reproducteurs primaires et secondaires, des nymphes et des imagos a été déterminé à la loupe binoculaire. L'origine génétique des individus a été déterminée pour l'ensemble des castes à savoir les reproducteurs primaires et secondaires, les ouvriers, les soldats, les nymphes (dans deux colonies d'*E. neotenicus*) et les imagos (dans deux colonies de *S. minutus*) (Annexe 1 et 2). Pour les études de structuration génétique, seuls les ouvriers et soldats ont été utilisés (Annexe 1 et 2).

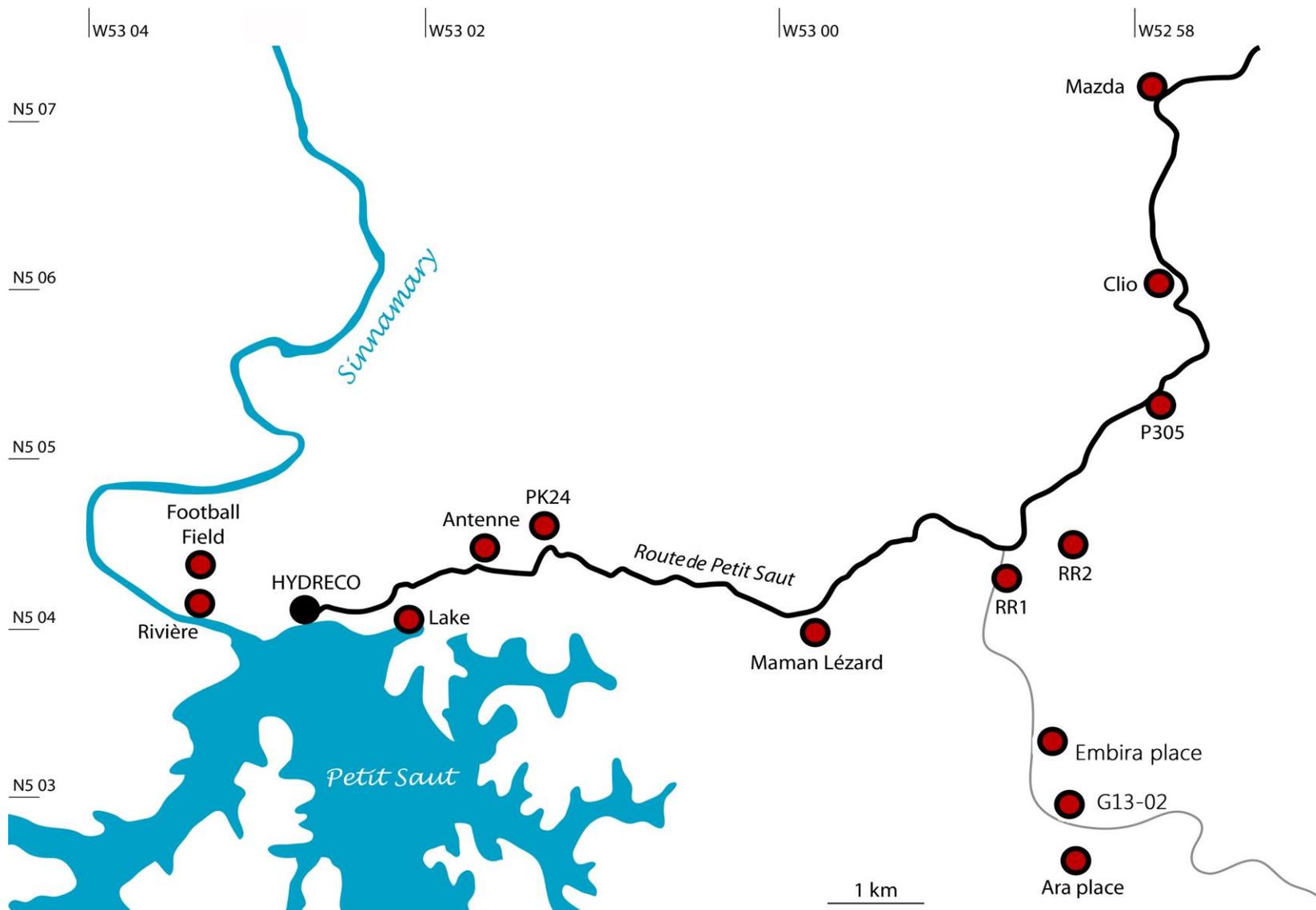


Figure7 : Localisation des différents sites d'échantillonnage le long de la route de Petit Saut en Guyane.

2. Structure sociale chez *S. minutus*

Toutes les analyses et mesures détaillées dans cette partie ont été réalisées à Prague, à l'Institut de Chimie organique et de Biochimie (IOCB) de l'Académie des Sciences Tchèque.

2.1. Reconstruction du cycle de vie

Le cycle de vie complet de *S. minutus* a été reconstruit à partir de l'analyse de la structure sociale de 132 nids récoltés au cours des cinq missions réparties sur trois années consécutives et couvrant deux saisons différentes à savoir une saison humide (de juin à avril) et une saison sèche (d'octobre à novembre). La taille de 85 de ces nids a également été mesurée à partir du volume total selon la formule suivante : $l \times w \times h \times 0.523$ avec l , w et h correspondant à la longueur, la largeur et la hauteur des nids.

2.2. Origine développementale des femelles néoténiques

Plusieurs approches ont été réalisées afin de déterminer l'origine développementale des femelles néoténiques. Des observations directes ont été faites à partir des mues de nymphes femelles se différenciant en néoténiques, récoltées dans certaines colonies échantillonnées. En partant de l'hypothèse que la différenciation en femelles néoténiques se faisait à partir du stade nymphal 4, des manipulations expérimentales ont été réalisées en isolant cinq nymphes femelles de stade 4 issues de colonies non essaimantes, qui ont été observées pendant 60h afin de détecter une éventuelle différenciation. Une analyse morphométrique a également été menée à partir de nymphes de stade 2 à 5, de femelles néoténiques et d'imagos femelles, prélevés dans quatre colonies. L'ensemble de ces individus (soit 126 au total) a été photographié et plusieurs caractères morphologiques ont été mesurés en utilisant le logiciel ImageJ 1.48v : la largeur de la tête, la longueur des bourgeons alaires chez les nymphes ou des ailes chez les imagos, la longueur du tibia arrière-gauche, la largeur et la longueur du pronotum, et la longueur de la zone de croissance de l'antenne située entre le troisième et le neuvième segment (de la base vers l'extrémité). Toutes ces mesures ont ensuite été pondérées pour pallier aux différences de tailles éventuelles entre les colonies en centralisant les données sur la largeur de la tête d'une nymphe de stade 4. Les résultats de ces mesures ont ensuite été analysés grâce au logiciel STATISTICA 8 (Weiß, 2007).

2.3. Analyse du sexe-ratio et de l'allocation au sexe chez les imagos

Le sexe-ratio des imagos a été évalué à partir de l'ensemble des imagos et nymphes du stade précédant la différenciation en imagos, collectés dans 14 colonies essaimantes pendant la saison des pluies précédant l'essaimage. Les individus mâles et femelles ont été séparés pour la suite des analyses. La valeur numérique moyenne du sexe-ratio a été calculée pour les 14 colonies à partir de la proportion de femelles par rapport à l'ensemble des individus. Ces valeurs ont ensuite été corrigées à partir des différences de poids secs entre les imagos mâles et femelles afin d'évaluer le ratio d'investissement entre les deux sexes. Les poids secs ont été calculés pour 20 imagos de chaque sexe, provenant de cinq colonies, qui ont été déshydratés par un processus alternant des séries d'éthanol et d'acétone pendant 16h, séchés à l'aide d'un CentriVap Vacuum Concentrator (Labconco) pendant 2h puis pesés sur une balance de précision Sartorius 4501 Micro. Le rapport male - femelle pour le poids sec a été évalué comme stable pour les cinq colonies (valeur moyenne = 1.148, SD = 0,0075, IC à 95% = 1,141 à 1,154) et il a donc été utilisé comme coefficient d'investissement pour les femelles afin de convertir les valeurs numériques de sexe-ratio dans toutes les colonies. Les valeurs numériques et d'investissement de sexe-ratio ont ensuite été comparées avec la valeur attendue pour un investissement égal entre chaque sexe (0,5) à partir d'un test de Student (test-t) pour un échantillon unique. Enfin, le fait d'avoir des colonies complètes avec l'ensemble des individus a permis de calculer les valeurs numériques et d'investissement de sexe-ratio pour les populations comme cela a été décrit par (Burke and Franks, 1995) afin de détecter la présence d'un biais éventuel en faveur d'un des sexes au sein des colonies qui serait dû à une différence de productivité.

3. Techniques moléculaires

3.1. Extraction de l'ADN génomique total

L'ADN génomique a été extrait individuellement en utilisant le kit d'extraction QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue pour les tissus animaux. L'extraction a été réalisée à partir de la tête et du thorax pour l'ensemble des castes, à l'exception des femelles néoténiques et des imagos, dans le but d'éviter de co-extraire des inhibiteurs des réactions moléculaires, contenus dans le tube digestif (e.g. les acides humiques du sol). Les tissus ont été broyés dans 180µL de tampon ATL avec un piston stérile, 20µL de protéinase K ont ensuite été ajoutés, puis le mélange a été incubé une nuit entière à 56°C. L'ADN des femelles

néoténiques et des imagos a été extrait directement à partir de l'individu entier, sans broyage des tissus, afin de conserver l'information morphologique intacte (sexe et statut physiologique). Le protocole d'extraction du kit a ensuite été respecté avec une élution finale des ADN dans 50µL de tampon AE. La concentration et la qualité des ADN ont été vérifiées grâce à des mesures par spectrophotométrie sur Nanodrop (Desjardins and Conklin, 2010) permettant d'obtenir une estimation de la concentration en ng/µL et d'évaluer la contamination en acides humiques (rapport d'absorbance A260/A230) et en protéines (rapport d'absorbance A260/A280).

3.2. Marqueurs mitochondriaux

Afin de vérifier l'affiliation taxinomique des colonies (barcoding ADN) et d'étudier la distribution géographique des haplotypes mitochondriaux, un individu (ouvrier ou soldat) de chaque colonie a été soumis à une amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) ciblant le gène mitochondrial du cytochrome oxydase I (COI) ou II (COII). Le barcoding ADN utilise des séquences de petites tailles comme outil moléculaire pour permettre l'identification spécifique, sachant que ces séquences sont présentes chez un grand nombre d'organismes. Depuis 2003, le COI a été sélectionné comme barcode ADN du fait de son taux de divergence qui permet de discriminer les espèces voisines chez les animaux (Desjardins and Conklin, 2010, Hebert *et al.*, 2003a, Hebert *et al.*, 2003b). Cependant, ce gène a montré des difficultés d'amplification chez certaines espèces de termites et la présence récurrente de pseudogènes (Hausberger *et al.*, 2011, Monaghan *et al.*, 2009, Roy *et al.*, 2014). De ce fait, le gène COII est souvent utilisé à la place du COI chez les termites. Dans notre étude, le COI a montré des résultats satisfaisant pour *E. neotenicus*, mais nous avons été contraints d'utiliser le COII pour *S. minutus* pour les raisons évoquées plus haut.

Pour le COI, les conditions d'amplification suivantes ont été suivies pour un volume final de 40 µL : 1 X PCR Master Mix, 0,4 µM de chaque amorce, 2 µL d'ADN extrait et de l'eau ultra-pure q.s.p. 40 µL. Les amorces suivantes ont été utilisées : LCO 5'- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G -3' et HCO 5'- TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA -3' (Folmer *et al.*, 1994). Les conditions d'amplification suivantes ont été respectées : une dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min, suivie par 40 cycles à 94°C pendant 30 sec (dénaturation), 50°C durant 45 sec (hybridation) et 72°C pendant 1 min (élongation) puis une élongation finale à 72°C pendant 10 min.

Pour le COII, les conditions d'amplification suivantes ont été respectées pour un volume final de 40 µL : 1 X PCR Master Mix, 0,4 µM de chaque amorce, 2 µL d'ADN extrait et de l'eau ultra-pure q.s.p. 40 µL. Les amorces suivantes ont été utilisées : Mod A-Leu 5'- CAG ATA AGT GCA TTG GAT TT -3' (Miura *et al.*, 2000) et B-tLys 5'- GTT TAA GAG ACC AGT ACT TG -3' (Liu and Beckenbach, 1992). Le protocole d'amplification suivant a été suivi : une dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min, suivie par 40 cycles à 94°C pendant 30 sec, 45°C durant 1 min et 72°C pendant 3 min puis une élongation finale à 72°C pendant 10 min.

30 µL de produit PCR ont ensuite été envoyés à Beckman Coulter Genomics (Takeley, UK) pour séquençage avec 5 µM de l'amorce sens.

3.3. Développement et amplification des marqueurs microsatellites

3.3.1. Mise au point des banques microsatellites et validation des couples d'amorce

Une banque microsatellite spécifique à chaque espèce a été développée dans le cadre de cette thèse. Pour la mise en place de ces deux banques, l'ADN génomique a été extrait à partir de 20 ouvriers issus d'une colonie d'*E. neotenicus* et de 40 soldats issus de deux colonies de *S. minutus*. Les ADN ont ensuite été envoyés à la société Genoscreen (Lille, France) pour la mise au point des banques microsatellites, réalisée par un séquençage haut débit via la plateforme de pyroséquençage 454 GS-FLX® (Roche Diagnostics) après fragmentation, enrichissement en séquences microsatellites et amplification par PCR de l'ADN enrichi (Malausa *et al.*, 2011). Au total, 219 couples d'amorces ont été validés *in silico* à partir de 12493 séquences présentant des motifs microsatellites pour *E. neotenicus* et 94 couples d'amorces encadrant des motifs microsatellites ont été validés à partir de 4933 séquences pour *S. minutus*. 23 et 30 couples pour *E. neotenicus* et *S. minutus*, respectivement, ont ensuite été testés biologiquement à partir de 8 et 10 ADN d'individus provenant de colonies différentes.

Les réactions PCRs monoplexes (amplification d'un seul fragment à partir d'un couple d'amorces) pour tester ces couples d'amorces ont été réalisées dans un volume final de 12,5 µL, avec 1X de tampon de réaction, 1,5 mM de MgCl₂, 0,24 mM de dNTPs, 0,4 µM de chaque amorce non marquée, 0,04 U/µL de FastStartTaq DNA Polymerase (Roche, France), 1 à 2 µL d'ADN dilué au demi et d'eau ultra-pure q.s.p. 12,5 µL. Le programme PCR suivant a été utilisé : une dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min, suivie par 40 cycles à 95°C

pendant 30 sec, 55°C durant 30 sec et 72°C pendant 1 min puis une élongation finale à 72°C pendant 10 min.

Pour qu'un marqueur microsatellite soit validé biologiquement, nous avons pris en compte les paramètres suivants :

- Une amplification du produit PCR de la taille attendue,
- une absence de bandes aspécifiques (i.e. une seule bande de la taille attendue) sur gel d'agarose,
- un potentiel « polymorphe » des marqueurs (i.e. des bandes de tailles différentes entre les différents individus) sur gel d'agarose.

Ainsi, neuf et dix couples ont été validés biologiquement pour *E. neotenicus* et *S. minutus*, respectivement. Pour *E. neotenicus*, cinq couples ont été validés dans un premier temps pour l'étude du système de reproduction, puis vingt autres couples ont été testés dont quatre ont été validés biologiquement pour l'étude de génétique des populations.

3.3.2. Amplification des marqueurs microsatellites

3.3.2.1. Polymorphisme des loci microsatellites

Les couples d'amorces validés biologiquement ont été utilisés pour caractériser le polymorphisme des marqueurs microsatellites par génotypage sur séquenceur automatique (Malausa *et al.*, 2011). Le polymorphisme des marqueurs a été testé sur un individu (ouvrier ou soldat) provenant de 43 colonies pour *E. neotenicus* et de 74 colonies pour *S. minutus*.

Pour réaliser l'analyse de ces fragments microsatellites, une seule des amorces de chaque couple a été marquée à la fluorescence, avec des fluorophores différents pour les loci dont la longueur de fragment était proche et risquant de se chevaucher à la lecture des profils. Les mêmes fluorophores ont parfois été utilisés pour les loci de tailles éloignées. Le protocole et les conditions PCR ont été les mêmes que ceux cités précédemment pour la validation biologique des marqueurs. Pour l'analyse de fragments, les produits PCR ont préalablement été dilués au 10^{ième}, au 20^{ième} ou au 50^{ième} selon le nombre de marqueurs, puis 1 µL de chaque produit PCR a été ajouté à un mélange de 0,5 µL de marqueur de taille standard Liz500 et 16,5 µL de formamide pour chaque individu. Les mélanges ont été déposés à la plateforme

génomique de l'IMRB de l'hôpital Henri Mondor (Créteil, France). Les profils obtenus ont été analysés avec le logiciel GeneMarker v. 2.6.3 software (Applied Biosystems) puis avec le logiciel GeneMapper® v. 5 (Applied Biosystems).

3.3.2.2. Amplification par PCR multiplexe

Une fois les loci polymorphes identifiés, nous avons associé certains d'entre eux en fonction de leur taille et de leur fluorophore afin de pouvoir réaliser des multiplexes c'est-à-dire des co-amplifications avec plusieurs couples d'amorces dans la même réaction PCR. Un mélange d'amorces a été préparé pour chaque multiplexe avec une concentration finale pour chaque amorce de 2 μ M. Au total, deux et trois multiplexes ont été mis en place pour *E. neotenicus* et *S. minutus*, respectivement (Tableau 3). Le protocole PCR a été le suivant : 1 X Qiagen Multiplex PCR Master Mix, 0,2 μ M du mélange d'amorces, 1 à 2 μ L d'ADN et de l'eau ultra-pure q.s.p. 12,5 μ L. Le programme PCR suivant a été utilisé : une dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min, suivie par 35 cycles à 95°C pendant 30 sec, 55°C durant 90 sec et 72°C pendant 30 sec puis une élongation finale à 68°C pendant 10 min.

Tableau 3 : Organisation en multiplexes des marqueurs microsatellites développés pour *E. neotenicus* et *S. minutus*. En : *Embiratermes neotenicus*, Sm : *Silvestritermes minutus*, Lal : *Labiatermes labralis*.

Espèce	Locus	Motif	Séquence des amorces (5'- 3')	Fluorophore	Référence
<i>Embiratermes neotenicus</i>	<i>Multiplexe 1</i>				
	En-05	(tgg) ₁₂	5'-ACGCAGCAGTAGGTACAGGAA-3' 5'-TCCAACCACAACCACTAGCA-3'	PET	
	En-11	(ac) ₁₄	5'-CCAACCTCGTAGGTGTAGAGGAT-3' 5'-CCGTCTCTTGTGAGTGTTGTG-3'	NED	
	<i>Multiplexe 2</i>				
	En-08	(ac) ₁₃	5'-CTGAGCGGTTGCAGAGTACC-3' 5'-TTCCCGGCCAAAGTACTAAC-3'	6'FAM	Fougeyrollas <i>et al.</i> (2015)
	En-10	(tg) ₁₄	5'-CGTCCAGAAGATTCCTACCG-3' 5'-TCTCTACCTCGTGTCTGCCT-3'	NED	
	En-15	(ca) ₁₅	5'-CGATGAGATTCCGTAGACACC-3' 5'-AACCTAGCACCTCACATGC-3'	NED	
	En-19	(tg) ₁₇	5'-TACATTCAAATTAGTCTTGTGCC-3' 5'-TTGGTCGAGCCTATCTGGTC-3'	PET	
	En-21	(tac) ₁₈	5'-ACCATAACAATACTACTACCACTACCACT-3' 5'-TCGTAACCTAAGTGTGAATGTGAATTT-3'	VIC	
	<i>Multiplexe 1</i>				
	En-08	(ac) ₁₃	5'-CTGAGCGGTTGCAGAGTACC-3' 5'-TTCCCGGCCAAAGTACTAAC-3'	6'FAM	Fougeyrollas <i>et al.</i> (2015)
	En-10	(tg) ₁₄	5'-CGTCCAGAAGATTCCTACCG-3'	NED	

			5'-TCTCTACCTCGTGTCTGCCT-3'		
En-11	(ac) ₁₄		5'-CCAACTCGTAGGTGTAGAGGAT-3'	NED	
			5'-CCGTCTCTTGTGAGTGTTGTG-3'		
En-15	(ca) ₁₅		5'-CGATGAGATTCCGTAGACACC-3'	NED	
			5'-AACCCTAGCACCTCACATGC-3'		
En-19	(tg) ₁₇		5'-TACATTCAAATTAGTCTTGTGCC-3'	PET	
			5'-TTGGTCGAGCCTATCTGGTC-3'		
Multiplexe 2					
En-25	(ac) ₁₁		5'-AGTTCGCGTTCAGAAGAAGC-3'	NED	
			5'-TTCTCAATCAATGCAACCTGTC-3'		
En-35	(ca) ₀₉		5'-ACAGAGTGGCCTCTTTACGC-3'	6'FAM	Fougeyrollas <i>et al.</i> (en
			5'-CCCATTCAAGCACGTCTGTA-3'		préparation)
En-37	(ac) ₀₉		5'-ACGCGCACAGTATTGCAT-3'	6'FAM	
			5'-TGAGTGTGGTGGGGTAATGT-3'		
En-39	(ag) ₀₉		5'-GCTTCCAGTGAAATCACAATTC-3'	PET	
			5'-GCAGTGAGATTTGTAGCCCC-3'		
<i>Silvestritermes minutus</i>	Multiplexe 1				
Sm-02	(tg) ₀₈		5'-GGGTTGTGAAGTTGACCGTT-3'	NED	
			5'-GGGTCGACGATGATACAGGA-3'		Fougeyrollas <i>et al.</i> (soumis)
Sm-22	(ag) ₁₅		5'-CTTGCGACGAAACGTCAGT-3'	6'FAM	
			5'-TCACAACCAGTAATTGGAATGC-3'		
En-35	(ca) ₀₉		5'-ACAGAGTGGCCTCTTTACGC-3'	NED	Fougeyrollas <i>et al.</i> (en
			5'-CCCATTCAAGCACGTCTGTA-3'		préparation)
En-39	(ag) ₀₉		5'-GCTTCCAGTGAAATCACAATTC-3'	PET	
			5'-GCAGTGAGATTTGTAGCCCC-3'		

<i>Multiplexe 2</i>				
Sm-05	(ac) ₀₈	5'-ACGCAGGGTCTTAGTGAAGC-3' 5'-TTTATATCTTACATGATAATCACGGG-3'	VIC	
Sm-06	(gt) ₀₉	5'-AACCACCTACAACCTGTGCC-3' 5'-GCATGTGTTGGTGCACATAAAT-3'	PET	
Sm-16	(ca) ₁₁	5'-GGAAAGGGATAACAATAAAATCAGG-3' 5'-TGCACGAACAACCTCAATGT-3'	6'FAM	Fougeyrollas <i>et al.</i> (soumis)
Sm-23	(ac) ₁₆	5'-ACATGGCTTGAATCTGCTGC-3' 5'-TCCACAACCTGATGATGGC-3'	6'FAM	
Sm-25	(ca) ₁₇	5'-AAACAAACATGGCGTCCAAT-3' 5'-TCAACTGATGTGGTGACAGTCT-3'	VIC	
Sm-27	(ca) ₂₀	5'-AGCAAACCTGACATGTGTCGC-3' 5'-GAACGTAGTTGTCTTGGCAGG-3'	PET	
<i>Multiplexe 3</i>				
Lal-5	(ca) ₁₈	5'-TTTGTGGT CTGGTGCTTAT-3' 5'-ATGCTGACTTTGGCAGAACG-3'	PET	Dupont <i>et al.</i> (2009)
En-15	(ca) ₁₅	5'-CGATGAGATTCCGTAGACACC-3' 5'-AACCCTAGCACCTCACATGC-3'	NED	Fougeyrollas <i>et al.</i> (2015)

3.4. Visualisation des produits PCR

Les produits PCR ont été déposés sur un gel d'agarose préparé à 1,5 % pour les PCR microsatellites en monoplexe et pour les PCR COI, et à 3 % pour les PCR en multiplexe avec 1X d'agent intercalant (GelRed™, Biotium) afin de révéler ou séparer les fragments amplifiés. La taille des fragments a été évaluée grâce au dépôt d'un marqueur de taille moléculaire (Quick-Load® 100 bp DNA Ladder, New England Biolabs). La migration a été réalisée par électrophorèse dans un tampon tris-acétate-EDTA 0,5X (TAE) puis la révélation des produits d'amplification s'est faite par dépôt des gels sur une plaque UV.

4. Analyse des données

4.1. Barcoding ADN des colonies

Les séquences COI et COII obtenues ont été visualisées via les chromatogrammes envoyés par la société Beckman Genomics, puis alignées et corrigées manuellement grâce au logiciel BioEdit v. 7.1.11 (Hall, 1999) et MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). L'outil d'identification BOLD Systems du barcode (Ratnasingham and Hebert, 2007) et le programme BLASTn de NCBI ont permis de vérifier que les individus de toutes les colonies appartenaient bien à la même espèce, i.e. *E. neotenicus* ou *S. minutus*, en comparant les séquences obtenues avec celles présentes dans les bases de données.

4.2. Structure génétique des colonies et des populations

4.2.1. Caractérisation des marqueurs

Pour les marqueurs microsatellites validés, le nombre d'allèles, les hétérozygoties observée et attendue et l'indice de fixation F_{IS} (Weir and Cockerham, 1984) ont été calculés grâce aux logiciels GENETIX v. 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004) et FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet, 2001). La déviation à l'équilibre d'Hardy-Weinberg a été testée pour chaque locus en appliquant une correction de Bonferroni avec Genepop on the web (Rousset, 2008) et FSTAT v. 2.9.3.2. Ce modèle théorique postule qu'au sein d'une population, il y a équilibre des fréquences alléliques et génotypiques d'une génération à l'autre. Le déséquilibre de liaison a également été mesuré entre chaque paire de locus avec Genepop on the web. Il y a déséquilibre de liaison si la fréquence des gamètes porteurs des allèles de deux loci différents est différente du produit des fréquences des allèles indiquant une association préférentielle

entre deux allèles. Plusieurs évènements non exclusifs peuvent créer un déséquilibre gamétique : une liaison physique entre les loci (faible distance génétique), la fusion entre deux populations (fréquences géniques différentes pour les deux loci), la dérive génétique, l'effet fondateur, la sélection naturelle ou encore un biais d'échantillonnage. La présence éventuelle d'erreurs dues à la PCR comme le « stuttering » (légers changements survenant dans la taille des allèles pendant la PCR et générant des pics rebonds ou « stutters »), les allèles nuls (un ou plusieurs allèles n'amplifiant pas durant la PCR) ou le « large allele dropout » (allèles de grande taille amplifiant moins bien que les plus petits) a été vérifiée grâce au logiciel Micro-checker (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

4.2.2. Analyse de la structure reproductive des colonies

4.2.2.1. Origine génétique des individus

Les différentes castes de dix colonies d'*E. neotenicus* ont été analysées à partir de cinq loci microsatellites. Pour *S. minutus*, douze colonies ont été analysées à partir de douze loci microsatellites (Annexe 1 et 2, Tableau 3).

Les génotypes parentaux ont été reconstruits pour chaque colonie à partir des génotypes des ouvriers et des soldats en utilisant les logiciels GERUD 2.0 (Jones, 2005) et COLONY v. 2.0.1.5 (Jones and Wang, 2010) puis ils ont été comparés aux génotypes parentaux observés, obtenus dans les cas où les reproducteurs primaires ont pu être directement génotypés.

Pour déterminer l'origine sexuée ou asexuée des individus, le nombre d'allèles, la présence éventuelle de génotypes non attendus dans le cas d'une répartition mendélienne des allèles parentaux reconstruits, et la présence ou non au sein des génotypes des allèles des deux parents, ont été évalués pour les femelles néoténiques, les individus stériles (ouvriers/soldats), et pour certaines colonies, les nymphes et les imagos (Annexe 1 et 2). L'apparentement, r , entre les différentes castes a été mesuré en utilisant le logiciel KINGROUP v. 2 (Konovalov *et al.*, 2004) et la valeur a été comparée à l'hypothèse nulle proposant que tous les individus soient issus d'une reproduction sexuée entre deux reproducteurs non apparentés ($r = 0,5$) grâce à un test de Student (t-test) pour un échantillon unique.

Pour les femelles néoténiques (FN) issues d'une reproduction asexuée, le mode de parthénogenèse thélytoque a été mis en évidence en calculant les taux de transition vers l'homozygotie (R) pour les loci hétérozygotes chez la reine primaire inférée puis en

comparant cette valeur aux valeurs théoriques attendues pour chaque mode de thélytoquie à l'aide d'un test du Chi2 (Pearcy *et al.*, 2006) :

$$R = \frac{FN_{\text{homozygotes}} \text{ issues d'une reine primaire}}{FN_{\text{totale}} \text{ issues d'une reine primaire}} \frac{\text{heterozygote}}{\text{heterozygote}}$$

4.2.2.2. Structure génétique des colonies

L'analyse de la structure génétique coloniale et populationnelle a été réalisée à partir de 41 colonies et 10 loci microsatellites pour *E. neotenicus* et de 42 colonies et 12 loci microsatellites pour *S. minutus* (Tableau 3, Annexe 1 et 2).

La structure reproductive des colonies a été déterminée en comparant le nombre d'allèles et les fréquences génotypiques des ouvriers et des soldats aux valeurs théoriques attendues sous une répartition mendélienne des allèles à l'aide d'un test d'indépendance (G-test) sommé sur tous les loci, pour chaque colonie. Les résultats obtenus ont permis d'assigner les colonies aux différents types de structure familiale (Bulmer *et al.*, 2001, Deheer and Vargo, 2004, Thorne *et al.*, 1999, Vargo, 2003b) : famille simple, étendue et mixée (voir 2.2.1). Les coefficients de consanguinité, se traduisant par des mesures d'hétérozygotie, appelés F-statistiques (Weir and Cockerham, 1984, Wright, 1965) et adaptés aux insectes sociaux (Thorne *et al.*, 1999), ont été calculés à différents niveaux hiérarchiques : au niveau individuel (I), au niveau colonial (C) et au niveau de la population totale (T). Ces coefficients permettent d'approfondir l'étude de la structure génétique des colonies en apportant des précisions sur le nombre de reproducteurs et leur apparentement. Le F_{IT} , coefficient de consanguinité standard, mesure la consanguinité des individus à l'intérieur de la population et sa valeur est proche de zéro si les colonies sont menées par des reproducteurs non apparentés. Le F_{IC} mesure la consanguinité des individus à l'intérieur des colonies et est particulièrement sensible au nombre de reproducteurs et à leur degré d'apparentement. Une valeur négative du F_{IC} indique une structure familiale de type famille simple, avec un seul couple de reproducteurs. Cette valeur tend vers zéro lorsque les colonies sont menées par des reproducteurs multiples. Le F_{CT} estime la différenciation génétique entre les colonies à l'intérieur de la population. Les F-statistiques ont été calculées puis testées pour leur significativité à l'aide d'intervalles de confiance à 95 % générés par 1000 répétitions de bootstraps en utilisant FSTAT version 2.9.3.2.

4.2.3. Analyse de la structure génétique des populations

4.2.3.1. Marqueurs mitochondriaux

Les séquences COI et COII ont été utilisées pour mesurer la fréquence relative des haplotypes au sein de chaque site de Petit Saut. Le programme PhyloGeoViz (Tsai, 2011) a permis de représenter la répartition et la fréquence des différents haplotypes sur une carte du site.

4.2.3.2. Approches Bayésiennes de regroupement

Deux approches Bayésiennes de regroupement, non spatialisée et spatialisées, ont été utilisées pour dix jeux de données répliqués, créés avec un individu par colonie, dans le but de détecter la présence ou non d'une structuration des colonies d'*E. neotenicus* et de *S. minutus* à l'échelle de Petit Saut. Ces méthodes utilisent les génotypes multiloci et tentent de grouper les individus en clusters ou populations d'individus s'accouplant au hasard, en minimisant le déséquilibre au modèle de Hardy-Weinberg et le déséquilibre gamétique sur le jeu de données. Chaque individu est assigné à un cluster génétique inféré par les modèles Bayésiens selon une probabilité postérieure.

Le logiciel STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2010) a été utilisé pour identifier la présence de clusters génétiques (K) pour chaque jeu de données répliqué selon les paramètres suivants :

- Un modèle « admixture » (brassage génétique), qui considère que les individus peuvent avoir des origines différentes à l'intérieur de la population,
- Un modèle de fréquences alléliques corrélées, qui considère que les fréquences sont presque identiques dans les différentes populations par des événements de migration ou d'un ancêtre partagé,
- Un « burn-in » de 50000, qui correspond à la durée avant laquelle les données vont commencer à être collectées pendant la simulation et 100000 répétitions après le « burn-in » (méthode de Monte Carlo par chaînes de Markov (MCMC)),

- Un modèle « LOCPRIOR » qui permet de prendre en compte la localisation de chaque individu pour les assigner aux clusters, modèle optimisé pour les jeux de données qui présentent une faible structuration.

Au total, dix répétitions ont été lancées pour chaque cluster testé ($K = 1$ à 10). Une fois les simulations terminées, la méthode Evanno (Evanno *et al.*, 2005), effectuée par STRUCTURE HARVESTER v0.6.94 (Earl and vonHoldt, 2012), a été utilisée pour identifier le nombre optimal de clusters (Delta K) dont l'ensemble des répétitions a été associé grâce à l'algorithme *Greedy*, exécuté à partir du programme CLUMPP (Jakobsson and Rosenberg, 2007), qui permet d'assigner de manière optimale les individus aux clusters en combinant les résultats obtenus pour chaque répétition. Enfin, un graphique illustrant l'appartenance des individus à chaque K a été généré par le programme STRUCTURE Plot (Ramasamy *et al.*, 2014).

La deuxième approche utilisée, à l'aide du package Geneland de R v. 3.3.0 (Guillot *et al.*, 2005), était spatialisée. Elle infère le nombre de clusters et met en évidence les discontinuités génétiques entre ces différents clusters en tenant compte des coordonnées spatiales de chaque individu. La méthode MCMC a été utilisée avec 100000 répétitions pour chaque K testé ($K = 1$ à 10) avec un modèle de fréquences alléliques corrélées et un intervalle de restriction de 100 afin de réduire l'auto-corrélation. Ce modèle spatial a été utilisé car, contrairement à STRUCTURE, il correspond à des modèles spatiaux qui peuvent être attendus lorsque la différenciation se produit par un flux génétique limité, induit par la présence de barrières physiques telles que les routes, les rivières, les chaînes de montagnes ou l'activité humaine comme cela a pu être montré chez certaines espèces de termites (Dronnet *et al.*, 2005, Dupont *et al.*, 2009, Vargo *et al.*, 2003).

4.2.3.3. Différenciation génétique des populations

Le package hierfstat de R v. 3.3.0 (Goudet, 2005) a été utilisé pour estimer des F-statistiques hiérarchisées. Cette analyse ajoute un niveau supplémentaire par rapport à l'analyse classique de la structure génétique des colonies, qui est celui des sites d'échantillonnage ou des clusters génétiques définis par les approches Bayésiennes de regroupement. Cela permet une mesure plus précise de la structuration des populations en tenant compte du regroupement des colonies à l'intérieur des sites ou des clusters. Ainsi, la différenciation génétique a été mesurée entre les colonies à l'intérieur de la population totale

(F_{CT}), entre les colonies à l'intérieur des sites ou des clusters (F_{CS}), et entre sites ou clusters à l'intérieur de la population totale (F_{ST}). Les intervalles de confiance à 95 % ont été générés par 1000 répétitions de bootstraps. Le coefficient F_{ST} a également été mesuré entre les différents sites ou clusters deux-à-deux avec le programme Arlequin v. 3.5.2.2.

4.2.3.4. Isolement par la distance

L'isolement génétique par la distance a été mesuré à l'échelle de Petit Saut pour *E. neotenicus*, et à l'intérieur de trois sites (RR1, Football Field et PK24) pour *S. minutus*, pour chacun des 10 jeux de données répliqués, en utilisant le package adegenet v.2.0.1 de R v. 3.3.0 (Jombart, 2008). La corrélation entre les distances génétiques et les distances géographiques a été testée grâce au test de Mantel avec 999 permutations.

-Chapitre 1-
Stratégie reproductive et dispersion
d'*Embiratermes neotenicus*



1. Description du modèle d'étude : *Embiratermes neotenicus*

1.1. Sous-famille des Syntermitinae

Embiratermes neotenicus appartient à la sous-famille des Syntermitinae (Termitidae). Les Syntermitinae sont composés de dix-huit genres rassemblant 101 espèces endémiques des régions néotropicales, avec une répartition qui s'étend du sud de Mexico au nord de l'Argentine (Constantino, 1998, Krishna *et al.*, 2013, Postle and Scheffrahn, 2016) : *Acangaobitermes*, *Armitermes*, *Cahuallitermes*, *Cornitermes*, *Curvitermes*, *Cyrilliotermes*, *Embiratermes*, *Ibitermes*, *Labiotermes*, *Macuxitermes*, *Mapinguaritermes*, *Noirotitermes*, *Paracurvitermes*, *Procornitermes*, *Rhynchotermes*, *Silvestritermes*, *Syntermes* et *Uncitermes*. Les Syntermitinae sont caractérisés par des soldats présentant des mandibules fonctionnelles bien développées, de formes diverses, ainsi qu'un large pore apical situé à l'extrémité d'un tube frontal, appelé nasus (Fontes, 1985). Ce nasus, convergence (Inward *et al.*, 2007b, Rocha *et al.*, 2012), peut être long par rapport à la capsule céphalique comme chez les *Rhynchotermes*, ou plus court comme chez les *Syntermes* (Constantino and Carvalho, 2011). La sous-famille des Syntermitinae (Engel and Krishna, 2004) est aujourd'hui considérée comme monophylétique et s'avère être proche d'une des lignées des Termitinae qui sont, eux, polyphylétiques (Bourguignon *et al.*, 2014, Inward *et al.*, 2007b, Ohkuma *et al.*, 2004).

Les différents genres de Syntermitinae affichent une grande diversité dans les types de nids construits (Krishna *et al.*, 2013, Postle and Scheffrahn, 2016). Quelques espèces construisent des nids diffus dans le sol avec un réseau de galeries souterraines, comme par exemple certaines espèces de *Rhynchotermes* ou de *Macuxitermes*. D'autres établissent leurs colonies dans des nids construits par d'autre espèces, abandonnés ou non (espèces inquilines), comme *Cyrilliotermes* et *Curvitermes*. D'autres encore construisent des nids épigés arboricoles d'aspect cartonné sur des souches d'arbres ou du bois plus moins dégradé, comme *Labiotermes* tandis que certaines espèces édifient des monticules épigés comme *Cornitermes*, qui peuvent atteindre plusieurs mètres de hauteur, ou *Embiratermes*. Les Syntermitinae montrent également des régimes alimentaires variés avec des espèces humivores comme *Cyrilliotermes angulariceps*, *Silvestritermes heyeri* et *Embiratermes chagresi*, des espèces xylophages comme *Cornitermes weberi* et *C. pugnax*, et des espèces qui se nourrissent de litière comme *Syntermes spinosus* (Davies, 2002).

1.2. Genre *Embiratermes*

Le genre *Embiratermes* était anciennement inclus dans le genre *Armitermes*, qui rassemblait toutes les espèces chez qui les soldats possédaient un nasus allongé et des mandibules bien développées (Krishna *et al.*, 2013, Postle and Scheffrahn, 2016). Le genre *Armitermes*, décrit par Wassman (Wasmann, 1897), était donc un groupe hétérogène qui comprenait des espèces évoluant dans divers habitats en Amérique Centrale et en Amérique du Sud. Il a été révisé à plusieurs reprises et les genres *Curvitermes* et *Rhynchotermes* (Holmgren, 1912), *Cyrilliotermes* et *Embiratermes* (Fontes, 1985), *Cahualitermes* (Constantino, 1994) et *Paracurvitermes* (Constantino and Carvalho, 2011) ont été décrits à la suite de ces révisions. La révision la plus récente du genre *Armitermes* par (Rocha *et al.*, 2012) a ajouté trois nouveaux genres : *Silvestritermes*, *Uncitermes* et *Mapinguaritermes*. Dans cette même étude, une phylogénie des Syntermitinae a été proposée à partir de caractères morphologiques. La position du genre *Embiratermes*, qui apparaît comme le second groupe le plus interne de la sous-famille après *Ibitermes*, reste encore confuse. De plus, le genre requiert une révision taxinomique (Rocha *et al.*, 2012). Fontes (1985) a différencié *Embiratermes* d'*Armitermes* à partir de critères morphologiques, avec des différences au niveau des mandibules des ailés et des ouvriers (taille de la dent apicale plus importante et des dents marginales plus réduites sur la mandibule droite chez *Embiratermes*) ou encore de la tête (allongement plus important de la tête chez les soldats d'*Embiratermes*). Il a également été observé des différences dans le comportement des individus qui se déplaceraient plus lentement chez *Embiratermes* et des stratégies défensives différentes chez les soldats de ces deux genres.

Le genre *Embiratermes* compte à ce jour quatorze espèces (Constantino, 1998) : *E. benjamini*, *E. brevinasus*, *E. chagresi*, *E. festivellus*, *E. heterotypus*, *E. ignotus*, *E. latidens*, *E. neotenicus*, *E. parvirostris*, *E. robustus*, *E. silvestrii*, *E. snyderi*, *E. spissus* et *E. transandinus*. Ces espèces ont une répartition géographique qui se limite à l'Amérique du Sud, et principalement au Brésil et en Guyane, à l'exception d'*E. chagresi* qui a été décrit en Amérique Centrale. Ce groupe serait l'un des plus abondants en forêt Amazonienne et la majorité des espèces vivrait dans des nids construits par d'autres espèces (Constantino, 1992, Mathews, 1977). La biologie du genre *Embiratermes* reste aujourd'hui assez mal connue. Les voies de développement des castes ont été très peu étudiées et aucune information n'existe à ce jour sur le développement des castes sexuées. Seul le développement des castes stériles a

été étudié chez *E. chagresi* (Roisin, 1992) (Figure 8). La présence de deux classes de taille a été montrée chez les larves avec des mâles légèrement, mais significativement, plus grands que les femelles au premier stade larvaire (L1) et largement plus grands au second stade larvaire (L2). Un dimorphisme sexuel traduit par des mâles plus grands a également été observé chez les ouvriers ainsi que chez les imagos, mais cette fois-ci traduit par des femelles plus grandes. De plus, il a été mis en évidence chez les pré-soldats et les soldats la présence de femelles uniquement, les soldats d'un seul sexe étant courants chez les Termitidae.

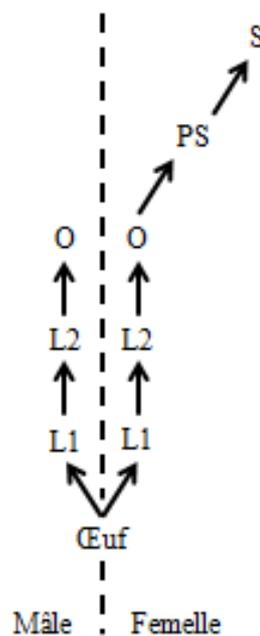


Figure 8 : Développement des castes neutres chez *E. chagresi* (d'après Roisin (1992)). L1 – L2 : stade larvaire 1 – 2, O : ouvrier, PS : pré-soldat, S : soldat.

1.3. *Embiratermes neotenicus*

L'espèce *Embiratermes neotenicus* (*Armitermes neotenicus*) a été décrite par Holmgren (1906). Les soldats sont caractérisés par une tête de couleur jaune « en forme de bouteille », un nasus allongé plus foncé de couleur rouille avec une partie apicale évasée et recouverte de soies courtes et de longues mandibules étroites et fortement courbées. Fontes (1985) reprend une observation faite par Mathews (1977) et décrit des soldats aux déplacements relativement lents qui se positionnent dans les zones d'ouverture du nid avec les mandibules et le nasus tournés vers l'extérieur. Ce dernier va libérer un fluide hautement volatile à l'approche d'un intrus. Les soldats peuvent également sortir du nid pour donner une morsure très efficace

grâce à leurs mandibules acérées, comportement également observé chez d'autres *Embiratermes* comme *E. festivellus* et *E. heterotypus* (Fontes, 1985, Mathews, 1977).

E. neotenicus est un termite humivore, l'un des plus abondants en forêt Amazonienne. Cette espèce est distribuée sur une grande partie de l'Amérique du Sud (Constantino, 1998) : Bolivie, Brésil, Guyane, Pérou, Suriname et Venezuela. Contrairement à la plupart des *Embiratermes* qui occuperaient le nid d'autres espèces, *E. neotenicus* construit lui-même des nids d'environ 50 cm de diamètre et de 30 cm de hauteur à la surface du sol ou contre la base des arbres à partir d'un mélange de sol et de matières organiques, ce qui leur donne une couleur sombre (Mathews, 1977) (Figure 9). Dans ses observations des nids d'*E. neotenicus*, Holmgren (Holmgren, 1906) décrit une absence systématique de reine primaire et la présence d'une centaine de femelles néoténiques physogastres accompagnées d'un seul roi primaire et sans roi néoténique. Cependant, dans d'autres nids observés par Mathews (Mathews, 1977) au Brésil, aucune reine néoténique n'a été trouvée.

2. Observations de terrain et objectifs généraux du chapitre

Au cours d'une mission menée en octobre 2012 sur le site de Petit Saut en Guyane, la dissection d'un grand nombre de nids d'*Embiratermes neotenicus* a confirmé l'observation d'Holmgren (1906) en révélant la présence d'un grand nombre de reproducteurs néoténiques, toutes femelles, avec un seul roi primaire et sans reine primaire (Figure 9). Toutes les femelles néoténiques présentes dans les nids ont été identifiées comme des nymphoïdes, sur la base de la présence de bourgeons alaires, et étaient presque toutes physogastres.

Ces observations, évoquant le phénomène de parthénogenèse, ont initié les recherches menées au cours de cette thèse et nous ont amenés à nous poser les questions suivantes : 1) la stratégie reproductive d'*Embiratermes neotenicus* implique-t-elle effectivement de la parthénogenèse ou une autre explication à la présence de ces femelles surnuméraires à la tête des colonies ?, 2) si la parthénogenèse était démontrée, pourrait-on parler de parthénogenèse facultative ou de système AQS, comme précédemment décrit chez les trois espèces de *Reticulitermes* (Luchetti *et al.*, 2013b, Matsuura *et al.*, 2009, Vargo *et al.*, 2012) ?, 3) si l'AQS était démontré de manière stable chez cette espèce, l'origine génétique de la parthénogenèse serait-elle la même que chez les *Reticulitermes* et pourrait-on observer les mêmes conséquences sur la structure génétique des colonies ?, 4) si l'AQS était démontré chez cette espèce, quel impact pourrait-il avoir sur le cycle de vie ?, et 5) comment ce système

de reproduction particulier, associé aux potentialités de dispersion de l'espèce, pourrait modeler la structure génétique des populations à l'échelle locale et participer à l'explication de son succès écologique ?



Figure 9 : Photographies prises sur le terrain. (a) et (b) nids d'*E. neotenicus*, intact et ouvert pour mettre en évidence la population, respectivement, (c) ouvriers (O) et soldats (S), (d) colonie jeune avec le couple primaire, reine primaire (RP ♀) et roi primaire (RP ♂), ouvriers et soldats et (e) colonie mature avec le roi primaire entouré de nombreuses femelles néoténiques (FN).

Les résultats de notre étude sur *E. neotenicus* seront présentés sous la forme de deux articles :

- **Article 1** « Asexual queen succession in the higher termite *Embiratermes neotenicus* », dans lequel nous avons étudié la structure génétique de dix colonies d'*E. neotenicus* échantillonnées sur le Site de Petit Saut en Guyane, à partir de marqueurs microsatellites, dans le but de démontrer l'existence de la stratégie AQS chez cette espèce et les modalités génétiques de la parthénogenèse.

- **Article 2** « Breeding strategy and fine-scale population genetic structure in the soil-feeding termite *Embiraetermes neotenicus* (Termitidae, Syntermitinae) », dans lequel nous avons étudié la stratégie de reproduction et la structuration génétique des populations de cette espèce à l'échelle locale, à travers l'analyse génétique de 41 colonies réparties sur le site de Petit Saut.

**Article 1: « Asexual queen succession in the higher termite
Embira termes neotenicus »**

Romain Fougeyrollas, Klára Dolejšová, David Sillam-Dussès,
Virginie Roy, Chantal Poteaux, Robert Hanus et Yves Roisin

iEES-Paris UMR 7618 ECOTERM, UFR des Sciences et Technologie
Université Paris-Est Créteil

Publié dans *Proceedings of the Royal Society B*.



Research

Cite this article: Fougeyrollas R, Dolejšová K, Sillam-Dussès D, Roy V, Poteaux C, Hanus R, Roisin Y. 2015 Asexual queen succession in the higher termite *Embiratermes neotenicus*. *Proc. R. Soc. B* **282**: 20150260. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2015.0260>

Received: 4 February 2015

Accepted: 30 April 2015

Subject Areas:

genetics, ecology, evolution

Keywords:

thelytokous parthenogenesis, breeding system, termites, Isoptera, Termitidae, reproductive strategies

Author for correspondence:

Robert Hanus

e-mail: robert@uochb.cas.cz

†These authors contributed equally to this study.

Electronic supplementary material is available at <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2015.0260> or via <http://rsob.royalsocietypublishing.org>.

Asexual queen succession in the higher termite *Embiratermes neotenicus*

Romain Fougeyrollas^{1,†}, Klára Dolejšová^{2,3,†}, David Sillam-Dussès^{4,5},
Virginie Roy¹, Chantal Poteaux⁵, Robert Hanus² and Yves Roisin⁶

¹IEES-Paris, Université Paris-Est Créteil, Créteil, France

²Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

³Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

⁴IEES-Paris, IRD—Sorbonne Universités, UMR 242, Bondy, France

⁵LEEC, EA4443, Université Paris 13—Sorbonne Paris Cité, Villetaneuse, France

⁶Evolutionary Biology and Ecology, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

Asexual queen succession (AQS), in which workers, soldiers and dispersing reproductives are produced sexually while numerous non-dispersing queens arise through thelytokous parthenogenesis, has recently been described in three species of lower termites of the genus *Reticulitermes*. Here, we show that AQS is not an oddity restricted to a single genus of lower termites, but a more widespread strategy occurring also in the most advanced termite group, the higher termites (Termitidae). We analysed the genetic structure in 10 colonies of the Neotropical higher termite *Embiratermes neotenicus* (Syntermitinae) using five newly developed polymorphic microsatellite loci. The colonies contained one primary king accompanied either by a single primary queen or by up to almost 200 neotenic queens. While the workers, the soldiers and most future dispersing reproductives were produced sexually, the non-dispersing neotenic queens originated through thelytokous parthenogenesis of the founding primary queen. Surprisingly, the mode of thelytoky observed in *E. neotenicus* is most probably automixis with central fusion, contrasting with the automixis with terminal fusion documented in *Reticulitermes*. The occurrence of AQS based on different mechanisms of ploidy restoration raises the hypothesis of an independent evolutionary origin of this unique reproductive strategy in individual lineages of lower and higher termites.

1. Introduction

Sexual reproduction is one of the greatest evolutionary inventions shaping life on the Earth. Yet, despite indisputable advantages, the sexual process has numerous drawbacks, including the costs related to mating and the dilution of an individual's genetic contribution to the next generation. Therefore, across a wide range of multicellular organisms, conditional or obligatory use of asexual reproduction complements the dominant role of sex [1,2]. Evidence accumulates that some social insects can also facultatively combine the best from both modes of reproduction [3,4]. One of the most remarkable mixed strategies alternating asexual and sexual reproduction was described a decade ago in *Cataglyphis* ants, in which the queens produce genetically diversified worker offspring sexually and new queens through thelytokous parthenogenesis [5]. In doing so, the queens maximize their own genetic contribution to the next generation of female reproductives while maintaining a desirable diversity in helpers. This discovery has prompted a number of studies confirming a similar reproductive system in several other ant species, and unravelling how the other players in ant colonies, the workers and the males, counteract the queen's genetic dominance (reviewed in [3,4]).

Despite the great evolutionary distance between eusocial hymenopterans and termites, an analogous reproductive strategy has recently been discovered in this second major group of social insects. First observed in the Japanese subterranean termite *Reticulitermes speratus* [6] and later confirmed in two other

Table 1. Castes observed and sampled in the 43 collected colonies.

	primary queen	primary king	neotenic queens	workers and soldiers	no. colonies	neotenic males (present/absent)	nymphs (present/absent)
	×	×		×	1	0/1	0/1
		×	×	×	12	6/6	11/1
			×	×	12	3/9	5/7
				×	18	0/18	3/15
no. colonies	1	13	24	43	43	9/34	19/24

species of this genus, North American *R. virginicus* [7] and European *R. lucifugus* [8], the so-called asexual queen succession (AQS) fascinates by its convergences with the similar breeding system in ants while still having specific and exclusive traits. The colonies are usually founded by a single pair of unrelated primary reproductives. However, at a certain stage of colony development, the founding primary queen produces up to several hundred non-dispersing neotenic queens through thelytokous parthenogenesis. These parthenogens develop from female nymphs, coexist for some time with their mother and mate with the present primary king to finally replace the primary queen upon her death. The other castes (i.e. workers, soldiers and winged dispersing males and females) are produced via sexual reproduction of the primary king with the present queen(s). The colony life cycle can then continue with further cycles of queen replacement by new generations of neotenic female parthenogens. The perpetuity of AQS cycles not only boosts the reproductive potential of the colonies with hundreds of queens instead of a single one, but also results in a virtual immortality of the founding primary queen since all fertile females in the colony bear only her genetic material [9]. Unlike in most thelytokous ants, which produce queen parthenogens through automixis with central fusion, the mode of thelytoky in *Reticulitermes* is automixis with terminal fusion and the parthenogenetic queens are almost completely homozygous [6–8]. Thus, though functionally analogous, AQS in ants and *Reticulitermes* termites is based on different cytological mechanisms.

The discovery of AQS in *Reticulitermes* raises the question of whether this reproductive strategy is just a singularity restricted to a few species of a single genus of lower termites or a more widespread phenomenon overlooked in the past. This question is relevant since neotenic reproductives occur in high numbers per colony in many other termite species [10]. Higher termites (Termitidae) are by far the most successful lineage of Isoptera in terms of abundance, species richness and ecological diversification. Breeding systems reported in the higher termites are diverse as well, including records of species with frequent occurrence of multiple neotenic [10]. These species are of special interest for the search for possible occurrence of AQS. In the present study, we investigated the colony structure, reproductive strategies and genetic constitution in the colonies of the Neotropical higher termite *Embiratermes neotenicus* Holmgren (Termitidae: Syntermitinae) using five newly developed polymorphic microsatellite markers. In this abundant humivorous species, multiple neotenic queens frequently accompany a single primary king [11], and thus *Embiratermes neotenicus* is a well-suited candidate for AQS in higher termites.

2. Material and methods

(a) Origin of colonies and sampling

Embiratermes neotenicus builds large epigeous nests from soil material, usually at bases of standing trees. In October 2012, May 2013 and March 2014, we collected 43 nests or nest fragments of *E. neotenicus* at 10 localities along the Petit Saut Road, French Guiana (N5°03.017'–5°07.202', W52°57.872'–53°03.196'), separated by 0.8–11 km. The colonies were brought to the research station Hydreco near Petit Saut dam and dissected. All reproductives found (primary kings, primary queen and neotenic) were scored, separated according to their sex under a stereomicroscope and stored in 96% ethanol. Along with the reproductives, workers, soldiers and nymphs (if present) were sampled in each colony. The reproductive structure of the sampled colonies is summarized in table 1. Species identity of each colony was confirmed to be *E. neotenicus* using DNA barcoding. The standard barcode gene, cytochrome oxidase I, was sequenced from one individual belonging to each of the 43 colonies and sequences were entered in the Barcode of Life Database (BOLD) identification system (www.barcodinglife.org). Four haplotypes (see Data accessibility section) were identified, sharing 99.4, 99.68, 100 and 99.84% identity with the sequence of reference for *E. neotenicus*.

(b) Development of microsatellite markers

Total genomic DNA was extracted from the thorax and abdomen of 20 workers from colony B, after removing the digestive tube. The tissues were pooled in four tubes, each containing five thoraces and five abdomens. Extractions were performed following Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit protocol with 30 min of final elution in 50 µl of distilled water. The development of microsatellite markers was performed by Genoscreen (France) using next-generation 454 GS-FLX titanium pyrosequencing of microsatellite-enriched DNA libraries [12]. Primer pairs were designed for 219 sequences from the total of 12 493 sequences with microsatellite motifs, and 23 primer pairs were selected *in silico*. Nine primer pairs were both biologically validated (i.e. successfully amplified from biological samples) and identified as polymorphic by Genoscreen. Among them, one locus showed an unusual pattern of distribution of allelic frequencies dependent on caste and/or sex and another showed a very weak amplification. Both were removed from further analysis.

One soldier (one worker in colony A) from each of the 43 colonies was genotyped at the seven remaining loci to avoid bias because of relatedness among individuals from the same colony. Monoplex PCRs were performed in a total volume of 12.5 µl containing 1 U FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostics), 1 × PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.24 mM dNTP mix, 0.4 µM of each forward and reverse primer, 1 µl (approx. 15 ng) DNA and PCR-grade water (q.s.). The following cycling conditions were used: an initial denaturing step at 95°C for 10 min; 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 s; annealing at



Figure 1. Photographs of *Embiratermes neotenicus* reproductives. (a) Primary king (PRIM K) and primary queen (PRIM Q) excavated from a small nest together with soldiers (SOLD) and workers (WORK). (b) Primary king (PRIM K) and numerous nymphoid neotenic queens (NEO Q) excavated from a large nest. (Online version in colour.)

55°C for 30 s; extension at 72°C for 60 s; and a final extension step at 72°C for 10 min. Genotyping was performed using an ABI PRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystems, genomic platform of IMRB, Mondor Institute, Créteil). Fragment lengths were manually checked on chromatograms to detect inconsistencies and genotypes were scored against the GeneScan-500 Liz Size Standard (Applied Biosystems) using GENEMARKER v. 2.6.3 software (SoftGenetics, State College, PA, USA).

GENEPOP on the Web [13,14] and GENETIX v. 4.05.2 software were used to estimate the number of alleles, expected and observed heterozygosities (H_E and H_O), and the fixation index (F_{IS} [15]). Eventual occurrence of linkage disequilibrium between each pair of loci was tested using log-likelihood ratio statistics in GENEPOP on the Web. To test the deviations from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE), we used GENEPOP on the Web and FSTAT v. 2.9.3.2 [16]. When appropriate, sequential Bonferroni correction for multiple tests was applied. Large allelic drop-outs, scoring errors because of stuttering and null alleles were determined using MICRO-CHECKER v. 2.2.3 [17].

(c) Genetic analysis

For the genetic analysis of colony structure, we selected a subset of 10 colonies: nine of them containing the primary king and neotenic queens, and the sole colony with the primary king and the primary queen (electronic supplementary material, table S1). The 10 colonies originated from six localities, and the distance between colonies ranged from 54 m to 11.3 km (electronic supplementary material, table S2). The primary king, the primary queen or 20 neotenic queens (60 in colony C), 20 workers and 20 soldiers (if available) from each of the 10 colonies were genotyped. Thirty-eight male and female nymphs of the fourth nymphal stage were genotyped from two colonies collected in May 2013 during the nymph production season (electronic supplementary material, table S1). Two PCR multiplexes were carried out using the Qiagen Multiplex PCR Plus kit in a final volume of 12.5 μ l containing 1 \times Qiagen Multiplex PCR Master Mix, 0.2 μ M primer mix and 10–175 ng template DNA. The same amplification conditions were applied to both multiplexes: an initial denaturation step at 95°C for 5 min followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, an annealing step at 60°C for 90 s and an extension step at 72°C for 30 s. The final extension was fixed to 68°C for 10 min.

Parental genotypes for all colonies were reconstructed from the genotypes of workers and soldiers using GERUD 2.0 [18] and COLONY v. 2.0.1.5 [19] programs and compared with the observed genotypes of available primary kings and queen. The observed genotype frequencies of workers and soldiers were then compared with the frequencies expected under Mendelian inheritance pattern of the parental reconstructed genotypes by

means of a log-likelihood ratio test (G-test) summed over loci. Relatedness [20] and F_{IC} and F_{IT} inbreeding coefficients *sensu* Thorne *et al.* [21] for the sterile castes were calculated using KIN-GROUP v. 2 [22] and FSTAT v. 2.9.3.2 [16] and compared with the values expected under different breeding structures—that is, simple (Mendelian) families and extended families (inbred groups containing more than two functional reproductives) [23].

Number of alleles and their distribution in the genotypes were scored in neotenic queens and nymphs with regard to the presence of paternal alleles and the Mendelian distribution of the reconstructed parental genotypes in order to conclude whether the neotenic queens and nymphs were produced sexually or by means of thelytokous parthenogenesis of the queen. To determine the mode of thelytoky responsible for the origin of neotenic parthenogens, we calculated the generational rate of transition to homozygosity for the loci heterozygous in the inferred mother and compared these values with those expected under different modes of thelytoky [24].

3. Results

(a) Field observations

We found the reproductives of at least one sex in 25 of the 43 colonies (table 1); we did not find reproductives in the other colonies, probably because they were deep underground where they are very difficult to collect. In a single colony, inhabiting a small round nest of approx. 15 cm in diameter, we found the primary queen accompanied by the primary king. The remaining 24 nests were larger and contained numerous nymphoid neotenic queens (figure 1). In 12 of these 24 nests, we succeeded in finding the primary king while in the remaining 12 colonies we did not find any king. A large majority of neotenic queens were highly physogastric, egg-laying, and seemingly of the same size and pigmentation, suggesting their simultaneous origin. Their number per colony ranged from 35 to 170. In a few colonies, one or several apparently younger, non-pigmented and non-physogastric neotenic females and males were found. Only the pigmented and physogastric neotenic females were selected for genotyping (table 1; electronic supplementary material, table S1). In a few rare cases, we directly observed the female nymphs of the fourth nymphal stage moulting into nymphoid neotenic with reduced wing pads, suggesting that the neotenic queens predominantly develop from the fourth nymphal stage.

Table 2. Newly developed polymorphic microsatellite markers. N_A , number of alleles; H_E , expected heterozygosity; H_O , observed heterozygosity; F_{IS} , inbreeding coefficient.

locus	motif	primer sequence (5'–3')	label	N_A	allele size range (bp)	H_E	H_O	F_{IS}
PCR multiplex 1								
En-05 ^a	(tgg) ₁₂	F : ACGCAGCAGTAGGTACAGGAA R : TCCAACCACAACCCTAGCA	PET	5	145–166	0.343	0.140	0.601
En-11	(ac) ₁₄	F : CCAACTCGTAGGTGTAGAGGAT R : CCGTCTCTTGTGAGTGTGTG	NED	7	158–170	0.510	0.488	0.053
PCR multiplex 2								
En-08	(ac) ₁₃	F : CTGAGCGGTTGCAGAGTACC R : TTCCCGGCCAAAGTACTAAC	6'FAM	3	157–169	0.399	0.349	0.137
En-10	(tg) ₁₄	F : CGTCCAGAAGATTCTACCG R : TCTCTACCTCGTCTGCCT	NED	7	103–135	0.697	0.744	–0.056
En-15	(ca) ₁₅	F : CGATGAGATCCGTAGACACC R : AACCTAGCACCTCATGC	NED	6	282–294	0.559	0.558	0.013
En-19	(tg) ₁₇	F : TACATTCAAATTAGTCTTGTCCT R : TTGGTCGAGCCTATCTGGTC	PET	6	177–195	0.579	0.605	–0.033
En-21 ^a	(tac) ₁₈	F : ACCATAACAATACTACTACTACTACT R : TCGTAACTAAGTGTGAATGTGAATTT	VIC	3	107–113	0.268	0.163	0.402

^aThese loci were not used for the analysis of colony genetic structure.

(b) Microsatellite characteristics

Five of the seven tested loci had di-nucleotide repeat motifs and two had tri-nucleotide repeats (table 2). Loci showed three to seven alleles across the 43 tested colonies. None of the 21 pairs of loci showed significant gametic disequilibrium ($p > 0.119$) except for the pair En-05/En-21 ($p = 0.0130$). Observed heterozygosities ranged from 0.140 to 0.744 and expected heterozygosities from 0.268 to 0.697. Mean observed heterozygosity was 0.435 (s.d. = 0.228). Two loci, En-05 and En-21, showed significant heterozygote deficit when exact p -values were estimated by the Markov chain method ($p < 0.05$). None of the loci showed significant heterozygote excess or deficit after Bonferroni correction for multiple comparisons. MICRO-CHECKER analyses indicated that the population was possibly in HWE, with loci En-05 and En-21 showing signs of a null allele (frequency = 0.23 and 0.14, respectively). We did not detect any evidence of scoring error because of large allelic dropouts. However, an excess of large homozygote classes at the locus En-05 indicated stuttering. Therefore, the loci En-05 and En-21 were excluded from the genetic analysis of colony structure and the analysis was carried out using the remaining five loci.

(c) Colony genetic structure

In soldiers and workers of all 10 colonies, we observed a maximum of four alleles and four different genotypes at each locus (electronic supplementary material, table S3). A single pair of reproductives in each colony was identified by the parental analysis for each locus (electronic supplementary material, table S3). The genotypes of sampled primary kings and queens always matched with those proposed by the reconstruction; thus, inferred and genotyped kings and queens referred to the same individuals. Since one or both primary reproductives were known and genotyped in all colonies, we

were able to reconstruct the parental genotypes with high exclusion probabilities (p_{ex} for one parent known for all loci = 0.858; p_{ex} for parent pairs known for all loci = 0.966) and high probabilities of a correct assignment of paternal and maternal genotypes. For colonies with a known primary king and an inferred primary queen, the primary king had probabilities of reconstructed genotypes ranging from 0.993 to 1 and the inferred primary queen from 0.992 to 1. For the colony J with a known pair of primary reproductives, these values were equal to 1. The distribution of paternal and maternal alleles in the genotypes of the sterile castes was consistent with Mendelian distribution (G-test summed over loci: $p = 0.278$ –0.990). The negative value of within-colony inbreeding ($F_{IC} = -0.326$, 95% CI, -0.437 to -0.218) was not significantly different from the value expected for simple families with a pair of monogamous reproductives [23]. The F_{IT} value (0.112, 95% CI, 0.056–0.177) indicated a significant level of inbreeding at the population level. The relatedness among the workers and soldiers in all colonies ($r = 0.575$) did not differ significantly from 0.5, a value expected for full siblings. All these observations suggest that the 10 studied colonies were founded as simple families by a pair of related primary reproductives and that the sterile castes were produced sexually.

In neotenic queens (219 genotyped individuals from nine colonies), we observed a maximum of two alleles and a maximum of three different genotypes per locus in each colony (electronic supplementary material, table S3). The neotenic queens always contained either both alleles of their mother in a heterozygous combination or one of the maternal alleles in a homozygous combination. By contrast, exclusively paternal alleles were never observed in the genotypes of neotenic queens. This suggests that the neotenic queens were produced asexually, through thelytokous parthenogenesis of their mothers.

Genotypes of nymphs indicated their mixed reproductive origin. Male nymphs showed a pattern similar to that of

Table 3. Transitions to homozygosity in parthenogenetic neotenic daughters for loci heterozygous in the inferred genotype of the founding primary queen. PQ_{HET} , number of inferred primary queens heterozygous at the locus; NF_{TOT} , number of neotenic parthenogenetic daughters from a heterozygous mother; NF_{HOMO} , number of homozygous neotenic daughters at the locus; R , observed rate of transition to homozygosity corresponding to the proportion of homozygous neotenic daughters) produced by heterozygous mothers; r , expected generational rate of transition to homozygosity; n.s., not significant.

locus	PQ_{HET}	NF_{TOT}	NF_{HOMO}	R	automixis				
					apomixis ($r = 0$)	gamete duplication ($r = 1$)	terminal fusion ($r = 0.33 - 1$)	central fusion ($r = 0 - 0.33$)	random fusion ($r = 0.33$)
En-11	7	180	3	0.02	***	***	***	n.s.	***
En-10	3	60	1	0.02	***	***	***	n.s.	***
En-08	4	119	10	0.08	***	***	***	n.s.	***
En-19	3	60	1	0.02	***	***	***	n.s.	***
En-15	3	60	3	0.05	***	***	***	n.s.	***

*** χ^2 -test, $p < 0.001$. When r is within a range of values, the value closest to the observed R was used for the test.

workers and soldiers, with a maximum of three alleles and four different genotypes at each locus in each colony, and a Mendelian distribution of alleles, indicating that they were sexually produced (electronic supplementary material, table S3). Genotypic patterns of female nymphs were more complex: while most of them were carrying parental alleles in a Mendelian distribution, six out of 18 females showed genotypes unexpected under sexual reproduction, with paternal alleles lacking at all loci. In other words, the samples of female nymphs contained individuals produced sexually as well as parthenogens of the queen(s) (electronic supplementary material, table S3).

(d) Restoration of ploidy

The relatednesses among the parthenogenetic neotenic queens ($r = 0.982$) and between the parthenogens and their inferred mothers ($r = 0.991$) were dramatically different from the value 0.5 expected under sexual origin of the neotenic. The parthenogenetic queens were not almost exclusively homozygous at all loci, as has been reported in the case of *Reticulitermes* [6–8]. Instead, we observed a high rate of conservation of heterozygosity in the parthenogens for the loci that were heterozygous in the inferred maternal genotypes, indicating that a different mode of thelytoky occurs in *E. neotenicus*. The rates of transition to homozygosity (R), listed in table 3, ranged from 2 to 8% for the five studied loci. These rates were consistent with the values expected under automixis with central fusion, a process yielding heterozygous genotypes when recombination is absent and homozygous genotypes only when recombination takes place.

4. Discussion

In this study, we demonstrate the occurrence of AQS in the higher termite *Embiratermes neotenicus* from the Neotropical subfamily Syntermitinae. This exceptional reproductive strategy, in which the queens combine sexual reproduction to produce the sterile castes and dispersing reproductives with asexual reproduction to produce non-dispersing neotenic queens, had previously been documented only in three species of a single genus of lower termites, the genus *Reticulitermes* [6–8].

We also have data suggesting that AQS occurs in another higher termite, *Cavitermes tuberosus* (Termitinae) [25].

The discovery of AQS in *Embiratermes* and *Cavitermes* adds to the list of breeding systems observed in the higher termites. The evolution of extreme queen physogastry and a lifelong monogamy of a single pair of primary reproductives are the dominant aspects of reproduction in most higher termites [10]. AQS may appear to be an antipode of the monogamy, with multiple queens participating in the reproduction of the colony. However, functionally, AQS represents an extension of the monogamous situation that goes even further in enhancing the reproductive potential of the founding primary queen; not only is the queen physogastric, but she also multiplies the transmission of her genes and the colony growth rate by the production of up to hundreds of highly related parthenogens, replacing her after her death in a virtually everlasting life cycle. At the same time, the production of parthenogens prevents inbreeding in subsequent generations of offspring that would arise from the mating of sexually produced neotenic queens with their own father or brothers, and thus conserves a high genetic diversity of helpers and dispersing reproductives. It is difficult to make direct inferences on how the AQS contributes to the ecological success of individual species. Nevertheless, it is noteworthy that *Embiratermes neotenicus* is often ranked among the most abundant Neotropical termite species in terms of colony sizes (up to over half a million individuals), local abundances and widespread distribution (throughout the entire Amazon basin and Guianas) [26–28].

In all 10 genotyped colonies, the gene pool appeared to come from a single pair of primary reproductives paired after the dispersal flight. All sterile individuals, workers and soldiers, were produced sexually by the mating of the primary king with the primary queen or her parthenogenetic daughters. Most of the fourth-stage male and female nymphs collected before the swarming season appeared to be sexually produced, while only six female nymphs were unambiguously described as parthenogenetic. Since the neotenic queens develop from the fourth nymphal stage, it is impossible to decide whether these six individuals were destined to become winged reproductives or neotenic queens.

Remarkably, the parthenogenetic queens were not produced through automixis with terminal fusion, yielding practically

perfect homozygotes at all loci, as documented in all three cases of AQS in *Reticulitermes* as well as in *Cavitermes tuberosus* [25]. On the contrary, the neotenic parthenogens showed a very low generational rate of transition to homozygosity (2–8%) for the loci heterozygous in their inferred mothers. Thus, thelytoky in *E. neotenicus* is based on a different cytological mechanism, not yet reported in termites. The observed frequencies of transition to homozygosity are consistent with automixis with central fusion, a mechanism of thelytoky reported in some social Hymenoptera (i.e. ants and Cape honeybees) [3,4]. In some of these hymenopterans, the central fusion is accompanied by a reduced rate of recombination and a practically complete conservation of heterozygosity. It is not the case in *E. neotenicus*, in which the rates of transition to homozygosity differ among loci and appear to reflect different probabilities of recombination events for each locus, depending on its position on the chromosome.

The reduction of heterozygosity in parthenogenetic queens of *E. neotenicus* is much lower than that in *Reticulitermes* parthenogens. Yet the gradual increase in homozygosity of neotenic queens across eventual multiple cycles of AQS within a single colony may have an impact on the fitness of the parthenogens. Nevertheless, it is believed that the costs related to homozygosity are relatively low in philopatrically reproducing queens that do not disperse and are continuously assisted by helpers when compared with winged dispersing forms undergoing independent colony foundation [10,24]. In addition, the systematic occurrence of parthenogenesis over long time scales would lead to a rapid purging of deleterious alleles through non-viable parthenogens on loci with a high probability of recombination, yielding homozygous genotypes [29].

Except for a single nest, very small in size and headed by the primary reproductives, all inspected colonies in which we succeeded in finding the reproductives contained multiple neotenic queens. This suggests that the replacement of the primary queen by its parthenogens is a non-accidental event and that it takes place early in the colony life cycle. The observations on the life cycle of *Reticulitermes speratus* indicate that between the occurrence of parthenogens and the death of the primary queen there is a transition stage during which the neotenic coexist with their mother and reproduce [7,10]. We did not observe such a transition stage in *E. neotenicus*, probably due to the lack of intermediary nests in our sampling. Paternal genotype reconstructions unambiguously indicated that the sampled primary kings were the fathers of sterile castes, suggesting that the rare non-pigmented neotenic males found in some nests did not intervene significantly in the reproduction of the colonies as long as the primary king was present. Therefore, given the theoretical lifespan reported for primary reproductives in some higher termites [30] and our observations of active primary kings in very large colonies, this stage of colony development may last for a long time and the takeover of reproduction by the neotenic kings may be rare.

While the presence of AQS in *E. neotenicus* was expected from the striking similarities between the breeding structures of this species and those of *Reticulitermes speratus*, the use of two different cytological mechanisms of parthenogenesis in different termite taxa is astonishing. A question therefore arises of whether the occurrence of AQS in individual lineages of lower and higher termites represents independent evolutionary events. Whatever is the correct answer, another intriguing question concerns the selection pressures favouring AQS given the dramatic ecological differences between xylophagous *Reticulitermes* termites from temperate regions on the one hand and tropical humivorous *Embiratermes* on the other hand. Vice versa, a number of closely related species with similar ecology unambiguously lack AQS, such as several *Reticulitermes* species [8,31] and *Labiatermes labralis*, a humivorous syntermite sympatric with *E. neotenicus* [32]. At the same time, it must be noted that rigorous studies on the breeding systems of termites with large colony populations are scarce, especially in tropical humivorous species. Therefore, practically no data are available for other species of the genus *Embiratermes*, for instance. Moreover, the use of genetic markers to infer the breeding structure solely from the genotypes of workers or soldiers may be misleading and may indicate a simple family even in colonies with AQS.

In conclusion, along with the first descriptions of AQS in two unrelated genera of higher termites, *Embiratermes* and *Cavitermes*, a vast array of questions emerges that should be answered in the future, starting from an extensive survey of the occurrence of AQS and its cytological mechanisms across different subfamilies of Termitidae, to comparative analyses of ecological determinants correlated with the presence of AQS. Undoubtedly, new discoveries on the breeding systems of higher termites are to be expected, adding to the complexity of reproductive strategies of the oldest eusocial insects.

Data accessibility. The characteristics of the newly developed microsatellite markers, primer combinations used in the multiplexes and the genotypic frequencies observed in the studied colonies are included in table 2 and electronic supplementary material, table S3 of this article. COI haplotype sequences have been deposited in GenBank under accession numbers KP769532–35 and in Dryad Digital Repository under doi:10.5061/dryad.2t99d.

Authors' contributions. V.R., Y.R., D.S.-D., R.H. and C.P. designed the study, K.D., R.F., R.H., Y.R. and D.S.-D. collected the material, and R.F., V.R. and D.S.-D. analysed the genetic structure of colonies. All authors contributed significantly to the text of the manuscript and approved the final version.

Competing interests. We declare we have no competing interests.

Funding. This research was funded by the Belgian National Fund for Scientific Research (FRFC grant 2.4594.12), the Czech Science Foundation (14-12774S), the Grant Agency of the Charles University in Prague (580413) and the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, AS CR (RVO: 61388963).

Acknowledgements. We are grateful to P. Cerdan and the staff of the Laboratoire Environnement HYDRECO of Petit Saut (EDF-CNEH) for logistic support, to Prof. Evelyne Garnier-Zarli for academic support, and to Sophie Frechault and Marjorie Labédan for technical help. We thank two anonymous referees for their helpful suggestions.

References

1. Bell G. 1982 *The masterpiece of nature: the evolution and genetics of sexuality*. Berkeley, CA: University of California Press.
2. Schön I, Martens K, van Dijk P. 2009 *Lost sex: the evolutionary biology of parthenogenesis*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
3. Wenseleers T, Van Oystaeyen A. 2011 Unusual modes of reproduction in social insects: shedding light on the evolutionary paradox

- of sex. *BioEssays* **33**, 927–937. (doi:10.1002/bies.201100096)
4. Rabeling C, Kronauer DJ. 2013 Thelytokous parthenogenesis in eusocial Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* **58**, 273–292. (doi:10.1146/annurev-ento-120811-153710)
 5. Pearcy M, Aron S, Doums C, Keller L. 2004 Conditional use of sex and parthenogenesis for worker and queen production in ants. *Science* **306**, 1780–1783. (doi:10.1126/science.1105453)
 6. Matsuura K, Vargo EL, Kawatsu K, Labadie PE, Nakano H, Yashiro T, Tsuji K. 2009 Queen succession through asexual reproduction in termites. *Science* **323**, 1687. (doi:10.1126/science.1169702)
 7. Vargo EL, Labadie PE, Matsuura K. 2012 Asexual queen succession in the subterranean termite *Reticulitermes virginicus*. *Proc. R. Soc. B* **279**, 813–819. (doi:10.1098/rspb.2011.1030)
 8. Luchetti A, Velonà A, Mueller M, Mantovani B. 2013 Breeding systems and reproductive strategies in Italian *Reticulitermes* colonies (Isoptera: Rhinotermitidae). *Insectes Soc.* **60**, 203–211. (doi:10.1007/s00040-013-0284-8)
 9. Matsuura K. 2011 Sexual and asexual reproduction in termites. In *Biology of termites: a modern synthesis* (eds DE Bignell, Y Roisin, N Lo), pp. 255–277. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
 10. Myles TG. 1999 Review of secondary reproduction in termites (Insecta: Isoptera) with comments on its role in termite ecology and social evolution. *Sociobiology* **33**, 1–91.
 11. Holmgren N. 1906 Studien über südamerikanische Termiten. *Zool. Jahrb.* **23**, 521–676.
 12. Malausa T *et al.* 2011 High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Mol. Ecol. Resour.* **11**, 638–644. (doi:10.1111/j.1755-0998.2011.02992.x)
 13. Raymond M, Rousset F. 1995 GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* **86**, 248–249.
 14. Rousset F. 2008 GENEPOP'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* **8**, 103–106. (doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x)
 15. Weir BS, Cockerham CC. 1984 Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358–1370. (doi:10.2307/2408641)
 16. Goudet J. 2001 *FSTAT, version 2.9.3, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices*. Lausanne, Switzerland: Lausanne University.
 17. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P. 2004 MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* **4**, 535–538. (doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x)
 18. Jones AG. 2005 GERUD 2.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. *Mol. Ecol. Notes* **5**, 708–711. (doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01029.x)
 19. Jones OR, Wang J. 2010 COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol. Ecol. Resour.* **10**, 551–555. (doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02787.x)
 20. Queller DC, Goodnight KF. 1989 Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* **43**, 258–275. (doi:10.2307/2409206)
 21. Thorne BL, Traniello JFA, Adams ES, Bulmer M. 1999 Reproductive dynamics and colony structure of subterranean termites of the genus *Reticulitermes* (Isoptera Rhinotermitidae): a review of the evidence from behavioral, ecological, and genetic studies. *Ethol. Ecol. Evol.* **11**, 149–169. (doi:10.1080/08927014.1999.9522833)
 22. Konovalov DA, Manning C, Henshaw MT. 2004 KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Mol. Ecol. Notes* **4**, 779–782. (doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00796.x)
 23. Bulmer MS, Adams ES, Traniello JFA. 2001 Variation in colony structure in the subterranean termite *Reticulitermes flavipes*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **49**, 236–243. (doi:10.1007/s002650000304)
 24. Pearcy M, Hardy O, Aron S. 2006 Thelytokous parthenogenesis and its consequences on inbreeding in an ant. *Heredity* **96**, 377–382. (doi:10.1038/sj.hdy.6800813)
 25. Roisin Y, Hanus R, Fournier D. 2014 Asexual queen succession in soil-feeding termites (*Cavitermes tuberosus*). In *17th Congress of IUSSI*, 13–18 July 2014, Cairns, Queensland, Australia. See <http://hdl.handle.net/2123/11069>.
 26. Vasconcellos A. 2010 Biomass and abundance of termites in three remnant areas of Atlantic Forest in northeastern Brazil. *Rev. Bras. Entomol.* **54**, 455–461. (doi:10.1590/S0085-56262010000300017)
 27. Constantino R. 1992 Abundance and diversity of termites (Insecta: Isoptera) in two sites of primary rain-forest in Brazilian Amazonia. *Biotropica* **24**, 420–430. (doi:10.2307/2388613)
 28. Constantino R. 1998 Catalog of the living termites of the New World. *Arq. Zool. S. Paulo* **35**, 135–231. (doi:10.11606/issn.2176-7793.v35i2p135-230)
 29. Charlesworth D, Willis JH. 2009 The genetics of inbreeding depression. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 783–796. (doi:10.1038/nrg2664)
 30. Thorne BL, Breisch NL, Haverly MI. 2002 Longevity of kings and queens and first time of production of fertile progeny in dampwood termite (Isoptera; Termitidae; *Zootermopsis*) colonies with different reproductive structures. *J. Anim. Ecol.* **71**, 1030–1041. (doi:10.1046/j.1365-2656.2002.00666.x)
 31. Vargo EL, Husseneder C. 2011 Genetic structure of termite colonies and populations. In *Biology of termites: a modern synthesis* (eds DE Bignell, Y Roisin, N Lo), pp. 321–347. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
 32. Dupont L, Roy V, Bakkali A, Harry M. 2009 Genetic variability of the soil-feeding termite *Labiatermes labralis* (Termitidae, Nasutitermitinae) in the Amazonian primary forest and remnant patches. *Insect Conserv. Divers.* **2**, 53–61. (doi:10.1111/j.1752-4598.2008.00040.x)

Table S1. List of genotyped individuals from ten selected colonies

Colony	Locality	GPS	Date	Primary queen	Neotenic queens ^a	Primary king	Workers	Soldiers	Nymphs (♂/♀)
A	a	N5°04.067' W52°58.773'	1/10/2012	-	20 (100)	1	15	0	-
B	b	N5°04.584' W53°01.356'	4/10/2012	-	20 (64)	1	20	18	-
C	b	N5°04.568' W53°01.309'	7/10/2012	-	60 (71)	1	14	15	-
D	c	N5°04.514' W52°58.104'	12/5/2013	-	19 (128)	1	20	15	-
E	c	N5°04.502' W52°58.404'	16/5/2013	-	20 (130)	1	19	20	10/8
F	c	N5°04.534' W52°58.436'	18/5/2013	-	20 (120)	1	20	20	10/10
G	d	N5°05.331' W52°57.872'	5/3/2014	-	20 (44)	1	20	20	-
H	e	N5°04.135' W53°03.196'	6/3/2014	-	20 (44)	1	20	20	-
I	e	N5°04.163' W53°03.188'	8/3/2014	-	20 (35)	1	20	20	-
J	f	N5°07.202' W52°57.924'	17/5/2013	1	-	1	20	11	-

^a Numbers in parentheses represent mature neotenic queens found in the colony

Table S2. Distances separating the ten selected colonies (km)

Colony	B	C	D	E	F	G	H	I	J
A	4.9	4.8	1.5	1.1	1.1	2.9	8.2	8.2	6.0
B		0.092	5.8	5.5	5.4	6.6	3.5	3.5	8.0
C			5.7	5.4	5.3	6.5	3.6	3.6	7.9
D				0.423	0.446	1.4	9.2	9.2	4.8
E					0.084	1.8	8.9	8.9	5.1
F						1.8	8.8	8.8	5.0
G							10.1	10.1	3.5
H								0.054	11.3
I									11.2

Table S3. Genotypes recorded in ten studied colonies of *E. neotenicus*

Exclusive paternal alleles in bold, genotypes unexpected under sexual reproduction in italics.

Colony	Caste	Locus				
		En-11	En-10	En-08	En-19	En-15
A	primary queen (inferred)	162/166	103/113	157/167	191/193	286/286
	primary king (inferred/genotyped)	162/162	103/103	157/167	177/189	286/286
	workers/soldiers - alleles	2	2	2	4	1
	genotypes (15)	162/166	103/113	157/167	177/191	286/286
		162/162	103/103	167/167	177/193	
				157/157	189/191	
					189/193	
	neotenic females - alleles	2	2	2	2	1
	genotypes (20)	162/166	103/113	157/167	<i>191/193</i>	286/286
			103/103		<i>191/191</i>	

Colony	Caste	Locus				
		En-11	En-10	En-08	En-19	En-15
B	primary queen (inferred)	158/162	111/115	169/169	193/193	284/286
	primary king (inferred/genotyped)	162/ 170	103/109	157/169	193/193	286/286
	workers/soldiers - alleles	3	4	2	1	2
	genotypes (38)	162/ 170	109/111	169/169	193/193	286/286
		158/162	109/115	157/169		284/286
		162/162	103/111			
		158/ 170	103/115			
	neotenic females - alleles	2	2	1	1	2
	genotypes (20)	158/162	<i>111/115</i>	169/169	193/193	284/286
						<i>284/284</i>

Colony	Caste	Locus				
		En-11	En-10	En-08	En-19	En-15
C	primary queen (inferred)	162/166	103/103	157/167	193/193	286/286
	primary king (inferred/genotyped)	164/166	103/ 115	157/157	193/193	284/286
	workers/soldiers - alleles	3	2	2	1	2
	genotypes (29)	166/166	103/ 115	157/167	193/193	284/286
		162/166	103/103	157/157		286/286
		164/166				
		162/ 164				
	neotenic females - alleles	2	2	2	1	1
	genotypes (60)	162/166	103/103	157/167	193/193	286/286
		<i>162/162</i>		<i>167/167</i>		
				157/157		

Fougeyrollas et al. Asexual queen succession in higher termites.
ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Colony	Caste	Locus				
		En-11	En-10	En-08	En-19	En-15
D	primary queen (inferred)	162/162	113/113	157/167	193/193	286/286
	primary king (inferred/genotyped)	158/166	111/113	157/ 171	193/ 197	286/286
	workers/soldiers - alleles	3	2	3	2	1
	genotypes (35)	158/162	113/113	157/157	193/ 197	286/286
		162/ 166	111/113	157/167	193/193	
				157/ 171		
				167/ 171		
	neotenic females - alleles	2	1	2	1	1
	genotypes (19)	162/162	113/113	157/167	193/193	286/286
				157/157		

Colony	Caste	Locus				
		En-11	En-10	En-08	En-19	En-15
E	primary queen (inferred)	162/162	103/103	157/157	177/177	292/292
	primary king (inferred/genotyped)	162/ 166	113/113	157/157	193/193	286/292
	workers/soldiers - alleles	2	2	1	2	2
	genotypes (39)	162/162	103/ 113	157/157	177/ 193	292/292
		162/ 166				286/292
	neotenic females - alleles	1	1	1	1	1
	genotypes (20)	162/162	103/103	157/157	177/177	292/292
	nymphs females - alleles	2	2	1	2	2
	genotypes (8)	162/162	103/ 113	157/157	177/ 193	292/292
		162/ 166	103/103		177/177	286/292
	nymphs males - alleles	2	2	1	2	2
	genotypes (10)	162/162	103/ 113	157/157	177/ 193	292/292
		162/ 166				286/292

Fougeyrollas et al. Asexual queen succession in higher termites.
ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Colony	Caste	Locus				
		En-11	En-10	En-08	En-19	En-15
F	primary queen (inferred)	162/166	103/103	157/167	193/195	286/286
	primary king (inferred/genotyped)	158/162	113/115	157/167	191/193	286/286
	workers/soldiers - alleles	3	3	2	3	1
	genotypes (40)	158/162	103/ 115	167/167	193/195	286/286
		162/166	103/ 113	157/167	191/195	
		158/166		157/157	193/193	
		162/162			191/193	
	neotenic females - alleles	2	1	2	2	1
	genotypes (20)	162/166	103/103	157/167	193/195	286/286
	nymphs females - alleles	3	3	2	3	1
	genotypes (10)	162/166	103/ 115	167/167	193/195	286/286
		158/166	103/ 113	157/167	191/195	
		158/162	103/103	157/157	193/193	
					191/193	
nymphs males - alleles	3	3	2	3	1	
genotypes (10)	158/166	103/ 115	167/167	191/195	286/286	
	162/162	103/ 113	157/167	193/193		
	162/166		157/157	191/193		

Colony	Caste	Locus				
		En-11	En-10	En-08	En-19	En-15
G	primary queen (inferred)	162/166	103/103	157/157	191/193	284/286
	primary king (inferred/genotyped)	162/166	103/103	169/169	193/195	286/ 292
	workers/soldiers - alleles	2	1	2	3	3
	genotypes (40)	162/166	103/103	157/ 169	191/193	286/286
		162/162			193/ 195	284/ 292
		166/166			191/ 195	284/286
					193/193	286/ 292
	neotenic females - alleles	2	1	1	2	2
	genotypes (20)	162/166	103/103	157/157	191/193	284/286
		162/162				

Fougeyrollas et al. Asexual queen succession in higher termites.
ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Colony	Caste	Locus				
		En-11	En-10	En-08	En-19	En-15
H	primary queen (inferred)	162/164	113/113	157/157	177/177	286/292
	primary king (inferred/genotyped)	162/162	113/113	157/157	191/193	284/286
	workers/soldiers - alleles	2	1	1	3	3
	genotypes (40)	162/162	113/113	157/157	177/ 193	286/286
		162/164			177/ 191	286/292
						284/292
						284/286
	neotenic females - alleles	2	1	1	1	2
	genotypes (20)	162/164	113/113	157/157	177/177	286/292
						292/292

Colony	Caste	Locus				
		En-11	En-10	En-08	En-19	En-15
I	primary queen (inferred)	162/166	113/135	157/157	193/193	292/292
	primary king (inferred/genotyped)	162/ 170	103/117	157/ 169	193/193	286/292
	workers/soldiers - alleles	3	4	2	1	2
	genotypes (40)	162/162	117/135	157/157	193/193	292/292
		166/ 170	103/135	157/ 169		286/292
		162/166	113/ 117			
		162/ 170	103/113			
	neotenic females - alleles	2	2	1	1	1
	genotypes (20)	162/166	113/135	157/157	193/193	292/292

Colony	Caste	Locus				
		En-11	En-10	En-08	En-19	En-15
J	primary queen (inferred/genotyped)	162/162	103/119	157/167	193/193	284/286
	primary king (inferred/genotyped)	162/162	103/ 113	157/ 169	193/193	286/ 288
	workers/soldiers - alleles	1	3	3	1	3
	genotypes (31)	162/162	113/119	167/ 169	193/193	284/286
			103/ 113	157/167		286/ 288
			103/119	157/ 169		286/286
			103/103	157/157		284/ 288

Article 2: « Breeding strategy and fine-scale population genetic structure in the soil-feeding termite *Embira termes neotenicus* (Termitidae, Syntermitinae) »

Romain Fougeyrollas, Robert Hanus, David Sillam-Dussès, Yves Roisin et Virginie Roy

iEES-Paris UMR 7618 ECOTERM, UFR des Sciences et Technologie
Université Paris-Est Créteil

En préparation

Breeding strategy and fine-scale population genetic structure in the soil-feeding termite *Embiratermes neotenicus* (Termitidae, Syntermitinae)

Romain Fougeyrollas¹, Robert Hanus^{2,3}, David Sillam-Dussès^{4,5}, Yves Roisin⁶, Virginie Roy¹

¹*Université Paris-Est Créteil, Université Pierre et Marie Curie, CNRS, INRA, IRD, Université Paris-Diderot, iEES-Paris, 61avenue du Général de Gaulle, 94000 Créteil, France*

²*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic*

³*Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic*

⁴*Sorbonne Universités, IRD, Université Paris-Est Créteil, Université Pierre et Marie Curie, CNRS, INRA, Université Paris-Diderot, iEES-Paris, Bondy, France*

⁵*LEEC, EA4443, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Villetaneuse, France*

⁶*Evolutionary Biology and Ecology, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium*

Short title: Breeding strategy in *Embiratermes neotenicus*

Corresponding author: Virginie Roy, Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris, Université Paris-Est Créteil, Faculté des Sciences et Technologie, 61 avenue du Général de Gaulle, 94000 Créteil, France. Email: roy@u-pec.fr, Telephone number: 00 33 1 45 17 15 07

Abstract

In eusocial insects e.g. ants, wasps, bees or termites, factors underlying the colony breeding structure such as mode of dispersal and level of inbreeding have a major impact on population genetic structure. Molecular studies suggested that population viscosity was rare in termites, and that reproductive individuals flew far enough to promote outbreeding between conspecific nests. However these studies were mainly devoted to subterranean xylophagous species and did not cover the whole ecological spectrum of termite diversity. In particular, soil-feeding termites have always been described as poor dispersers and re-colonizers even though this hypothesis was rarely supported by genetic data. In this study, we investigated the reproductive structure and dispersal strategies of *Embiratermes neotenicus* (Termitidae, Syntermitinae), a very common soil-feeding species in Neotropical forests, using nine microsatellite loci. We showed that all 41 sampled colonies originated from a single pair of primary reproductives, the primary queen being commonly replaced by highly related parthenogenetic daughters at an early stage of the colony life cycle. The mean inbreeding coefficient of *E. neotenicus* sterile castes was slightly different from that expected for the offspring of a totally outbred pair of reproductives. In the absence of isolation by distance and with only little genetic differentiation at a spatial scale of 10 km, these results can be explained by very occasional matings between related alates, partner mate choice and/or rare contribution of neotenic males to offspring. Dispersal abilities of the soil-feeder *E. neotenicus* seem to be similar to those described in subterranean xylophagous species, at least in natural and undisturbed habitats.

Key words: *Embiratermes*, soil-feeding termites, breeding system, dispersal, microsatellites

Introduction

Some aspects of animal populations, such as dispersion, breeding strategies and social structure, are particularly studied by behavioral ecologists and population biologists, because of their crucial impact on the genetic structure of natural populations (Sugg et al., 1996). In social groups, the knowledge of kin composition and breeding system (i.e. number, relatedness and contribution to offspring of reproductive individuals) underlying kin composition, is essential to the comprehension of the distribution of genetic variation at colonial, local and regional scales (Ross, 2001). Indeed the growing interest for the study of breeding systems in social insects has allowed addressing fundamental questions such as evolution of sociality, population structuration or speciation (Ross, 1993, Ross and Keller, 1995).

In eusocial termites (Blattodea: Termitoidae), colony and population genetic structure is closely linked to dispersal abilities and modalities of imagoes. The main strategy to settle new colonies in this group is based on the swarming of reproductive individuals, which fly away from their natal nest to form bisexual mating pairs, following a tandem running behavior. Mass swarming flights occur once to twice a year, over a period of a few days to several weeks, and are generally synchronized by environmental factors over distances of several hundred kilometers. These factors are primarily meteorological, such as rain, light intensity, temperature, humidity, wind and atmospheric pressure (Martius, 2003, Nutting, 1969). Synchronization between conspecific nests appears to be determinant to maintain outbreeding between mating partners.

Relatively few experimental data describe swarming flight distance and/or height. Termites in general, and particularly some feeding groups such as soil-feeders, are described as weak dispersers and re-colonizers in case of habitat disturbance (Eggleton and Tayasu, 2001, Gathorne-Hardy et al., 2000, Nutting, 1969). According to Eggleton and Tayasu (2001), alate dispersal seems to decline along the feeding group humification gradient. However genetic data are too scarce or focus on too restricted ecological groups to confirm this theory. In their review of small-scale genetic structuration (i.e. a spatial scale < 10 km), Vargo and Husseneder (2011) reported that xylophagous subterranean species rarely showed population viscosity and restricted gene flow. Soil-feeding termites were expected to best support the hypothesis of isolation by distance, but the sole fine-scale analysis realized in this group i.e. in *Cavitermes tuberosus* did not show any viscosity at a scale of 500 m (Fournier et al., 2016).

Most of the molecular studies describing breeding systems of xylophagous termites showed that colony founding pairs were not genetically related, although some differences could exist within and between species (Vargo and Husseneder, 2011). In soil-feeding termites, reproductive pairs seemed to be very slightly related (Dupont et al., 2009, Fougeyrollas et al., 2015, Fournier et al., 2016), with nonetheless a significant effect of habitat disturbance on this parameter in *Labiotermes labralis* (Dupont et al., 2009). In addition to restricted dispersal abilities of alates, selective choice of mating partners was also evoked to explain relatedness between primary reproductives. An active mechanism of partner choice is based on kin recognition i.e. the ability to discriminate conspecific individuals which differ by their genetic relatedness (Michener and Smith, 1987, Smith and Breed, 1995). However, the active avoidance of a close relative partner was demonstrated in a sole species, *Zootermopsis nevadensis* (Shellman-Reeve, 2001), while *Coptotermes* and *Reticulitermes* founding pairs seem to mate randomly (DeHeer and Vargo, 2006, Hartke and Baer, 2011, Husseneder and Simms, 2008, Vargo and Husseneder, 2011).

Embiratermes neotenicus (Termitidae, Syntermitinae) is described as a soil-feeding termite (Mathews, 1977). It is one of the more abundant species in Neotropical forests, building large and epigeous nests containing more than 10.000 individuals. *E. neotenicus* is commonly found in primary forests but it can be observed in secondary forests and, more remarkably, in anthropized patches such as bamboo cultures (personal observations). Recently, we reported in this species a hitherto unknown breeding strategy in Termitidae i.e. AQS, for Asexual Queen Succession (Fougeyrollas et al., 2015).

This system, combining sexual reproduction between the king and queen(s) to produce sterile castes and future imagoes, and parthenogenesis of the queen(s) to produce secondary neotenic females, is now described in three Rhinotermitidae species, *Reticulitermes speratus* (Matsuura et al., 2009), *R. virginicus* (Vargo et al., 2012) and *R. lucifugus* (Luchetti et al., 2013) and three Termitidae species, *Embiratermes neotenicus* (Fougeyrollas et al., 2015), *Cavitermes tuberosus* (Fournier et al., 2016) and *Silvestritermes minutus* (unpublished data). The production of parthenogenetic secondary females allows the genetic succession of the primary queen without consanguinity, because neotenic females outbreed with the primary king. In this system, deleterious mutations can be purged in homozygous parthenogens, offspring benefit from a larger fitness than those produced by a father-daughter inbreeding, and colony can grow and produce alates without genetic diversity loss.

If the life cycle part of *E. neotenicus* corresponding to the population extension phase, i.e. AQS, begins to be well known, other parts remain totally unclear. In particular, the direct study of swarming modalities and subsequent mating of alates is hardly feasible due to the difficulty in maintaining laboratory-reared colonies and producing experimental pairings. In this study, we thus aimed to investigate the reproductive structure and dispersal strategies of *E. neotenicus* alates using molecular markers. For this, 41 colonies distant from 6 m to 11 km were genotyped at 9 microsatellite loci. This study provides new data for the comprehension of colony and fine-scale population genetic structure of soil-feeding termites in Neotropical forest.

Material and Methods

Sampling

Embiratermes neotenicus colonies were sampled in October 2012, May 2013 and March 2014, in nine sites along the Petit Saut Road, French Guiana (N5803.0170 – 5807.2020, W52857.8720 – 53803.1960). Sites were separated by 0.8 to 11 km (Figure 1). Forty-one colonies were used for the genetic analyses, with the following repartition: three colonies in the site A, one in B, five in C, nine in D, eight in E, three in F, two in G, four in H and six in I.

Microsatellite analysis

Genomic DNA was extracted individually from the thorax and abdomen of workers or soldiers following the Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit protocol. Fifteen to twenty workers/soldiers from each of the 41 sampled colonies (N=813) were genotyped at nine microsatellite loci (Table 1): five of them were previously described and used for the AQS study of *E. neotenicus* (i.e. En-08, En-10, En-11, En-15 and En-19) (Fougeyrollas et al., 2015) and four additional loci (i.e. En-25, En-35, En-37 and En-39) were developed for this population genetic study. Microsatellite allele sizes were scored using GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems, France).

Due to the non-independence of genotypes among individuals within colonies, a single soldier (worker in colony A) from each of the 41 colonies was randomly selected to prevent within-colony relatedness. Basic population statistics (number of alleles N_A , Nei's unbiased expected heterozygosity H_E , observed heterozygosity H_O and fixation index F_{IS}) were

calculated using GENETIX v. 4.05.2 and FSTAT v. 2.9.3.2 softwares. Exact tests for departures from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) for each locus and linkage disequilibrium between all pairs of loci were performed using GENEPOP on the Web (Raymond and Rousset, 1995). Genotyping errors due to null alleles, large allelic drop-outs or stutter bands were checked using MICRO-CHECKER v. 2.2.3 software (Van Oosterhout et al., 2004).

Colony genetic structure

We evaluated the maximum number of alleles and genotypes observed in each colony, and G-tests summed over loci were performed to compare observed genotype repartition to theoretical expectations under classical Mendelian repartition. We classified colonies under the three family types according to Vargo et al. (2003) and Deheer and Vargo (2004): "simple families" headed by a monogamous pair of reproductives (≤ 4 alleles and 4 genotypes at any locus, $P_{G\text{-test}} \geq 0.05$), "extended families" (≤ 4 alleles and/or 4 genotypes at one or more loci or $P_{G\text{-test}} < 0.05$) and "mixed families" (> 4 alleles at one or more loci). Parental genotypes of simple families were reconstructed using a Punnett square. Classical F-statistics (Bulmer et al., 2001, Thorne et al., 1999) were calculated using FSTAT v.2.9.3.2 software (Goudet, 1995): F_{IT} , the coefficient of inbreeding for individuals within the total population; F_{IC} , the coefficient of inbreeding for individuals within colonies and F_{CT} , the coefficient of inbreeding of colonies relative to the total population. The significance of the F-statistics was assessed by estimating the 95% confidence intervals by bootstrapping over loci with 1000 replications. The average relatedness (r) was calculated among nestmates using Kingroup v2 (Konovalov et al., 2004). F-statistics and the coefficient of relatedness among reproductive pairs were estimated using the reconstructed parental genotypes.

Population genetic structure

Mitochondrial COI sequence analyses

One Cytochrome oxidase I (COI) sequence per colony ($N = 41$) was used to represent the relative frequency of each haplotype in a given site of the Petit Saut area. Accession numbers for the sequences can be found in Fougeyrollas et al. (2015). Pie charts for haplotype repartition were reported on the map of Petit Saut using the PhyloGeoViz program (Tsai, 2011) (Map data: Google, Landsat Image).

Isolation by distance between colonies

Isolation by distance between colonies was estimated with *adegenet* v.2.0.1. package (Jombart, 2008) on R v.3.1.2. The correlation between genetic (Edwards' distances) and geographic (Euclidean distances) distances for pairs of colonies was tested using a Mantel test (999 permutations) for ten replicated microsatellite datasets constructed with a single individual randomly selected from each colony.

Bayesian clustering and spatial analyses

The program STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) was used to determine whether the samples could be subdivided into K clusters and to assign individuals to those clusters. STRUCTURE assumes that there are K clusters, each of which is characterized by a set of allele frequencies at each locus. Analyses were conducted on the ten replicated datasets with the following parameters: admixture model, allele frequencies correlated, a burn-in of 50.000 and 100.000 Markov chain Monte Carlo (MCMC) repetitions. Sampling location for each individual was used as prior information to assist the clustering (LOCPRIOR model). Ten repeated simulations were run for each assumed genetic cluster ($K = 1$ to 10). To identify the optimal value of K , we used the Delta K method (Evanno et al., 2005) implemented in STRUCTURE HARVESTER v0.6.94 (Earl, 2012). Replicated STRUCTURE runs were aligned using the program CLUMPP (Jakobsson and Rosenberg, 2007) with the Greedy algorithm to maximize each individual's membership across clusters.

To infer the number of genetic clusters and their spatial boundaries, the MCMC function of the Geneland package (Guillot et al., 2005) on R v.3.1.2 was also applied to the ten replicated datasets. Geneland is described as a tool for locating genetic discontinuities within a landscape from individual geo-referenced multi-locus genotype data, without any a priori knowledge on the populational units and limits. K was allowed to vary from 1 to 10 and 100.000 MCMC iterations were run using a thinning interval of 100. The correlated frequency model was used as it could be more powerful at detecting subtle differentiations. The spatial model was chosen because it corresponds to spatial patterns that can be expected when differentiation occurs by limited gene flow induced by the presence of physical barriers (e.g. roads, rivers, mountain ranges, human activity).

Classically, F -statistics adapted for social insects are defined for three hierarchical levels (individuals, colonies and the total population), as used before to analyze colony genetic

structure. However, the different colonies may group into different sites and the population structure might not be well described with these three levels. Then it could be useful to integrate an additional level to genetic analyses, which represents the sub-population. Hierarchical F-statistics analyses were conducted using the hierfstat R package (Goudet, 2005). Genetic variability was estimated for individuals within colonies, colonies within sample sites (*i.e.* sub-populations) and sample sites within the total population of Petit Saut. 95% confidence intervals (CI) of the different F-statistics were obtained by bootstrapping over loci. Genetic differentiation was also estimated between putative genetic and/or geographic clusters by computing pairwise F_{ST} using Arlequin 3.5.2.2.

Results

Microsatellite analysis

All microsatellite markers were polymorphic with an allelic diversity ranging from 2 (En-35) to 7 alleles (En-10) (Table 1). None of the nine loci deviated significantly from HWE ($P > 0.05$) and there was no significant gametic disequilibrium ($P > 0.01$) between the 36 pairs of loci. The mean values for expected unbiased and observed heterozygosity for all loci were 0.475 and 0.477, respectively. Data and statistics for the nine loci were summarized in Table 1. No evidence of null alleles, large allelic drop-out or stutter bands was detected. Thus, the nine polymorphic loci were considered suitable for inferring *E. neotenicus* population genetic structure.

Colony genetic structure

For each of the 41 colonies, a maximum of four alleles and four genotypes was observed among soldier/worker genotypes at each locus. Mendelian distribution of parental alleles within colonies (G-tests across loci = 0.081-0.990, $P > 0.05$) and strongly negative F_{IC} value (-0.32247; [-0.35069 - -0.29307] 95% CI) were consistent with a “simple-family” organization. The high F_{CT} value (0.27358; [0.25656 - 0.28876] 95% CI) indicated genetic differentiation between colonies at the scale of Petit Saut area. The inbreeding coefficient of simple families (F_{IT}) was equal to 0.03933 ([0.02307 - 0.05635] 95% CI) indicating low but significant inbreeding within colonies. Relatedness among sterile nestmates (r) was equal to 0.51 (SD=0.12) indicating that they were closely related to each other. Relatedness was also calculated between individuals of inferred reproductive pairs and was equal to 0.13 (SD=0.30). This value was significantly higher than the population background *i.e.* the value

found for pairwise comparisons between inferred reproductives from different colonies throughout Petit Saut ($r=-0.01$, $SD=0.27$) (t-test, $p=0.001$).

Population genetic structure

COI sequence analyses

The COI dataset comprised 41 sequences of 653 bp, three polymorphic sites (site positions: 73, 264 and 459) and four haplotypes. The haplotype diversity was 0.6402. Haplotype 3 (Figure 1) was recorded in the nine sites of Petit Saut area while Haplotype 2 was only detected in the I site, at the extreme West of the road, near the Petit Saut Dam.

Isolation by distance between colonies

No significant correlation was found between genetic differentiation (Edwards' distances) and geographic distance (Euclidean distances) among colonies of Petit Saut (Figure 3a) (Mantel tests: $r=-0.119$ to 0.050 , $p>0.05$, 999 permutations) for the ten replicated datasets. The obtained IBD patterns (Figure 3b) showed three patches suggesting distant and differentiated populations rather than a single patch representing a continuous cline of genetic differentiation. When colonies from the H and I sites were removed from the analysis, IBD pattern came back to a single cloud of points with no significant evidence for isolation by distance across the remaining samples (Mantel tests: $r=-0.183$ to $r=0.072$, $P>0.05$, 999 permutations).

Bayesian clustering and spatial analyses

STRUCTURE analyses for the ten replicated datasets revealed no evidence for population structure and differentiation (data not shown). Whatever the value of K tested (1-10) the probabilities of posterior assignment of each individual were distributed between each of the clusters. Depending on the replicates, the optimum ΔK value was found for $K=2$ to $K=7$.

On the contrary, Geneland analyses identified two genetic clusters ($K=2$) among the samples of Petit Saut area in seven replicated datasets (Figure 2) and three genetic clusters in three replicated datasets ($K=3$). In the case of $K=2$, I colonies were assigned to the first cluster and the rest of the colonies were assigned to the second cluster (Figure 2) for five replicated datasets. I and H colonies were assigned to the first cluster and the rest of the colonies were assigned to the second cluster for two replicated datasets. In the case of $K=3$, I colonies were

assigned to the first cluster, the rest of the colonies to the second cluster and no colony to the third cluster for two replicated datasets. I colonies were assigned to the first cluster, H colonies to a second cluster and the rest of the colonies to the third cluster for one replicated dataset.

The genetic differentiation estimated using hierarchical F-statistics resulted in significant values for F_{CT} (differentiation between colonies within the total population: 0.276, 95% CI [0.2578- 0.2925]), F_{CS} (differentiation between colonies within sites: 0.2520, 95% CI [0.2363- 0.2676]) and F_{ST} (differentiation between sites within the total population: 0.0326, 95% CI [0.0085-0.0575]). Following the classification of Wright (1978), this last value corresponds to little genetic differentiation between sites ($0 < F_{ST} < 0.05$). The genetic differentiation between sites was thus further investigated by computing pairwise F_{ST} . The I site appeared as moderately differentiated from all others, with a significant pairwise F_{ST} value of 0.0931 ($P < 0.05$, 1023 permutations). I+H sites together showed little genetic differentiation relative to all others ($F_{ST} = 0.0498$, $P < 0.05$, 1023 permutations). Finally, the H site was moderately differentiated from all others ($F_{ST} = 0.0581$, $P < 0.05$, 1023 permutations).

Discussion

Using nine polymorphic microsatellite markers, we assessed the breeding and dispersal strategies of the Neotropical soil-feeding termite, *Embiratermes neotenicus*. All 41 sampled colonies were genetically identified as simple families *i.e.* in the formal definition, colonies headed by a single monogamous pair of reproductives. This pair is generally expected to be constituted by primary reproductives, but one primary and one neotenic reproductives, or two neotenic can also head such colonies (Vargo et al., 2003). No evidence was found in *E. neotenicus* for mixed families headed by multiple unrelated reproductives (*i.e.* arising from pleometrosis or colony fusion) or for extended families, which are inbred groups containing at least three neotenic reproductives (Deheer and Vargo, 2004). In extended families, neotenic reproductives are the sexually produced offspring of a single pair of reproductives. As highlighted by Matsuura (2010), analyses of colony breeding structure that are only based on sterile caste genotyping fail to detect neotenic female contribution when they are parthenogenetically produced. Such AQS colonies are consequently identified as simple families. Here it is very likely that most of the *E. neotenicus* simple family colonies were headed by a primary king and a large number of neotenic females, which were parthenogenetically produced by the primary queen. Indeed AQS was unambiguously

demonstrated in this species and all inspected colonies in which we succeeded in finding the reproductives contained numerous (*i.e.* 35 to 170) nymphoid neotenic queens, except only one with a single pair of primary reproductives (Fougeyrollas et al., 2015). We then confirm that genetic monogamy is the main breeding strategy in this site, as all sampled colonies originated from a pair of primary reproductives, with the primary queen being commonly replaced by highly related parthenogenetic daughters at an early stage of the colony life cycle. The proportion of simple families in *E. neotenicus* is similar to that found in another soil-feeding but non-AQS species, *Labiotermes labralis* (Syntermitinae) (100% of simple families, N=17, (Dupont et al., 2009)) and a little higher than that found in the soil-feeding AQS species, *Cavitermes tuberosus* (Termitinae) (62%, N=65, (Fournier et al., 2016)) and *Silvestritermes minutus* (Syntermitinae) (83%, N= 42, unpublished data). Despite a vast literature dealing with neotenic reproduction in subterranean termites, sometimes implying hundreds of sexually produced philopatric reproductives, the observed predominance of monogamous (or genetically assimilated) systems in soil-feeding Termitidae is not surprising. The low frequency of extended families in Termitidae has been previously explained by the limited occurrence of neotenic reproduction (13.4% of Termitidae genera vs 61.7% of non-Termitidae genera) (Myles, 1999, Vargo and Husseneder, 2011) and now finds an additional explanation in the fact that AQS systems could be ecologically advantageous and probably more widespread than previously thought (Fournier et al., 2016).

The mean inbreeding coefficient of *E. neotenicus* sterile castes was significantly different from that expected for the offspring of a totally outbred pair of reproductives, indicating that some colonies could be founded or headed by a pair of slightly related reproductives. Inbreeding in simple families is generally explained by the pairing of related primary reproductives, following short-range and/or asynchronous flights between colonies. Soil-feeding termites could fit this model since they are described as particularly weak fliers, with a poor to very poor capacity of dispersal (Eggleton and Tayasu, 2001). However, no evidence was found in *E. neotenicus* for viscosity at the local scale and isolation by distance results rather suggest that alates could have large range dispersal flight and ability. Matings between related individuals could be occasional, as suggested by significant relatedness coefficients between inferred primary pairs. Similar results were found for *Coptotermes lacteus*, a Rhinotermitidae building large mounds in Australia, in which primary inbreeding was not associated with viscosity (Thomson et al, 2007). Deviations from Hardy–Weinberg equilibrium in *Coptotermes lacteus* were explained by a failure in detecting viscosity or a

preference for non-sibling relatives over totally unrelated mates *i.e.* ‘optimal outbreeding’ sensu Bateson (1983). Indeed mating with too genetically distant partners can reduce the fitness of the offspring and lead to an outbreeding depression (Charlesworth and Willis, 2009), while inbred matings could have positive effects on the inclusive fitness of the parents by increasing their representation of genes identical by descent in future generations. Thus, individuals should either avoid or favor inbred matings in order to balance the cost of inbreeding depression and the benefit of inbreeding (Kokko and Ots, 2006). Finally, a last hypothesis to explain inbreeding can be based on the rare presence of neotenic males in *E. neotenicus* colonies. As 22% of simple families were found to produce this type of individuals, it remains possible that one of the sexually produced neotenic males participate to the offspring, in particular in colonies where the primary king was absent (7% of the colonies) (Fougeyrollas et al., 2015).

Fine-scale genetic studies are very scarce for soil-feeding Termitidae, but they reported no significant population viscosity at the local scale, suggesting that alates fly far enough to minimize detectable population structure. Genetic results indicated that *Cavitermes tuberosus* alates were able to disperse over at least 500 m (Fournier et al., 2016) and *Embiratermes neotenicus*, 6 km (this study). This last result largely exceeds estimations based on field observations of termite swarming flights. Indeed, direct observations on alate flights showed that the mean distance is about several hundred of meters (Nutting, 1969). Even if genetic data suggest that *E. neotenicus* alates are able to disperse over a few kilometers, active flights are unlikely to occur over these distances. Dispersal mediated by human transportation or rafting is also a hardly acceptable explanation in soil-feeding termites because reproductives are never found in human-manufactured or infested pieces of wood, unlike xylophagous termites (Brandl et al., 2005, García et al., 2002). Furthermore, sampling sites used for the final isolation by distance analysis of *E. neotenicus* were very remote and unlikely disturbed by human activity. Recently, Bourguignon et al. (2009) suggested that flying high was an important feature for long dispersal distance in tropical rainforest termites. Termitidae alates were abundant in the canopy and another species of *Embiratermes*, *E. chagresi*, was found up to 28 m height. By flying high, alates may take advantage of air currents above the upper canopy, and passive drift by winds could represent an important component of dispersal in termites.

At larger spatial scales, Husseneder and Vargo (2011) underlined in their review of termite population genetics that low levels of differentiation occurred under 30–50 km and that

moderate to strong differentiation occurred above 100 km, suggesting relatively unfettered gene flow over distances of tens of kilometers in many species. Results from this study are in line with these observations, since *E. neotenicus* showed little genetic differentiation between sampling sites at the scale of Petit Saut. Only two sampling sites, I and H, appeared as slightly differentiated from the rest of the population according to the spatial model implemented in Geneland, and to pairwise F-statistics. Inversely, clustering methods without spatial information failed in detecting any population structure (i.e. Structure and Discriminant Analysis of Principal Components analyses, data not shown). The slight differentiation of I and H sites can be explained by their geographical position at the extreme West of the road, near the Petit Saut Dam. Furthermore, two close physical barriers, the Sinnamary River and the dam, and the associated activity i.e. human movements and flooding, could act as potential obstacles to gene flow.

Conclusion

In conclusion, this study provided a clear pattern of the breeding strategy and fine-scale population genetic structure of *E. neotenicus* in a pristine forest. As found in other common soil-feeding species in this area, *E. neotenicus* dispersal abilities do not particularly support the hypothesis of short-range swarming flights, initially proposed for soil-feeders. However, a previous study on *Labiotermes labralis* showed significant inbreeding in isolated patches of forest surrounding human cultures, suggesting that meeting of alates from different patches was unlikely and that re-colonization of disturbed habitats was difficult (Dupont et al., 2009). Because *E. neotenicus* can be found in various habitats comprising anthropized sites, it represents a good candidate to study the genetic consequences of habitat disturbance on the stability of AQS system and (re)-colonization abilities. In particular, studying the investment in local colony expansion and mass swarming events in relation with environmental variations, will be of interest.

Acknowledgments

We are grateful to P. Cerdan and the staff of the Laboratoire Environnement HYDRECO of Petit Saut (EDF-CNEH) for logistic support. This research was funded by the Belgian National Fund for Scientific Research (FRFC grant 2.4594.12), the Czech Science Foundation (14-12774S), the Grant Agency of the Charles University in Prague (580413), the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, AS CR (RVO: 61388963) and the Doctoral School Science, Engineering and Environment (RF mobility grant).

Disclosure

The authors have declared that no competing interests exist, including financial interests and relationships and affiliations relevant to the subject of our manuscript.

References

- Bateson, P. 1983. Optimal outbreeding. In: BATESON, P. (ed.) *Mate choice*. Cambridge University Press.
- Bourguignon, T., Leponce, M. and Roisin, Y. 2009. Insights into the termite assemblage of a neotropical rainforest from the spatio-temporal distribution of flying alates. *Insect Conservation and Diversity*, 2, 153-162.
- Brandl, R., Hacker, M., Epplen, J. and Kaib, M. 2005. High gene flow between populations of *Macrotermes michaelseni* (Isoptera, Termitidae). *Insectes sociaux*, 52, 344-349.
- Bulmer, M. S., Adams, E. S. and Traniello, J. F. 2001. Variation in colony structure in the subterranean termite *Reticulitermes flavipes*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 49, 236-243.
- Charlesworth, D. and Willis, J. H. 2009. The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics*, 10, 783-796.
- Deheer, C. J. and Vargo, E. L. 2004. Colony genetic organization and colony fusion in the termite *Reticulitermes flavipes* as revealed by foraging patterns over time and space. *Molecular Ecology*, 13, 431-441.
- DeHeer, C. J. and Vargo, E. L. 2006. An indirect test of inbreeding depression in the termites *Reticulitermes flavipes* and *Reticulitermes virginicus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 59, 753-761.
- Dupont, L., Roy, V., Bakkali, A. and Harry, M. 2009. Genetic variability of the soil-feeding termite *Labiotermes labralis* (Termitidae, Nasutitermitinae) in the Amazonian primary forest and remnant patches. *Insect Conservation and Diversity*, 2, 53-61.
- Earl, D. A. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4, 359-361.
- Eggleton, P. and Tayasu, I. 2001. Feeding groups, lifestypes and the global ecology of termites. *Ecological Research*, 16, 941-960.
- Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611-2620.

- Fougeyrollas, R., Dolejšová, K., Sillam-Dussès, D., Roy, V., Hanus, R. and Roisin, Y. 2015. Asexual queen succession in the higher termite *Embiratermes neotenicus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282, 20150260.
- Fournier, D., Hellemans, S., Hanus, R. and Roisin, Y. 2016. Facultative asexual reproduction and genetic diversity of populations in the humivorous termite *Cavitermes tuberosus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283, 20160196.
- García, J., Maekawa, K., Miura, T. and Matsumoto, T. 2002. Population structure and genetic diversity in insular populations of *Nasutitermes takasagoensis* (Isoptera: Termitidae) analyzed by AFLP markers. *Zoological Science*, 19, 1141-1146.
- Gathorne-Hardy, F., Jones, D. and Mawdsley, N. 2000. The recolonization of the Krakatau islands by termites (Isoptera), and their biogeographical origins. *Biological Journal of the Linnean Society*, 71, 251-267.
- Goudet, J. 1995. Fstat version 1.2: a computer program to calculate Fstatistics. *Journal of Heredity*, 86, 485-486.
- Goudet, J. 2005. Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5, 184-186.
- Guillot, G., Mortier, F. and Estoup, A. 2005. GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, 5, 712-715.
- Hartke, T. and Baer, B. 2011. The mating biology of termites: a comparative review. *Animal Behaviour*, 82, 927-936.
- Husseneder, C. and Simms, D. M. 2008. Size and heterozygosity influence partner selection in the Formosan subterranean termite. *Behavioral Ecology*, 19, 764-773.
- Jakobsson, M. and Rosenberg, N. A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23, 1801-1806.
- Kokko, H. and Ots, I. 2006. When not to avoid inbreeding. *Evolution*, 60, 467-475.
- Konovalov, D. A., Manning, C. and Henshaw, M. T. 2004. KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Molecular Ecology Notes*, 4, 779-782.
- Luchetti, A., Velonà, A., Mueller, M. and Mantovani, B. 2013. Breeding systems and reproductive strategies in Italian *Reticulitermes* colonies (Isoptera: Rhinotermitidae). *Insectes sociaux*, 60, 203-211.
- Martius, C. 2003. Rainfall and air humidity: non-linear relationships with termite swarming in Amazonia. *Amazoniana*, 17, 387-397.

- Mathews, A. A. 1977. *Studies on termites from the Mato Grosso state, Brazil*, Academia brasileira de ciências Rio de Janeiro.
- Matsuura, K. 2010. Sexual and asexual reproduction in termites. *In: BIGNELL, D. E., ROISIN, Y. & LO, N. (eds.) Biology of termites: a modern synthesis*. Springer Netherlands.
- Matsuura, K., Vargo, E. L., Kawatsu, K., Labadie, P. E., Nakano, H., Yashiro, T. and Tsuji, K. 2009. Queen succession through asexual reproduction in termites. *Science*, 323, 1687-1687.
- Michener, C. D. and Smith, B. H. 1987. Kin recognition in primitively eusocial insects. *In: FLETCHER, D. J. & MICHENER, C. D. (eds.) Kin recognition in animals*. John Wiley and Sons, New York.
- Myles, T. G. 1999. Review of secondary reproduction in termites (Insecta: Isoptera) with comments on its role in termite ecology and social evolution. *Sociobiology*, 33, 1-43.
- Nutting, W. 1969. Flight and colony foundation. *In: KRISHNA, K. & WEESNER, F. M. (eds.) Biology of termites*. Academic Press New York and London
- Pritchard, J. K., Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
- Raymond, M. and Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248-249.
- Ross, K. G. 1993. The breeding system of the fire ant *Solenopsis invicta*: effects on colony genetic structure. *American Naturalist*, 554-576.
- Ross, K. G. 2001. Molecular ecology of social behaviour: analyses of breeding systems and genetic structure. *Molecular Ecology*, 10, 265-284.
- Ross, K. G. and Keller, L. 1995. Ecology and evolution of social organization: insights from fire ants and other highly eusocial insects. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 631-656.
- Shellman-Reeve, J. S. 2001. Genetic relatedness and partner preference in a monogamous, wood-dwelling termite. *Animal Behaviour*, 61, 869-876.
- Smith, B. H. and Breed, M. D. 1995. The chemical basis for nestmate recognition and mate discrimination in social insects. *In: CARDÉ, R. T. & BELL, W. J. (eds.) Chemical Ecology of Insects 2*. Chapman & Hall, New York.
- Sugg, D. W., Chesser, R. K., Dobson, F. S. and Hoogland, J. L. 1996. Population genetics meets behavioral ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 338-342.

- Thorne, B., Traniello, J., Adams, E. and Bulmer, M. 1999. Reproductive dynamics and colony structure of subterranean termites of the genus *Reticulitermes* (Isoptera Rhinotermitidae): a review of the evidence from behavioral, ecological, and genetic studies. *Ethology Ecology & Evolution*, 11, 149-169.
- Tsai, Y.-H. E. 2011. PhyloGeoViz: a web-based program that visualizes genetic data on maps. *Molecular Ecology Resources*, 11, 557-561.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. and Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535-538.
- Vargo, E. L. and Husseneder, C. 2011. Genetic structure of termite colonies and populations. *In: BIGNELL, D. E., ROISIN, Y. & LO, N. (eds.) Biology of termites: a modern synthesis*. Springer Netherlands.
- Vargo, E. L., Husseneder, C. and Grace, J. K. 2003. Colony and population genetic structure of the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*, in Japan. *Molecular Ecology*, 12, 2599-2608.
- Vargo, E. L., Labadie, P. E. and Matsuura, K. 2012. Asexual queen succession in the subterranean termite *Reticulitermes virginicus*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 279, 813-819.

Table

Tab. 1 Microsatellite loci used for the genetic study.

Locus	Motif	Primer sequence (5'-3')	Label	N _A	Allele size range (bp)	H _E n.b.	H _O	F _{IS}
<i>PCR multiplex 1</i>								
En-08	(ac) ₁₃	F : CTGAGCGGTTGCAGAGTACC R : TTCCCGGCCAAAGTACTAAC	6FAM	3	157–169	0.419	0.366	0.128
En-10	(tg) ₁₄	F : CGTCCAGAAGATTCTACCG R : TCTCTACCTCGTGTCTGCCT	NED	7	103–135	0.712	0.805	-0.132
En-11	(ac) ₁₄	F : CCAACTCGTAGGTGTAGAGGAT R : CCGTCTCTTGTGAGTGTGTG	NED	6	158–170	0.492	0.463	0.059
En-15	(ca) ₁₅	F : CGATGAGATTCCGTAGACACC R : AACCTAGCACCTCACATGC	NED	4	284–292	0.563	0.585	-0.041
En-19	(tg) ₁₇	F : TACATTCAAATTAGTCTTGTGCC R : TTGGTCGAGCCTATCTGGTC	PET	6	178–194	0.623	0.634	-0.018
<i>PCR multiplex 2</i>								
En-25	(ac) ₁₁	F : AGTTCGCGTTCAGAAGAAGC R : TTCTCAATCAATGCAACCTGTC	NED	4	87-89	0.535	0.561	-0.050
En-35	(ca) ₀₉	F : ACAGAGTGGCCTCTTTACGC R : CCCATTCAAGCACGTCTGTA	6FAM	2	119-127	0.137	0.146	-0.067
En-37	(ac) ₀₉	F : ACGCGCACAGTATTGCAT R : TGAGTGTGGTGGGGTAATGT	6FAM	5	131-149	0.334	0.341	-0.023
En-39	(ag) ₀₉	F : GCTTCCAGTGTAATCACAATTC R : GCAGTGAGATTTGTAGCCCC	PET	3	158-164	0.463	0.390	0.160

Figures

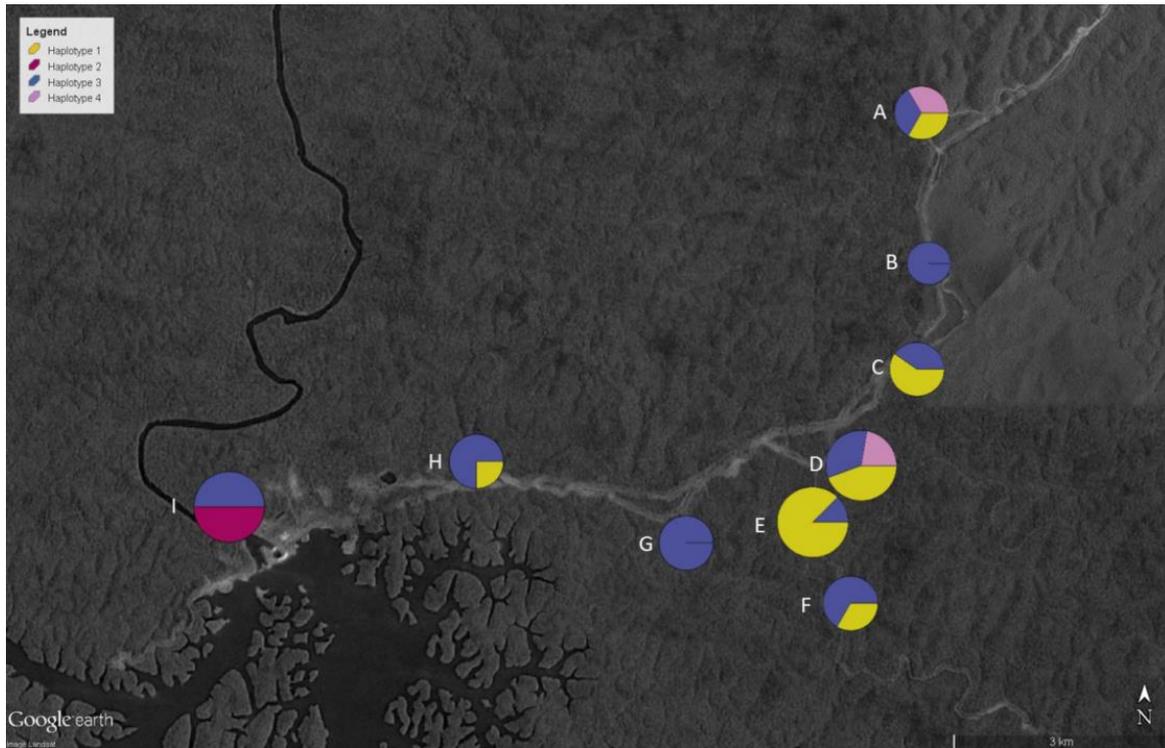


Fig. 1 Pie charts for COI haplotype repartition reported on the map of Petit Saut (Map data: Google, Landsat Image). The nine sampled sites are indicated on the pie charts: A (N=3 colonies), B (N=1), C (N=5), D (N=9), E (N=8), F (N=3), G (N=2), H (N=4) and I (N=6).

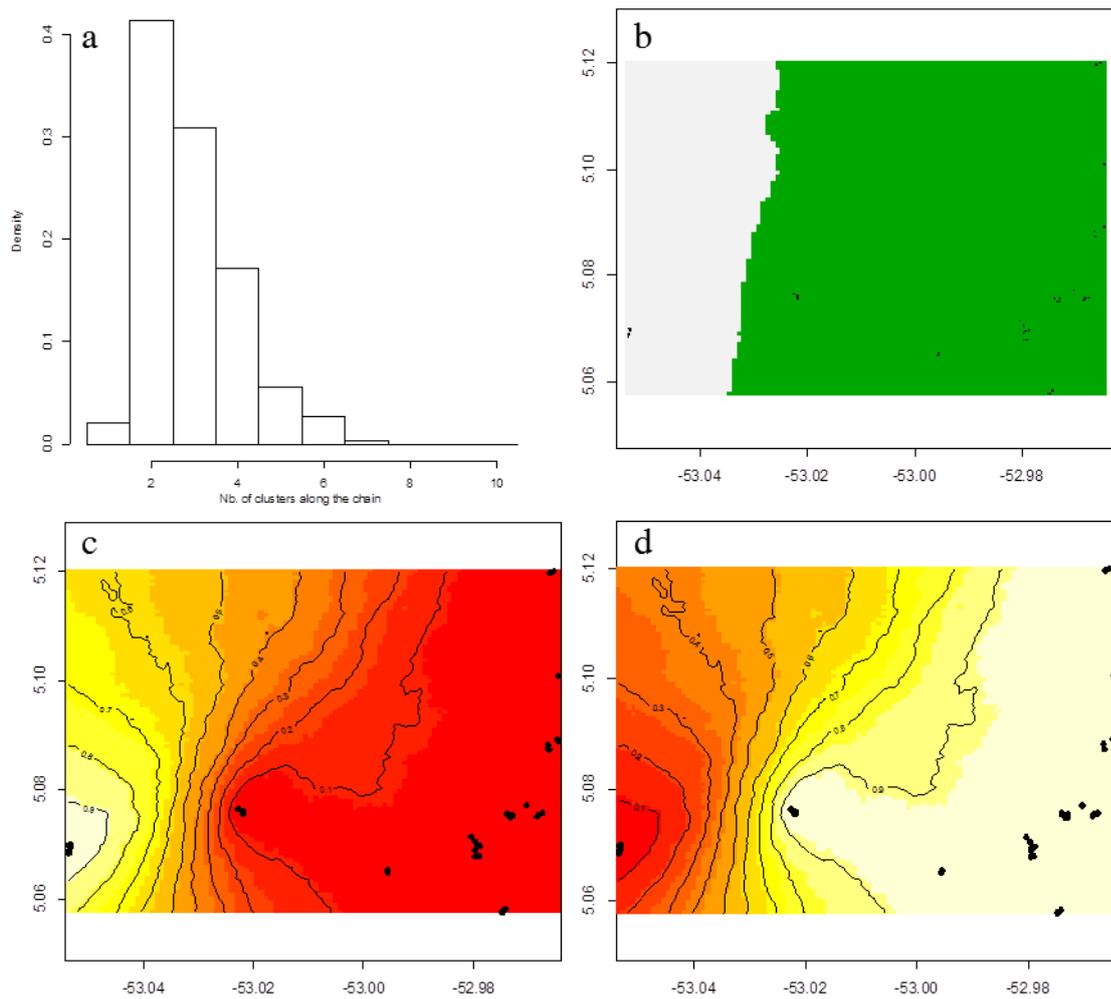


Fig. 2 Example of maps of Geneland individual assignments to clusters for $K=2$. (a) Number of population simulated from the posterior distribution, b) Map of estimated population membership, c) Map of posterior probabilities of the first cluster, d) Map of posterior probabilities of the second cluster. The highest membership values are in light yellow and the level curves illustrate the spatial changes in assignment values.

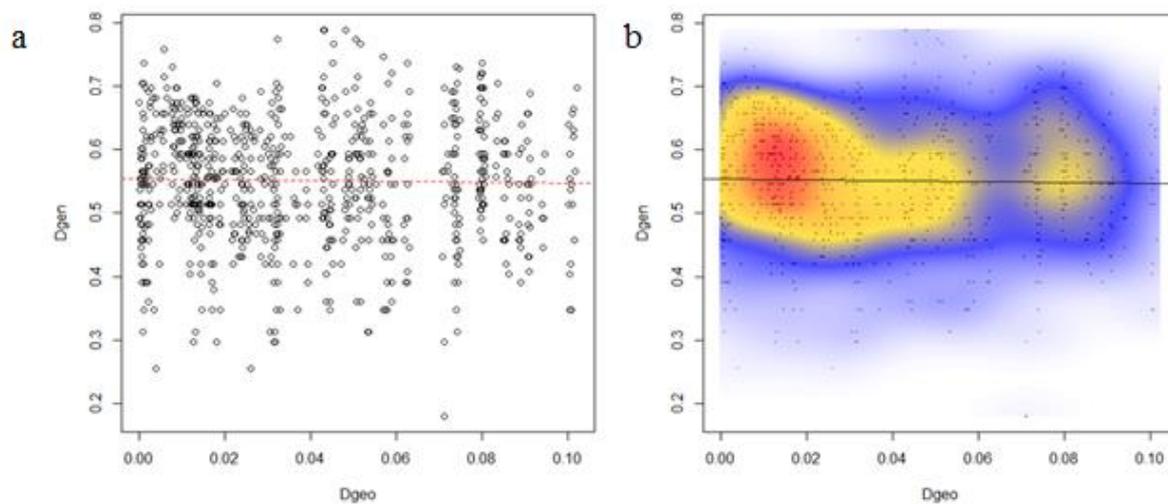


Fig. 3 a) Example of plot obtained for the isolation by distance analysis of the 41 colonies of Petit Saut. b) Local density of points was plotted using a two-dimensional kernel density estimation. Dgeo: geographical distances (Euclidian distances), Dgen: genetic distances (Edwards' distances).

3. Principaux résultats des articles 1 et 2

- Le développement d'une banque de microsatellites spécifiques à *Embiratermes neotenicus* et la caractérisation des marqueurs a permis de valider, au final, **neuf loci microsatellites polymorphes** (i.e. possédant deux à sept allèles) et indépendants génétiquement.
- Les résultats de l'analyse génétique de neuf colonies, dans lesquelles a été observé un grand nombre de femelles néoténiques nymphoïdes accompagnées d'un seul roi primaire, ont mis en évidence que **les femelles néoténiques étaient issues de parthénogenèse thélytoque à partir de la reine primaire tandis que les ouvriers, les soldats et la plupart des imagos étaient produits par reproduction sexuée**, par le couple fondateur de reproducteurs primaires, ou par le roi primaire et les femelles néoténiques (Figure 10). Ces résultats traduisent la mise en place d'une alternance de reproduction sexuée pour produire les individus stériles et de parthénogenèse pour produire les femelles néoténiques. Ainsi, nous avons décrit **le premier cas d'AQS chez les Termitidae**.
- L'analyse du taux de transition vers l'homozygotie chez les femelles néoténiques a permis de révéler qu'elles étaient produites par **parthénogenèse thélytoque avec fusion centrale des gamètes, et ce mode de parthénogenèse est mis en évidence pour la première fois chez les termites**.
 - Dans la seule colonie échantillonnée qui possédait le roi et la reine primaire (jeune colonie de petite taille), aucun reproducteur secondaire n'a été trouvé et tous les membres de la colonie étaient issus du couple primaire. Le remplacement de la reine primaire par ses filles néoténiques s'effectuerait donc assez rapidement dans le cycle de vie de la colonie. Dans la stratégie reproductive adoptée par *E. neotenicus*, le couple primaire fonde la colonie dans le sol (développement hypogé du nid) et produit les premiers membres de la colonie (jeune colonie, Figure 10). La reine primaire commence ensuite à produire des nymphes issues de parthénogenèse, qui seront amenées à se différencier en nymphoïdes. La différenciation des nymphes en femelles néoténiques se ferait au stade nymphal N4. Les nymphoïdes remplacent alors la reine primaire, deviennent physogastres, se reproduisent avec le roi et produisent à leur tour une deuxième génération de nymphoïdes par parthénogenèse. La colonie arrive alors à

maturité (développement épigé du nid) (colonie mature, Figure 10). La production de nymphes d'origine sexuée destinées à devenir de futurs imagos survient probablement plus tard dans le cycle de vie, juste avant l'essaimage. La production de nombreuses femelles néoténiques via le système AQS permet aux colonies de se développer rapidement, avec un grand nombre d'individus stériles, et maximise la production d'imagos avant l'essaimage.

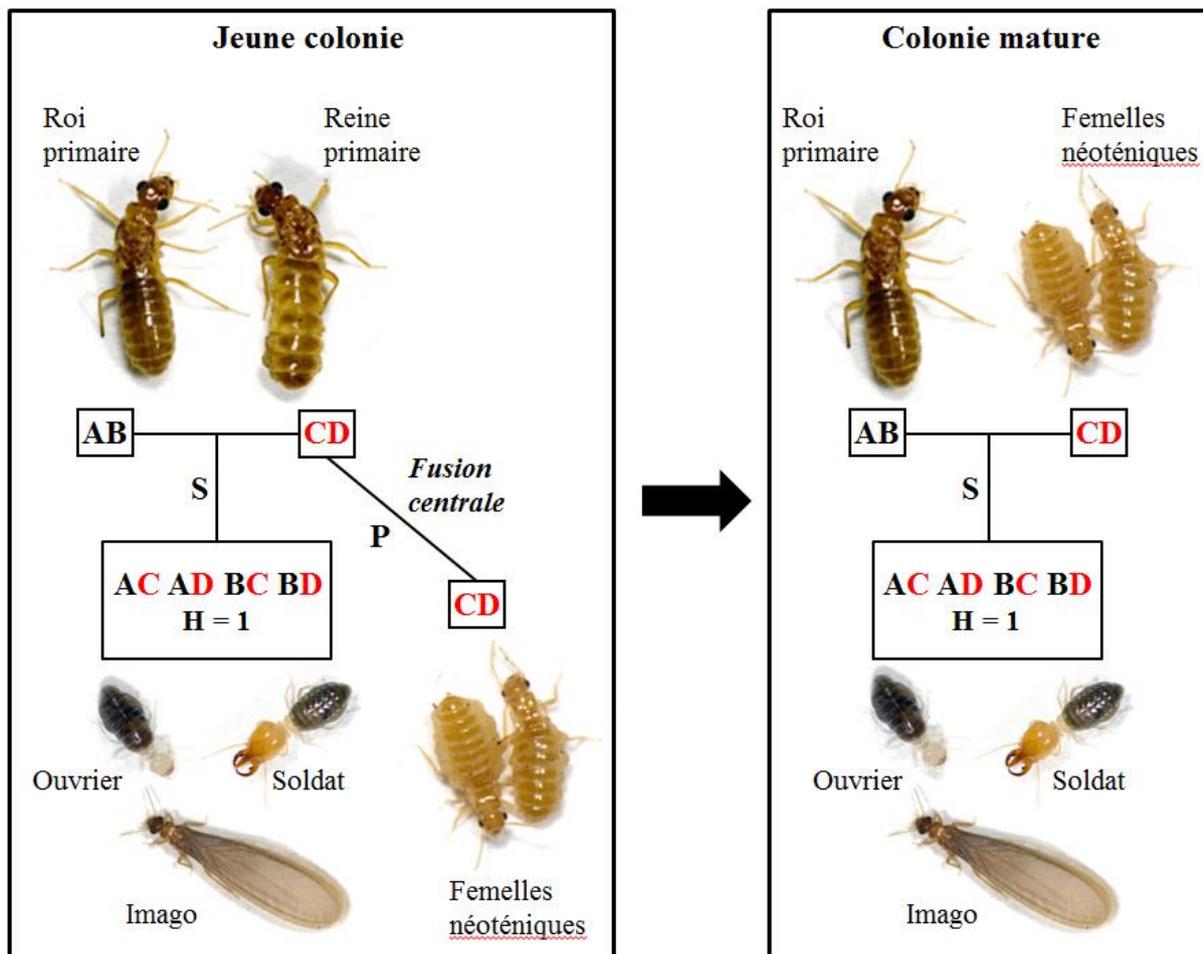


Figure 10 : Schéma général de l'évolution du système AQS au cours du développement de la colonie chez *E. neotenicus* et contribution génétique des reproducteurs à la descendance. S : reproduction sexuée, P : parthénogenèse, H : hétérozygotie.

- L'analyse de la structure reproductive de 41 colonies d'*E. neotenicus* sur le site de Petit Saut a permis de mettre en évidence **la présence de colonies de type famille simple uniquement**, menées soit par un couple de reproducteurs primaires, soit par le roi primaire et les femelles néoténiques. Les mesures de F-statistiques et d'apparentement indiquent que **certaines de ces familles simples ont probablement été fondées par des reproducteurs apparentés**, comme l'atteste notamment une valeur de F_{IT} faible

mais significative ($F_{IT} = 0,04$). L'apparement entre les reproducteurs primaires est souvent expliqué par la faible distance de dispersion des imagos, cependant **l'absence d'isolement par la distance ou viscosité, sur une échelle spatiale de 6 km suggère que les imagos de cette espèce sont capables de disperser sur de longues distances**, dispersion probablement facilitée par le vent. Le taux de consanguinité faible mais significatif pourrait plutôt être expliqué par un accouplement occasionnel entre imagos apparentés du fait d'un choix d'accouplement et de la reconnaissance entre partenaires.

- **La faible différenciation génétique** ($F_{ST} = 0,03$) estimée entre les neuf sites de Petit Saut suggère **des flux de gènes non contraints sur une échelle spatiale allant jusqu'à 10 km**.
- L'utilisation d'un modèle Bayésien de regroupement spatialisé a tout de même permis de détecter une **légère structuration dans la population**. Deux sites ont présenté une légère différenciation pouvant s'expliquer par la présence d'une rivière et d'un barrage à proximité, représentant potentiellement des barrières aux flux de gènes.
- Même si le cycle de vie d'*E. neotenicus* n'a pas pu être étudié dans son ensemble, il est probable que la forte capacité de dispersion des ailés, associée aux bénéfices apportés par l'AQS comme le développement rapide de la colonie et la production de nombreux ailés pour plusieurs événements d'essaimage, participent probablement au succès écologique de cette espèce.

-Chapitre 2-
Stratégie reproductive et dispersion
de *Silvestritermes minutus*



1. Description du modèle d'étude : *Silvestritermes minutus*

1.1. Le genre *Silvestritermes*

Comme le genre *Embiratermes*, le genre *Silvestritermes* appartient à la sous-famille des Syntermitinae et a été décrit récemment suite à la révision du genre *Armitermes* (Rocha *et al.*, 2012). Les *Silvestritermes* se distinguent des *Armitermes* par l'absence de courtes épines sur les différentes régions thoraciques, par une région molaire mandibulaire bien développée chez les soldats et par un intestin à la morphologie particulière distincte des autres Syntermitinae (portion P3b de l'intestin courte et arrondie, ornementation des valves entériques) (Rocha *et al.*, 2012). Ce genre regroupe sept espèces dont la répartition se limite à l'Amérique du Sud (Constantino, 1998) : *S. almirsateri*, *S. duende*, *S. euamignathus*, *S. gnomus*, *S. heyeri* (= *S. holmgreni*), *S. lanei* et *S. minutus*.

Les voies de développement des castes du genre *Silvestritermes* ont été étudiées chez *S. heyeri* (Barbosa *et al.*, 2012) et *S. euamignathus* (Haifig and Costa-Leonardo, 2016). Chez *S. heyeri*, la voie de différenciation des castes stériles comporte deux stades larvaires (L1 et L2) dont le second est à l'origine de la différenciation des ouvriers et probablement parfois des pré-soldats qui donneront les soldats (Figure 11). Les deux sexes ont été observés chez les ouvriers mais sans aucun dimorphisme, et seules des femelles ont été identifiées chez les soldats. La lignée nymphale se différencie à partir du premier stade larvaire (L1) avec une succession de cinq stades (N1 à N5) menant à la formation des reproducteurs ailés après le stade N5 (Figure 11). Des reproducteurs secondaires nymphoïdes ont été décrits dans un seul nid de *S. heyeri* et des mesures morphométriques semblent indiquer une différenciation de ces nymphoïdes à partir du stade N4 ou N5 (Figure 11). Le cycle de développement des castes chez *S. euamignathus* a récemment été étudié et apparaît assez similaire à celui décrit chez *S. heyeri* (Haifig and Costa-Leonardo, 2016), cependant, les nymphoïdes de *S. euamignathus* se différencient à partir du stade N3 et des néoténiques ergatoïdes se différencient à partir des ouvriers de stade 1 et 2 (Figure 11). La présence de reproducteurs secondaires chez *S. euamignathus* a été relevée pour la première fois par Holmgren en 1906, puis en 1996, Costa-Leonardo *et al.* ont mis en évidence la présence de nymphoïdes mâles et femelles (>50) dans trois nids, dont deux en présence du roi primaire seulement. En supprimant expérimentalement la reine primaire d'une colonie, les mêmes auteurs ont observé au bout d'un an le développement de femelles néoténiques nymphoïdes et ergatoïdes (Costa-Leonardo *et al.*, 1998). L'étude biométrique des nymphes et des nymphoïdes durant cette expérience

suggère que les nymphoïdes se différencient à partir du stade nymphal N3 (après une mue) ou N4 (après une réduction des bourgeons alaires déjà bien développés à ce stade).

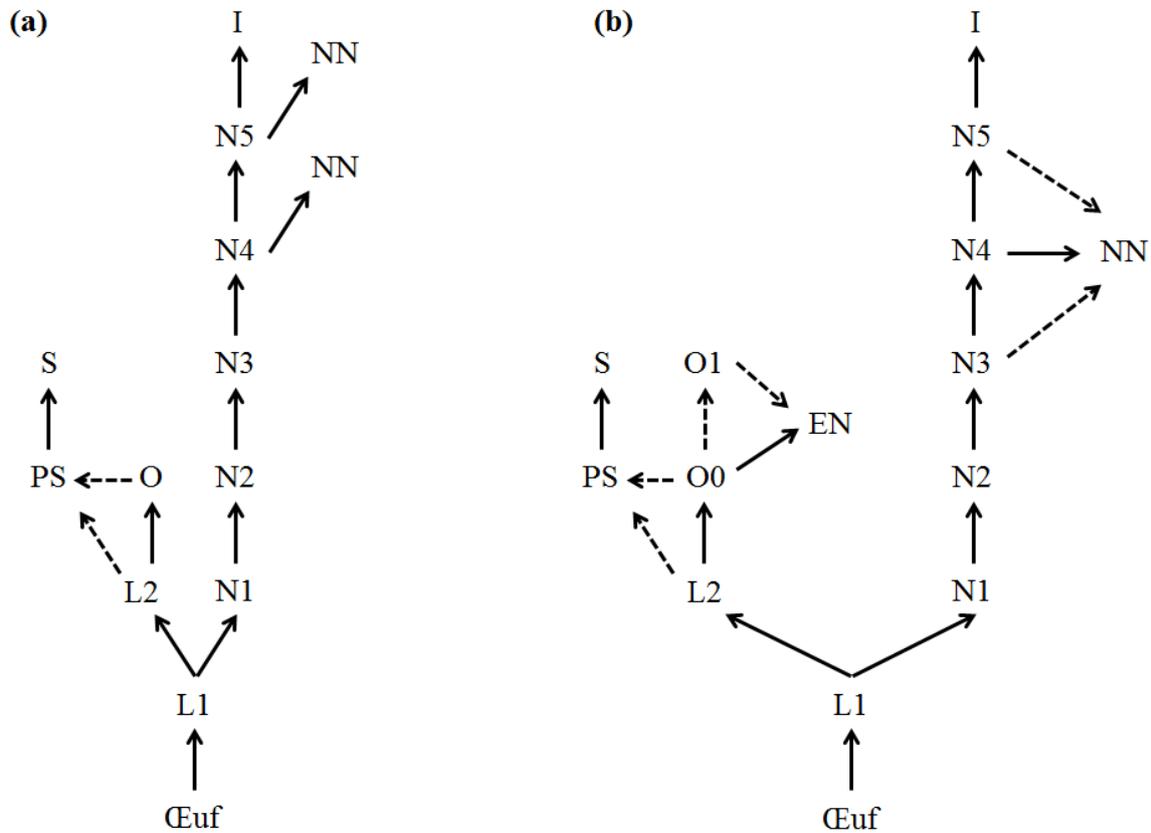


Figure 11 : Développement des castes neutres et reproductrices chez (a) *S. heyeri* (d'après Barbosa *et al.* (2012)) et (b) *S. euamignathus* (d'après Haifig and Costa-Leonardo (2016)). L1 et L2 : stades larvaires 1 et 2, O0 : ouvrier de stade 1, O1 : ouvrier de stade 2, PS : pré-soldat, S : soldat, EN : ergatoïde néoténique, N1-N5 : stade nymphal 1 – 5, NN : nymphoïde néoténique, I : imago. Les flèches en pointillé indiquent des voies de différenciation incertaines.

1.2. *Silvestritermes minutus*

L'espèce *Silvestritermes minutus* a été décrite par Emerson (1925). Les soldats sont caractérisés par une tête de couleur bronze, de forme ovale, peu recouverte de soies, avec un nasus fin et allongé plus foncé que la tête et des mandibules de même couleur et aussi longues que le nasus. D'après ses observations de terrain, Ensaf (2010) évoque un dimorphisme de taille chez les ouvriers avec des petits et des grands ouvriers, caractéristique n'ayant jamais été mentionnée dans les autres descriptions de cette espèce (Emerson, 1925, Rocha *et al.*, 2012).

S. minutus est une espèce humivore distribuée sur une partie de l'Amérique du Sud, au Brésil, en Équateur et en Guyane. Elle construit des nids épigés sur la surface du sol ou arboricoles à partir du sol environnant, à environ 50 cm de hauteur (Rocha *et al.*, 2012). Elle est observée en forêt primaire (Lefeuvre, 1990). La biologie de cette espèce a été très peu étudiée jusqu'à maintenant. Cependant, la formation de néoténiques brachyptères est connue depuis longtemps chez *S. minutus* (Emerson, 1925).

2. Observations de terrain et objectifs du chapitre

L'étude de *S. minutus* a été menée en parallèle de celle menée sur *E. neotenicus*, en réponse à la découverte sur le terrain de nids présentant une organisation reproductive assez similaire, à savoir la présence d'un petit nombre de femelles néoténiques nymphoïdes avec un roi primaire, le plus souvent sans reine primaire (Figure 12). L'observation des nids de *S. minutus* a révélé qu'ils étaient épigés, de petite taille, de forme sphérique ou ellipsoïdale et situés à quelques centimètres au-dessus du sol, le plus souvent sur des jeunes pousses d'*Astrocaryum* spp. (Figure 12). De plus, il a été possible d'observer et d'échantillonner des colonies essaimantes. Les nids de cette nouvelle espèce candidate pour l'AQS sont donc apparus plus accessibles et plus faciles à échantillonner dans leur totalité que ceux d'*E. neotenicus*, faisant de *S. minutus* un modèle particulièrement intéressant pour répondre à certaines questions biologiques, laissées en suspens dans le chapitre précédent. En effet, si *E. neotenicus* était historiquement l'espèce emblématique du harem chez les Termitidae, la taille importante de ses populations, la complexité de la structure de ses nids et la difficulté à trouver de jeunes colonies a limité nos interprétations de l'impact du système reproductif sur le cycle de vie de l'espèce.

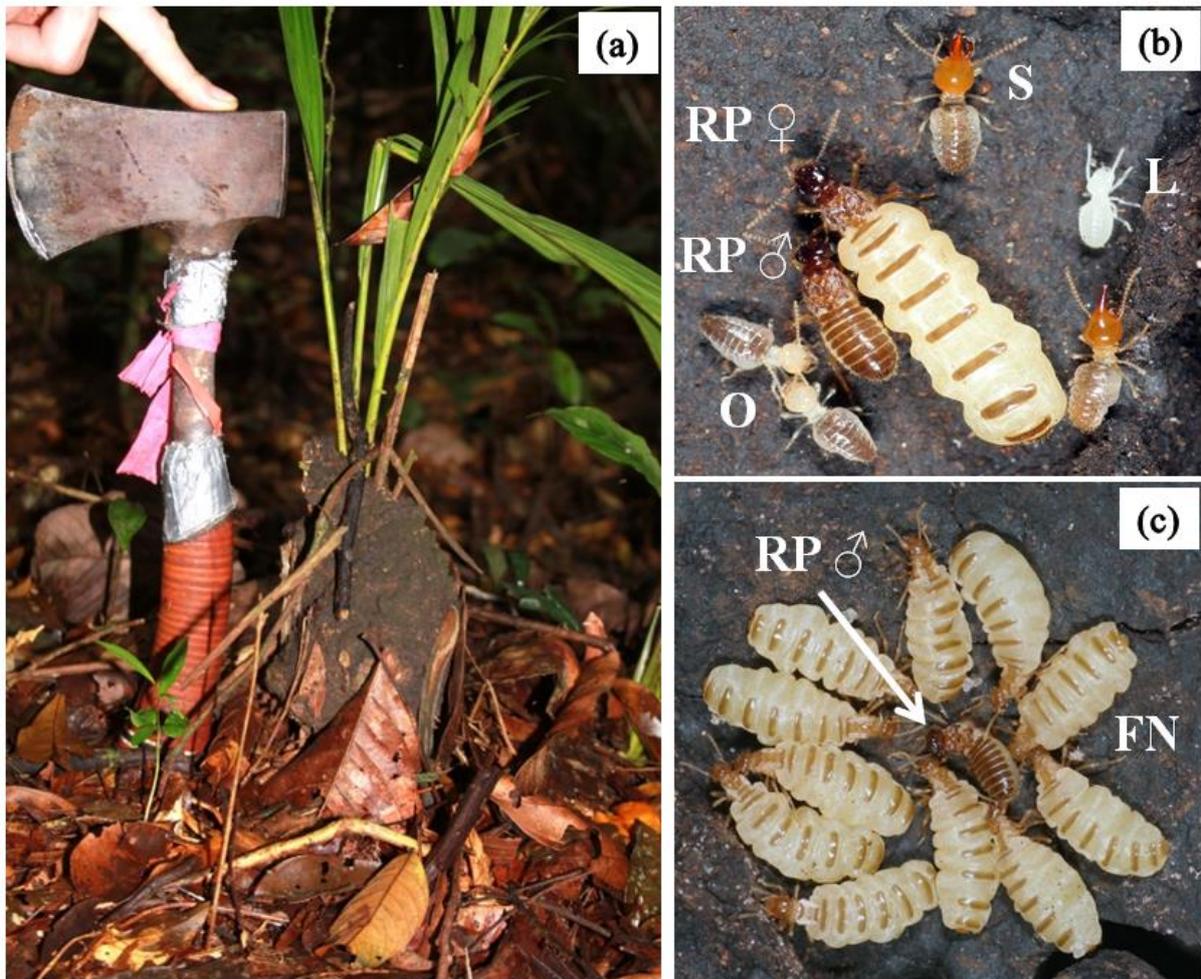


Figure 12 : Photographies prises sur le terrain. (a) nid de *S. minutus*, (b) colonie jeune avec le couple primaire, reine primaire (RP ♀) et roi primaire (RP ♂), ouvriers (O), soldats (S), et larve (L) et (c) colonie mature avec le roi primaire entouré d'une multitude de femelles néoténiques (FN).

La découverte de *S. minutus* sur le terrain nous a donc amenés à nous poser de nouvelles questions à savoir : 1) quel est le cycle de vie détaillé de cette espèce, depuis la fondation de la colonie jusqu'à la production des essaimants ?, 2) le système AQS, s'il est confirmé, a-t-il un impact sur la structure génétique des colonies ?, 3) les reproducteurs ailés montrent-ils un sex-ratio biaisé en faveur des femelles, comme attendu dans le contexte d'un déséquilibre génétique causé par le système AQS (Kobayashi *et al.*, 2013) ? et 4) comment *S. minutus* utilise-t-il les bénéfices de l'AQS pour son succès reproductif et quels sont les principaux rôles adaptatifs de l'AQS chez cette espèce ?

Les résultats de ce chapitre seront exposés dans un article :

- **Article 3** : « Asexual Queen Succession and its life history implications in the termite *Silvestritermes minutus* », dans lequel une étude complète de *S. minutus*

a été réalisée avec une description du cycle de vie de l'espèce, en lien avec le système de reproduction et la dispersion.

Article 3: « Asexual Queen Succession and its life history implications in the termite *Silvestritermes minutus* »

Romain Fougeyrollas, Jan Křivánek, Virginie Roy, Klára Dolejšová, Sophie Frechault, Yves Roisin, Robert Hanus, et David Sillam-Dussès

iEES-Paris UMR 7618 ECOTERM, UFR des Sciences et Technologie
Université Paris-Est Créteil

Soumis à *Molecular Ecology*

**Asexual Queen Succession and its life history implications in the termite
*Silvestritermes minutus***

Romain Fougeyrollas^{1,†}, Jan Křivánek^{2,3,†}, Virginie Roy¹, Klára Dolejšová^{2,3}, Sophie Frechault¹, Yves Roisin⁴, Robert Hanus^{2,*} and David Sillam-Dussès^{5,6}

¹*Université Paris-Est Créteil, Université Pierre et Marie Curie, CNRS, INRA, IRD, Université Paris-Diderot, iEES-Paris, 94000 Créteil, France*

²*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic*

³*Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic*

⁴*Evolutionary Biology and Ecology, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium*

⁵*IRD-Sorbonne Universités-UMR 242, Université Pierre et Marie Curie, Université Paris-Est Créteil, Université Paris-Diderot, CNRS, INRA, iEES-Paris, Bondy, France*

⁶*LEEC, EA4443, Université Paris 13—Sorbonne Paris Cité, Villetaneuse, France*

Abstract

Alternation of sexual reproduction with thelytokous parthenogenesis, known as Asexual Queen Succession (AQS), has recently been described in several species of termites. Using this unique strategy, termite queens maintain the desirable genetic diversity in sterile offspring and dispersing reproductives produced from fertilized eggs, while maximizing their genetic input into non-dispersing queens arising through parthenogenesis. Currently known cases suggest multiple independent origins of AQS in three species of lower and two species of higher termites. Here, we identify the Neotropical higher termite *Silvestritermes minutus* as a new case of AQS and report on its breeding system, life cycle, genetic structure of colonies and populations and sex allocation. The colonies are established by a pair of outbred primary reproductives. After one year, the founding queen is replaced by a harem of neotenic queens, arising mostly through automictic thelytoky with central fusion. Workers, soldiers and majority of alate dispersers are produced sexually. Colony reproduction is most often restricted to a single dispersal of alates, produced in egalitarian sex ratios, taking place three years after the colony establishment. Absence of isolation by distance and low genetic structuration at the population level suggest long dispersal flights. We conclude that *S. minutus* benefits from AQS to maximize the colony growth rate within a very short life cycle rather than to extend the colony lifespan, as proposed in other species. This highlights the versatile adaptive role of AQS in different cases of its polyphyletic origin. From the current AQS distribution we predict more species to be discovered.

Introduction

Sexual reproduction is a widespread, yet not universal mode of reproduction in eukaryotes. Its indisputable evolutionary dominance is complemented by a multitude of asexual processes, distributed across a wide range of taxa (Bell 1982). However, only in rare cases was the sexual reproduction completely lost; instead, a variety of mixed strategies has evolved, combining the benefits of asexuality and sex, while reducing the obvious costs inherent to sexual reproduction (Maynard Smith 1978; Barton & Charlesworth 1998; Schön *et al.* 2009). In the recent years, mixed reproductive strategies alternating sexual reproduction with thelytokous parthenogenesis have been identified to be stable elements of the life cycle also in some social insects, including the major eusocial clades, ants and termites.

The most noteworthy example of sexual reproduction combined with thelytoky in social insects is known as “Asexual Queen Succession” (AQS). It was first documented in several species of ants, in which the queens produce the workers using the conventional sexual process from fertilized eggs while new queens arise from unfertilized eggs through thelytokous parthenogenesis (reviewed in Wenseleers & Van Oystaeyen 2011; Rabeling & Kronauer 2013). This unusual reproductive system is interpreted as an ideal compromise between sexual and asexual reproductions, allowing the ant queens to maintain the desirable genetic diversity in workers while maximizing their genetic contribution to future queens and thus overcoming one of the major drawbacks of sex, the dilution of genetic material in each sexually produced generation.

As yet another fascinating example of convergent evolution in ants and termites, the AQS has been recently reported to occur also in termites. It has first been observed by Matsuura *et al.* (2009) in the Japanese subterranean termite *Reticulitermes speratus* (Rhinotermitidae), in which the founding primary queen is replaced early in the colony life cycle by numerous neotenic females, produced through thelytokous parthenogenesis from unfertilized eggs. These parthenogens develop from brachypterous nymphs (nymphoid neotenic) and reproduce in the natal colony with the present primary king to replace the primary queen once she prematurely dies. By contrast, the sterile colony members, workers and soldiers, as well as the large majority of winged dispersing reproductives, future colony founders, are produced sexually through the mating of the primary king with the primary queen or her parthenogenetic daughters.

Consequences of the AQS on the genetic structure of *R. speratus* colonies are comparable to the situation in ants, as is also its adaptive significance, proposed to be the maintenance of genetic diversity of sterile offspring and dispersing winged reproductives and maximization of the genetic contribution of the founding queen to next queen generations. Moreover, because the parthenogenetic queens also produce subsequent generations of female parthenogens that replace them, the founding queen conserves full genetic input long after her death, leading to her virtual “genetic immortality“, limited only by the lifespan of the colony as a whole (Matsuura *et al.* 2009, Matsuura 2011). Ultimately, the queen replacement by large numbers of parthenogens (up to more than 600 in some colonies) may dramatically boost the colony growth rate, despite the smaller size of the neotenic females, while representing a “life insurance” against an accidental death of the queen.

Soon after this first description of AQS in termites, a similar breeding system has been confirmed to occur in two other species of the genus *Reticulitermes*, i.e. *R. virginicus* and *R. lucifugus* (Vargo *et al.* 2012; Luchetti *et al.* 2013). Thus, AQS has been viewed for some time as a singularity restricted to a single genus of subterranean lower termites. However, the three AQS species belong to three phylogenetically and geographically distinct lineages within the species-rich genus *Reticulitermes*, suggesting an independent evolution of AQS in the three cases (Dedeine *et al.* 2016). More importantly, we showed recently that AQS also occurs in the family Termitidae (higher termites), the most modern and the most diversified and abundant termite clade. The discovery of AQS in the two unrelated Neotropical species *Embiratermes neotenicus* (Syntermitinae) (Fougeyrollas *et al.* 2015) and *Cavitermes tuberosus* (Termitinae) (Fournier *et al.* 2016), remote phylogenetically from *Reticulitermes*, suggests that the actual frequency of this outstanding breeding system across the phylogenetic diversity of Isoptera may be much higher than previously estimated.

The independent origin of AQS in the three genera becomes even more evident when we consider the cytogenetic mechanisms, underlying the restoration of diploidy during the formation of parthenogens. Unlike in *Reticulitermes*, in which the automixis with terminal fusion gives rise to practically full homozygotes for one of the maternal alleles at each locus, the ploidy restoration in *E. neotenicus* is automixis with central fusion, leading to the conservation of most heterozygous maternal allelic combinations in the parthenogens (Fougeyrollas *et al.* 2015). By contrast, the queen parthenogens in *C. tuberosus* are perfectly homozygous at all loci, suggesting yet another mechanism of ploidy restoration, the gamete duplication (Fournier *et al.* 2016).

The currently known cases of AQS prompt questions on its adaptive role and selection forces driving its multiple independent evolution in ecologically very different taxa, i.e. tropical humivorous *Embiratermes* and *Cavitermes* and temperate xylophagous *Reticulitermes*. However, detailed insights into the reproductive structure and dynamics of the presently known AQS species are hampered by the large population sizes of their colonies inhabiting large complex nests and difficulties in finding young colonies. Yet, even the limited knowledge indicates that the queen replacement by parthenogens may take place in different stages of the colony life cycle and thus provide the species with different benefits.

During our survey of breeding systems of higher termites of French Guiana, we identified *Silvestritermes minutus* (Emerson 1925) (Syntermitinae) as another candidate for AQS based on the frequent presence of multiple female nymphoid neotenic accompanied by a single primary king. Epigeous nesting in small and well-delimited nests containing relatively small colony populations and very high local abundances allow the collection of sufficient number of entire colonies at various stages of their development and a complete census of their inhabitants and enable a complex study of the breeding system genetics at the colony and population levels. Last but not least, the high nest abundances also provide an opportunity to evaluate how the breeding system, together with mating and dispersal behaviors, shapes the local population genetic structure (Ross 2001). Globally, the spatial distribution of genetic variation within and among populations is driven by a variety of processes, such as mutations, genetic drift and natural selection. Reproduction events and resulting gene flow oppose this differentiation, but at a fine spatial scale, theoretical and empirical studies allow for detailed interpretation of genetic structure in terms of mating and breeding systems and dispersal patterns (Chesser 1991; Dobson *et al.* 1998).

Therefore, we selected *S. minutus* as a suitable model enabling us to obtain a complex image of the life history, reproductive strategy and local genetic structuration. We describe *S. minutus* as a new case of AQS, report on the breeding system, genetic structure at the level of individual colonies and at the population level using 8 newly developed microsatellite markers and 4 markers used in our previous studies, reconstruct the life cycle of the colonies and dynamics of the queen replacement using 164 nests collected at 13 localities in different seasons, and test for an eventual female-biased allocation into alate dispersers, predicted to occur in AQS species (Kobayashi *et al.* 2013). Ultimately, we compare the life histories of AQS species and highlight how *S. minutus* uses the benefits of AQS for its reproductive success and propose the main adaptive roles of AQS in this species.

Material and Methods

Origin of colonies and sampling

S. minutus builds small, usually spherical or ellipsoid epigeous nests from soil material, situated most often a few centimeters above the ground level on young sprouts of the locally abundant *Astrocaryum* spp. palm trees (Arecaceae), i.e. *A. gynacanthum*, *A. sciophilum* and *A. vulgare* (Funk *et al.* 2007). The nests are penetrated with a network of roots, reinforcing the soft building material. In the central part, a hardened discoid royal chamber devoid of roots (Fig. S1) can be distinguished, containing the reproductives. Altogether 164 colonies were inspected and sampled during five missions in 2014–2016 at 13 sites along the Route to Petit Saut and by the Sinnamary river in the vicinity of the Petit Saut Dam, French Guiana (N5 02.662–N5 07.202, W53 03.295–W52 57.878). From them 132 were inspected with respect to the social composition, in 85 of them the nest size was estimated, 12 colonies were used for detailed genetic analysis of the breeding system and 42 colonies from three sites were used for the study of population genetic structure (see Fig. 1 and Table S1).

Life cycle reconstruction

The colony life cycle was reconstructed by combining the data on the social composition of colonies and the size of nests. The sampling was performed during five field missions in three consecutive years and two different seasons, i.e. April–June and October–November, referred to below as *wet season* and *dry season*, respectively. Entire nests were collected, all reproductives, nymphs and alates were scored and preserved in 96% or 80% ethanol, together with subsamples of workers and soldiers. The social structure was scored in 132 nests, in 85 of them the nest sizes were estimated from the total volume, calculated using the formula $l \times w \times h \times 0.523$ for the volume of spheroid objects, where l , w and h stand for length, width and height, respectively.

Developmental origin of neotenic queens

Developmental origin of neotenic queens was studied using morphometric analysis and by direct observations of female nymphs molting into neotenic in some of the inspected colonies. In addition, we separated 1–5 female nymphs of the 4th stage together with 20 workers and 5 soldiers from ten non-dispersing colonies into Petri dishes lined with moistened filter paper and observed their eventual molting for 60h. Nymphal stages (2nd to 5th), neotenic

queens and alates from four colonies (126 individuals) were photographed using Olympus SZH10 stereoscope + Canon D600 camera and following structures were measured in ImageJ 1.48v: head width, right fore wing pad or wing length from apex to anterior margin, left hind tibia length, width and length of pronotum and length of the growth zone of the antenna from the basis of the 3rd segment to the apex of the 9th segment counted from the antennal tip. To correct for possible size differences among colonies, the data was centralized for the head width of the 4th stage female nymphs. The data was visualized using principal component analysis in STATISTICA 8.

Development of microsatellite markers

Total genomic DNA was isolated from heads and thoraces of eight pooled samples of five *S. minutus* soldiers from two colonies, following the DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, France) protocol with a final elution in 50 µL of buffer. One milligram was used for the production of microsatellite libraries by GenoScreen (France) through 454 GS-FLX titanium pyrosequencing as described in Malausa *et al.* (2011). 4,933 sequences comprising a microsatellite array and 94 pairs of flanking primers were identified *in silico*. Eight primer pairs were biologically validated with respect to successful amplification of microsatellite sequences and desired polymorphism of the corresponding microsatellite arrays in biological samples.

Microsatellite characterization was performed using one soldier from 74 colonies collected throughout Petit Saut area. Individuals were extracted as described above and genotyped for eight *S. minutus* loci *de novo* developed for this study, for three loci developed previously for *Embiratermes neotenicus*, i.e. En-15 39 (Fougeyrollas *et al.* 2015), En-35 and En-39 (Fougeyrollas *et al.*, *in prep*), and for one locus developed for *Labiotermes labralis*, i.e. Lal-5 (Dupont *et al.* 2009). PCRs were performed in a total volume of 12.5 µL containing 1 × Qiagen Multiplex PCR Master Mix, 0.2 µM of each forward and reverse primer, 1 µL template DNA and PCR-grade water (q.s.). Following cycling conditions were used: an initial denaturation step at 95°C for 5 min followed by 35 cycles at 95°C for 30 sec, an annealing step at 60°C for 90 sec and an extension step at 72°C for 30 sec, and a final extension step at 68°C for 10 min. Genotyping was performed using an ABI PRISM® Genetic Analyzer (Applied Biosystems, genomic platform of IMRB, Mondor Institute, France). Fragment lengths were manually evaluated on chromatograms to detect inconsistencies and genotypes

were scored against the GeneScan-500 Liz® Size Standard (Applied Biosystems, France) using GENEMAPPER 5 (Applied Biosystems, France).

The number of alleles, expected and observed heterozygosities (H_E and H_O , respectively) and the fixation index (F_{IS} , Weir & Cockerham 1984) were calculated using GENETIX v. 4.05.2 (Belkhir *et al.* 2004). GENEPOP on the Web (Raymond & Rousset 1995) and FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 2001) were used to test the deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) with a sequential Bonferroni correction for multiple tests. Linkage disequilibrium between each pair of loci was tested using log-likelihood ratio statistics with GENEPOP on the Web. Large allelic dropouts, scoring errors due to stuttering, and null alleles were determined using MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004).

Breeding system analysis

Eight colonies headed by the primary king and one or two generations of neotenic females (colonies A-D, F and H-J, Table S1), and two colonies containing the primary king, the primary queen and the first generation of young neotenic females (E and G, Table S1), were selected for detailed analysis of breeding system with emphasis on the genetic origin of the neotenic females. The primary reproductives, 2–24 neotenic females, up to 10 female nymphs of the 4th stage, 15 workers (29 for the colony G where soldiers were not available) and 15 soldiers from each colony, were analyzed. In two other colonies (K and L, Table S1), 18 workers, 18 soldiers, 30 male and 30 female alate imagoes were analyzed in order to determine the genetic origin of alate dispersers. Total genomic DNA was extracted individually and all individuals were genotyped at the 12 validated microsatellite loci. Three PCR multiplexes were designed and PCRs were run using protocols and cycling conditions described above, with 0.2 mM of each primer mix (Table 1).

Parental genotypes were reconstructed for each colony from the genotypes of workers and soldiers. Inferred parental genotypes were compared with genotypes of available primary reproductives and then assigned to maternal and paternal origin. Allelic number and distribution were scored in the genotypes of neotenic females, 4th stage female nymphs and alates with respect to the presence of paternal alleles in order to test the sexual or parthenogenetic origin of these castes. The relatedness between the different castes was estimated using KINGROUP 2 (Konovalov *et al.* 2004) and tested against the theoretical value

expected for full siblings or sexually produced offspring ($r = 0.5$) by means of a one-sample t-test.

The cytogenetic mechanism of parthenogenesis was determined by calculating the rates of transition to homozygosity in the first generation of parthenogenetic neotenic queens for the loci heterozygous in their inferred (or genotyped) mothers, primary queens. These values were then compared to those expected under different modes of thelytoky by means of a χ^2 test (Pearcy *et al.* 2006).

Genetic structure of colonies and populations

The genetic structure of colonies and populations was analyzed by extracting DNA from 15 soldiers from 42 colonies, collected in 2015 at three sites located along the Route to Petit Saut and Sinnamary river: Football Field, PK24 and RR1. The three sites are situated at similar latitudes (N5 04.3–N5 04.6) along East–West axis, and distant 3.7, 5, and 8.7 km one from each other (Fig. 1, Table S1). In most of these colonies, the social composition was scored; only in some of them we collected the soldiers only without inspecting the royal chamber. The mitochondrial gene Cytochrome Oxidase II (COII) was sequenced from one soldier from each of the 42 colonies and the sequences were used to identify the relative frequencies of individual haplotypes at the three sites using DNASP 5.10. COII haplotype sequences have been deposited in GenBank under accession numbers XXXX.

Fifteen soldiers from 42 colonies were genotyped at the 12 microsatellite loci. For each colony, observed genotypes were compared to theoretical expectations under Mendelian distribution by means of a log-likelihood ratio test (G-test) summed over loci. Relatedness among the sterile colony members was estimated using KINGROUP 2. Inbreeding coefficients *sensu* Thorne *et al.* (1999) (F_{IC} , inbreeding within colonies; F_{IT} , inbreeding at the population level; F_{CT} , genetic differentiation among colonies) were calculated for the sterile castes and their significance tested by bootstrapping over loci to generate 95% confidence intervals using FSTAT 2.9.3.2. Colonies were classified into simple, extended or mixed families according to Deheer & Vargo (2004).

Bayesian clustering models implemented in STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000) and the GENELAND package in R 3.3.0 (Guillot *et al.* 2005) were applied to ten replicated datasets constructed with a single individual from each of the 42 colonies, in order to investigate population structure. STRUCTURE simulations were run with the following settings: admixture

model, LOCPRIOR model, allele frequencies correlated, a burn-in of 50,000 and 100,000 Markov chain Monte Carlo (MCMC) repetitions. Ten iterations were run for each assumed cluster ($K = 1-10$). STRUCTURE HARVESTER 0.6.94 (Earl & vonHoldt 2012) was used to determine the optimal K value following Delta K method (Evanno *et al.* 2005). Once the number of clusters was defined, all iterations were aligned using the Greedy algorithms implemented in CLUMPP (Jakobsson & Rosenberg 2007). The assignment of individuals to clusters was visualized using STRUCTURE PLOT (Ramasamy *et al.* 2014). GENELAND simulations were run using the correlated frequencies model, K was allowed to vary from 1 to 10 and 100,000 MCMC iterations were run using a thinning interval of 100.

Hierarchical F-statistics adapted for social insects were estimated at different levels using the package HIERFSTAT in R 3.3.0 (Goudet 2005): differentiation among colonies within the total population (F_{CT}); differentiation among colonies within Bayesian genetic clusters (F_{CS}) and, differentiation between clusters (F_{ST}). Significance of F-statistics was assessed from 95% confidence intervals (CI) by bootstrapping over loci. Pairwise F_{ST} between putative genetic and/or geographic clusters were estimated using ARLEQUIN 3.5.2.2 (Excoffier *et al.* 2005). Isolation by distance (IBD) was assessed from the ten-replicated datasets previously generated for clustering analysis, for each of the genetic clusters, using the package ADEGENET 2.0.1 in R 3.3.0 (Jombart 2008). The significance of the correlations between genetic and geographic distances was tested using a Mantel test with 999 permutations.

Sex ratio of dispersing reproductives and sex allocation

Sex ratio of alate reproductives was calculated for 14 complete dispersing colonies, containing alates, last and penultimate nymphal stages, collected during the wet season prior to dispersal flights. All alates and nymphs were collected from the colonies and retrieved with respect to their sex. First, we calculated the mean numerical sex ratio for the 14 colonies as proportion of females relative to all future dispersers in the colony. Second, the numerical sex ratio was corrected for the dry weight differences between female and male alates so as to represent the investment sex ratio. Dry weights were calculated for 20 ready-to-fly alates of each sex from 5 colonies, dehydrated using an ethanol series and acetone (16h), dried in a CentriVap Vacuum Concentrator (Labconco) for 2h and weighted using Sartorius 4501 Micro balance. The female : male dry weight ratio was found to be very stable across the five colonies (average of five colonial ratios = 1.148, SD = 0.0075, 95% CI = 1.141–1.154) and thus it was used as a female investment coefficient to convert the numerical into investment

sex ratios in all colonies. Both the numerical and investment sex ratios were compared with the value 0.5 expected under equal investments into each sex by means of one-sample t-tests. Third, the fact of having complete colonies with practically all future dispersers allowed us to calculate the population numerical and investment sex ratios as described in Bourke & Franks (1995) so as to consider a potential bias in sex-specific investment among colonies related to their productivity.

Results

Social composition and colony life cycle reconstruction

When evaluated separately within each of the two sampling seasons, the colonies could be classified into discrete categories defined by the social composition and non-overlapping nest sizes; 3 categories were distinguished in the wet season and 4 categories in the dry season (Figs 2 and 3). When retrieved according to the seasons and increasing nest sizes, the data allowed for a tentative reconstruction of the colony life cycle as follows (Fig. 3). Colonies are founded by a pair of alate dispersers after the dispersal flights, taking place in the late phases of the wet season; the first ready-to-fly alates were observed in the nests in mid-June. During the subsequent dry season, very small *incipient primary colonies* were observed, containing a pair of primaries, in which the female was either non-physogastric or only slightly physogastric. Some of the soldiers were markedly smaller and had narrower heads than normal soldiers, suggesting these were the so-called “first soldiers”, hatching from the first clutch laid by the queen (Fig. 2A). Until the next wet season, these colonies likely develop into *advanced primary colonies*, headed by the primary king and a highly physogastric primary queen. In most of these colonies (11 out of 18), groups of 2nd–4th stage female nymphs (2–13 individuals) were present, likely destined to become neotenic queens (Fig. 2B). In 3 cases, 1 or 2 young, non-physogastric neotenic females were also present. Until the end of the dry season of the 2nd year, the primary queen is replaced in most colonies and these transform into mid-sized *early secondary colonies*. These were headed by a primary king and 2–18 neotenic queens with a medium level of physogastry (Fig. 2C). In 2 out of 14 colonies, the primary queen was still present, in one case highly physogastric and still egg-laying, in the other case visibly senescent, with shrunk abdomen and atrophied ovaries (Fig. S2). Ten of these colonies also contained up to 34 female nymphs of the 3rd and 4th stage, two colonies also one 4th stage male nymph. In a single case, the primary king was replaced by a neotenic king. Until the wet season of the 3rd year, the colonies develop into medium-sized *advanced*

secondary colonies. Such colonies contained one primary king, 2–28 highly physogastric neotenic queens and often also 3rd and 4th stage female nymphs (2–32), likely to develop in the 2nd generation of neotenic queens (Fig. 2D). The neotenic queens showed a maximum physogastry, often exceeding that ever observed in primary queens; a maximum dry body mass in a primary queen was of 5 mg, while the largest neotenic queens from advanced secondary colonies weighed up to 17 mg. In three rare cases out of 37, these colonies also contained 1–4 male nymphs of the 4th stage. In the dry season of the 3rd year, the colonies transform into large *late secondary colonies*. They were headed by the primary king and up to 22 neotenic queens. In most colonies, two generations of female neotenic could be distinguished, i.e. old neotenic of the 1st generation, characteristic by darker pigmentation and a decrease in physogastry when compared to fully mature ones, and lighter neotenic of the 2nd generation with various levels of physogastry (Fig. 2E). These colonies are likely to proceed to the reproduction stage and become very large *dispersing colonies* during the wet season of the 4th year, containing from hundreds to thousands of 4th to 5th stage nymphs or alate dispersers (a maximum of 4,837 alates observed). Most of these colonies were devoid of any reproductives and contained only mature workers and soldiers, rarely also young brood. Only in four out of 22 dispersing colonies reproductives were present, i.e. the primary king with several neotenic queens or a group of neotenic queens without any male reproductive. The external nest structure was very different from non-dispersing colonies, with irregular shape and poorly structured external shell, often densely inhabited by alates. Also the interior of the nest was restructured and the former royal chamber mostly indistinct or missing. In the next dry season, *post-dispersal colonies* were recognized by the maximum size and the presence of 1–15 swarming outlets, used by alate dispersers to leave the colony as well as other indices of the previous dispersal, such as alate wings. These colonies were in most cases abandoned, eventually contained only sterile castes. Only in 3 out of 25 post-dispersal colonies reproductives were observed, i.e. neotenic queens with a primary king or without a functional male.

Developmental origin of neotenic queens

In three inspected colonies, we directly observed six female nymphs of the 4th stage, recognized by the size and shape of wing buds on the shed cuticle, during the moult into neotenic queens with characteristic shortened wing buds. Accordingly, in four of the ten groups of separated 4th stage female nymphs extracted from non-swarming colonies, 1–5 nymphs moulted into neotenic females within 60 hours. Within the next 6 to 12 hours, the

newly moulted neotenic females acquired the characteristic pigmentation of the head and abdominal sclerites (Fig. S3). The origin of neotenic queens from 4th stage nymphs was independently confirmed by the morphometric analysis as shown in Figure S4.

Microsatellite characteristics

The 12 microsatellite loci showed a number of alleles ranging from 2 (Sm-02) to 20 (Sm-16). No significant deviation from HWE was observed for none of the loci ($p > 0.05$) and none of the 66 pairs of loci was in significant linkage disequilibrium ($p > 0.01$). Mean observed and expected heterozygosities were 0.712 (SD = 0.262) and 0.732 (SD = 0.267), respectively. No evidence of null alleles, large allelic drop-out or stutter bands was detected. Microsatellite characteristics are summarized in Table 1.

Breeding system analysis

Parental genotype reconstruction identified a single pair of founding reproductives in each of the twelve colonies studied (A–L, Table S2) and genotypes of sterile castes did not show any significant deviation from Mendelian distribution ($p = 0.2907$ – 0.9591). Observed genotypes of sampled primary kings and queens, when present, always matched with inferred parental genotypes. The level of relatedness (r) was equal to 0.495 among workers and soldiers, to 0.494 between workers/soldiers and the primary king, to 0.474 between workers/soldiers and the inferred primary queen, and to 0.433 between workers/soldiers and neotenic females. Only the latter value was slightly but significantly different from 0.5 ($p = 0.8045$, $p = 0.7593$, $p = 0.3216$ and $p = 0.0175$, respectively).

A total of 141 neotenic females, including five females of the second generation, and 13 female nymphs of the 4th stage, were genotyped. For 135 neotenic females, including four of the second generation, and all 13 nymphs, a maximum of two alleles and three genotypes was observed per colony and locus (Table S2). Genotypes of these females were incompatible with sexual reproduction. They had only inferred/observed maternal alleles, while exclusive paternal alleles were never observed. When the mother was heterozygous, neotenic females were either heterozygous or homozygous for one of the maternal alleles at the given locus. They were strongly related to the primary queen ($r = 0.884$) but unrelated to the primary king ($r = 0.004$). Thus, most of the neotenic females and all 4th stage female nymphs were produced by thelytokous parthenogenesis. For the remaining six neotenic females, including one neotenic female of the second generation, one of the two alleles of the primary king,

including exclusive alleles, was observed at all loci. The relatedness value between these neotenic females and the primary queen ($r = 0.554$) and with the primary king ($r = 0.414$) did not significantly deviate from 0.5 ($p = 0.3987$ and 0.6999 , respectively). Thus this small portion (5%) of neotenic females was sexually produced.

We used the model predictions of Pearcy *et al.* (2006) to estimate the mode of ploidy restoration during the parthenogenetic process. Locus En-39 was discarded because only two primary queens were heterozygous at this locus. At all other loci, 3–10 primary queens were heterozygous and produced 42–132 heterozygous neotenic females of the first generation (Table S3). The rate of transition to homozygosity (R) ranged from 5 to 34% depending on the locus and all values were significantly different from those expected under apomixis and gamete duplication models. For four loci, the R values were not significantly different from those expected under automictic thelytoky with terminal fusion, central fusion, and random fusion. For the seven remaining loci, R values were not significantly different only from those expected under automixis with central fusion.

A total of 120 alates were genotyped in colonies K and L. All males (60/60) and most of the females (56/60) contained in their genotypes the alleles of both inferred colony founders, suggesting they were produced sexually. Remaining four female alates (7%) showed genotypes incompatible with sexual reproduction with the alleles of only one of the inferred parents, indicating their parthenogenetic origin (Table S2).

Genetic structure of colonies and populations

A total of six COII haplotypes was identified, with five variable sites on 678 bp. The haplotype diversity was 0.2671. Haplotype 1 was recorded in the three sampling sites, haplotypes 2 and 3 were identified exclusively in Football field and haplotypes 4, 5 and 6 were detected only in RR1 (Fig. 1).

For 35/42 colonies and all microsatellite loci, a maximum of four alleles and four genotypes were recorded in sterile castes. Observed frequencies of neutral genotypes did not deviate from expected values under Mendelian distribution of paternal and maternal alleles ($p = 0.236$ – 1). The F_{IC} value was strongly negative (-0.353 , 95% CI = -0.373 – -0.333), suggesting a low number of reproductives and the F_{IT} value was not significant (0.005 , 95% CI = -0.016 – 0.027), indicating the absence of inbreeding. Relatedness among workers/soldiers ($r = 0.51$) was not significantly different from 0.5 ($p = 0.3854$). These results suggested a simple family

organization with an outbred pair of founding reproductives (Table 2). For 3/42 colonies, we observed a maximum of four alleles but more than four genotypes for at least two loci, a significant F_{IT} value (0.158, 95% CI = 0.072–0.244) and a strongly negative F_{IC} value (-0.303, 95% CI = -0.347–0.251), a pattern corresponding to extended families with low numbers of neotenic (Table 2). In the remaining 4 colonies, more than four alleles were recorded for at least three microsatellite loci and more than four genotypes were observed for at least five loci, a pattern consistent with mixed families (Table 2).

STRUCTURE showed no evidence for population structure for all replicated datasets. The optimal value of K , determined by the Delta K method, ranged from 2 to 9 depending on the replicates. Whatever the K retained, the posterior probabilities of assignment of each individual were distributed across all of the K clusters (Fig. S6). On the contrary, GENELAND identified three clusters ($K = 3$) for seven of the ten replicated datasets. In five of these replicates, a large majority of Football field colonies, PK24 colonies and RR1 colonies were assigned to three different clusters corresponding to geographic sites. For two replicates, Football field colonies were allocated to the first cluster and PK24 + RR1 colonies to the second cluster and no colony was assigned to the last cluster. Among the remaining three replicated datasets, two replicates identified two genetic clusters ($K = 2$) with Football field colonies allocated to the first cluster and PK24 + RR1 colonies to the second cluster and one replicate identified four clusters ($K = 4$) with Football field colonies assigned to the first cluster, PK24 colonies to the second cluster, RR1 colonies to the third cluster and no colony was allocated to the last cluster. In sum, the hypothesis $K = 3$ (comprising $K = 4 - 1$ “ghost” cluster) corresponded to geographical sites with Football field, PK24, and RR1 defining different genetic clusters (6/10 replicates) and $K = 2$ (comprising $K = 3 - 1$ “ghost” cluster) matched with the isolation of Football field against PK24 and RR1 gathered in one cluster (4/10 replicates). All replicated datasets showed that Football field colonies were assigned to a distinct genetic cluster (Fig. S5).

Hierarchical F-statistics analysis indicated a genetic differentiation at different levels with significant values of F_{CT} (0.2677, 95% CI = 0.2565–0.2796), F_{CS} (0.2498, 95% CI = 0.2401–0.2611) and F_{ST} (0.0239, 95% CI = 0.0144–0.0342). The global F_{ST} value, comprised between 0 and 0.05, suggested a low genetic differentiation between the three sampling sites according to Wright (1978). Pairwise F_{ST} comparison was also performed to evaluate the differentiation between sampling and/or GENELAND clusters. When $K = 3$, Football field was slightly differentiated from RR1 ($F_{ST} = 0.0386$, $p < 0.05$, 1023 permutations) but moderately

differentiated from PK24 ($F_{ST} = 0.0511$, $p < 0.05$, 1023 permutations), and PK24 was little differentiated from RR1 ($F_{ST} = 0.0321$, $p < 0.05$, 1023 permutations). When $K = 2$, Football field was little differentiated from PK24 and RR1 together ($F_{ST} = 0.0366$, $p < 0.05$, 1023 permutations).

No significant evidence for isolation by distance was detected among colonies within GENELAND clusters (Fig. 4). The Mantel test showed no significant correlation between genetic and geographic distances inside each genetic cluster for all the replicated datasets ($R = -0.132$ – -0.196 , $p > 0.05$, 999 permutations), except for a single replicate dataset in Football field, two replicates in PK24 and two replicates in the cluster consisting of PK24 and RR1, showing a significant correlation.

Sex ratio of dispersing reproductives and sex allocation

We collected all alates, last or penultimate stage nymphs (23,403 individuals) in 14 dispersing colonies in the wet seasons 2015 and 2016, with the mean of 1,672 (SD = 1215) and a maximum of 4,837 future dispersers per colony. The average numerical colonial sex ratio was slightly though not significantly male biased (mean = 0.480, SD = 0.054, $t = -1.402$, $p = 0.18$) and the colonial investment sex ratio was very close and not significantly different from the value expected under equal sex investment (mean = 0.514, SD = 0.054, $t = 0.93$, $p = 0.366$) (Fig. 5). At the population level, the numerical sex ratio was calculated to be slightly but significantly male biased (mean = 0.470, 95% CI = 0.444–0.496), while the population investment sex ratio revealed to be perfectly egalitarian (0.504, 95% CI = 0.478–0.531) (Fig. 5).

Discussion

In this study, we identify *Silvestritermes minutus* as a new species of higher termites with the outstanding reproductive strategy Asexual Queen Succession. We show that the colonies are established by a pair of outbred primary reproductives and that the founding queens are as early as during the second year of the colony life cycle replaced by relatively low numbers of highly fecund neotenic queens. These develop from the 4th stage nymphs, mostly arising from unfertilized eggs through automictic thelytokous parthenogenesis with central fusion. By contrast, workers, soldiers and most alate dispersing reproductives are produced by a conventional sexual process. After the primary queen replacement, the neotenic queens reproduce with the present primary king and are eventually complemented by a new

generation of their own parthenogens. The colony reproduction is most often restricted to a single large dispersal of male and female alates, produced in egalitarian sex ratios, taking place three years after the colony establishment. Soon after, most colonies decline and disappear. Majority of colonies were single families. The few exceptions were evaluated as extended, inbred families or rarely as mixed families, i.e. colonies resulting from pleometrosis or fusion of colonies. Fine-scale spatial analysis indicated the absence of isolation by distance and low population structuration, suggesting long-range dispersal flight of alates (up to several kilometers) and few barriers to gene flow in the studied area.

S. minutus adds to the list of higher termites with AQS, together with the first two cases that were recently described in two other Neotropical species, *Embiratermes neotenicus* (Fougeyrollas *et al.* 2015) and *Cavitermes tuberosus* (Fournier *et al.* 2016). The genus *Silvestritermes* is phylogenetically remote from *Cavitermes*, each of them belonging to another subfamily of Termitidae, as well as from *Embiratermes* within Syntermitinae (Rocha *et al.* 2012; Kyjaková *et al.* 2016). Therefore, it likely represents another case of independent AQS evolution in higher termites, in addition to the multiple occurrences in the lower termite genus *Reticulitermes* (Dedeine *et al.* 2016). The polyphyletic origin of AQS is reflected also in the diversity of cytogenetic mechanisms of the parthenogenetic process in different lineages. Automixis with terminal fusion described in *Reticulitermes* (Matsuura *et al.* 2009; Vargo *et al.* 2012; Luchetti *et al.* 2013) and gamete duplication observed in *C. tuberosus* (Fournier *et al.* 2016) are complemented by automixis with central fusion in *E. neotenicus* (Fougeyrollas *et al.* 2015). Our data for *S. minutus* provide a robust support to automixis with central fusion as well. The rate of transition to homozygosity during the formation of queen parthenogens was consistent with theoretical predictions for central fusion at all 12 analyzed loci, the variability among individual loci (5–34%) being likely due to their different positions at the chromosomes and thus different probabilities of recombination (Pearcy *et al.* 2011). Thus, the mode of ploidy restoration in *S. minutus* is identical with the one proposed for the phylogenetically relatively closest AQS species, *E. neotenicus*.

The description of the new case of AQS in *S. minutus* invokes once again the question on the real incidence of this reproductive strategy in Isoptera. The currently known cases do not provide a clear image of determinants promoting the evolution of AQS. On the one hand, there is no intelligible clue in the diversified life histories, feeding habits and ecology of these species, on the other hand, for each AQS species several related, sympatric and ecologically close species can be listed, that are positively lacking AQS. In case of *S. minutus*, the

congeneric species *S. heyeri* is a widespread South American species living in sympatry with *S. minutus* in large overlapping distribution areas of both species. Both are humivorous and locally very abundant, one of apparent ecological differences is larger body and population sizes in *S. heyeri* nests, situated usually several decimeters above ground on the trunks of grown trees. A careful inspection of numerous *S. heyeri* nest did not provide any indices of queen replacement in this species, even large nests were always headed by a single primary king and one highly physogastric primary queen (personal observation).

Along with the multitude of independent origins and different mechanisms underlying the parthenogenetic process, also the adaptive significance of AQS appears to differ among individual cases of AQS. In *S. minutus*, the replacement of the foundress by parthenogenetic neotenic represents an obligatory event in the life cycle of the colony. Already one year after colony establishment, first female nymphs destined to replace the queen are present, and sometimes the primary queen is already accompanied by first neotenic females. While in the middle of the second year, two cases of functional or senescent primary queens were still observed, all colonies estimated to be two years old contained only fully physogastric neotenic females and a primary king. Thus, the role of the primary queen is restricted to the colony foundation and rapid production of the first generation of neotenic queens, and the colonies containing the primary queen were never observed to reproduce. Alate dispersers are exclusively produced by the primary king and the harem of neotenic queens and the dispersal takes place by the end of the third year, almost two years after the primary queen replacement. Most dispersing colonies were already devoid of reproductives and young brood, suggesting their decline after the dispersal. Accordingly, most post-dispersal colonies were abandoned or inhabited by sterile castes and only rarely these colonies contained a group of neotenic females, and only one of them also the primary king.

Therefore, the adaptive role of AQS in *S. minutus* seems to be the maximization of allocation into a single dispersal event within a very short life cycle through the replacement of one queen by multiple parthenogens. Their relatively low number (maximum of 34 neotenic females of two generations) in comparison with other AQS species is compensated by their great physogastry exceeding up to more than three times that of the primary queens. Occurrence of AQS in *S. minutus* can thus be viewed as a response to apparent vulnerability of this species to environmental pressures due to small body sizes, small nests from soft building material situated very close to the ground level and the resulting short life expectancy of the colonies. In other words, *S. minutus* benefits from AQS to boost its

population as fast as possible rather than to extend the colony lifespan. This contrasts with the limited knowledge on other AQS species. Our observations on *E. neotenicus* suggest that the primary queen is also replaced very early (Fougeyrollas *et al.* 2015), but its large and robust nests with several hundred neotenic queens and one primary king persist four or more years and regularly disperse. In *C. tuberosus*, the founding queen may survive several years and produces alate dispersers. Its replacement by the harem of parthenogens is thus a rather late and facultative event, allowing the colony to extend its lifespan once the colony successfully reproduced (Fournier *et al.* 2016). In sum, while the general benefits offered by AQS, i.e. succession of queen generations with undiluted genetic input of the foundress, multiplication of reproductive potential of the colony and prevention of inbreeding in sterile castes and dispersers, are theoretically available to all species with AQS syndrome, each of them uses these benefits at different rates and in species-specific combinations. In some of them, the lifespan extension of the colony and queen genetic immortality may be the principal advantage, while the main adaptive role of AQS seems to be the maximization of the colony reproductive rate within a short life cycle in some others.

The short lifespan of *S. minutus* colonies brings along also other consequences for the colony genetics. Within the three years of the colony life, neotenic kings only very rarely replace the primary kings. We observed only one single case of king replacement during the survey of colony social composition. Under AQS, a systematic replacement of founding primary kings by their sons, mating with the primary queens' parthenogens, has been proposed to be the driving force for female-biased sex ratio in dispersing alates due to kin selection for alleles of female origin, being more likely to be transmitted by alates to future generations (Matsuura 2011; Kobayashi *et al.* 2013). This prediction has been experimentally confirmed in two species of *Reticulitermes* with AQS; a significantly higher investment into female alates has been found to correlate with the estimated frequencies of king replacement in the two species, while being absent in congeneric species lacking the AQS breeding system (Kobayashi *et al.* 2013). By contrast, our observations in *S. minutus* do not show any asymmetries in sex allocation into alate dispersers. While the numerical sex ratio was slightly male-biased, the investment sex ratio, calculated for over 23,000 future dispersers from 14 colonies, was utterly egalitarian. In fact, these results are in line with the kin selection hypothesis, given the rarity of king replacement by neotenic males. Thus, the very rare incidence of mother-son inbreeding is unlikely to have shaped the sex ratio through kin selection. Nevertheless, the case of *S. minutus* shows that the presence of AQS cannot be predicted or excluded based on

sex ratios of dispersers alone, as previously proposed (Matsuura 2011; Vargo *et al.* 2012; Kobayashi *et al.* 2013), without considering other life history characteristics of the species.

Our data on colony breeding architectures at the population level generally corroborate the direct observations on the social composition. In most of the 42 investigated colonies (83%), the genotypes of sterile castes were consistent with expectations for simple families, indicating that they were headed either by a single pair of primary reproductives or by the founding primary king and a harem of queen parthenogens, in agreement with the observed social composition in these colonies. Three colonies were evaluated as extended families, arising from the inbreeding between parents and their offspring or brother-sister inbreeding. Our direct observations on the breeding structure and/or nest sizes revealed that all these three cases were secondary colonies headed by one primary king and a harem of neotenic females. Therefore, the observed inbreeding is not due to mating between male and parthenogenetic female neotenic; instead, it is likely due to reproduction between the primary king and neotenic females of sexual origin. Indeed, a small proportion of sexually produced neotenic females have been recorded in two of the ten colonies genotyped in detail, representing 5% of all genotyped neotenic females. The genotypes in four colonies indicated a mixed family structure, with the gene pool originating in at least three unrelated colony founders. It is noteworthy that parentage analyses in mixed families were run without individuals carrying singleton alleles in order to exclude genotyping errors or sampling of solitary foreign individuals, so that reconstructed sib patterns correspond to a representative biological mixing of the colonies. Interestingly, three of these colonies were dispersing colonies, containing hundreds of alate dispersers together with a population of sterile castes, but no functional reproductives and young brood or eggs. The fourth colony was a large colony without alates and without functional reproductives. These unexpected observations suggest mixing of the original colony population with neighboring colonies during the gradual decline of the colony preceding the dispersal, and following the disappearance of reproductives. In particular, one of the dispersing colonies showed a very clear genetic pattern corresponding to the mixing of two colonies, with two full-sib sets, each produced by a couple of parents. It is difficult to judge how frequent are the mixings of unrelated colonies in declining nests and whether they represent veritable colony fusions or only exploitation of nesting and foraging resources by neighboring prospering colonies. Nevertheless, lowered agonism resulting in colony fusions in specific phases of the life cycle and particular seasons were previously reported to occur in

some species (Clément 1986; Kaib & Brandl 1992; Bulmer *et al.* 2002), including acceptance of non-nestmates by colonies having high proportion of nymphs (Matsuura & Nishida 2001).

Because mating systems and dispersal patterns can significantly affect local population structuring, fine-scale population genetics of AQS species can also provide interesting clues to understand their ecological success. Fine-scale structuration arises when species have limited dispersal, leading to close spatial associations between relatives. In termites, short-range structuration may be due to short dispersal flights and/or budding. However, significant population viscosity has only seldom been demonstrated by fine-scale genetic studies, carried out especially on subterranean termites (reviewed in Vargo & Husseneder 2011). The AQS species *R. virginicus* and *C. tuberosus* were not exception to the rule, as they showed an absence of isolation by distance at small spatial scales, suggesting that colony foundation follows relatively long-range mating flights (> 30 m) (Vargo *et al.* 2006; Fournier *et al.* 2016). Similarly, population viscosity was not demonstrated for *S. minutus*, indicating that alates, massively produced for the single dispersal event of the colony, are able to disperse during long-range flights and successfully establish new colonies. Population structuration was nevertheless detected at a larger scale i.e. a few kilometers, as suggested by significant genetic differentiation detected between sampling sites. This structuration was weak ($F_{ST} \sim 0.03$) and STRUCTURE failed in detecting it, including when the program is allowed to make use of information about sampling locations. It has been stressed that when the data contain relatively little information, nonspatial Bayesian clustering algorithms sometimes do not provide a clear indication of population structure, even when datasets show significant F_{ST} values between samples of individuals collected at different locations (Hubisz *et al.* 2009). On the contrary GENELAND, a spatially explicit Bayesian clustering technique which exploits the spatial positions of the individual samples as a supplementary parameter in the analysis, was able to detect the weak population structure. Based on simulation studies, the GENELAND model seems appropriate to infer recent linear geographic boundaries to gene flow, such as consequences of recent fragmentation and habitat destruction (Balkenhol *et al.* 2005; Blair *et al.* 2012). Interestingly the slight genetic differentiation obtained with microsatellite data for the Football field site is corroborated by mitochondrial data. The relative genetic isolation of Football field agrees with the geographic isolation of the site, situated in a deep and flat, regularly inundated valley, surrounded by slopes of up to 30 m of altitude.

One of interesting questions related to AQS evolution is what are the mechanisms responsible for the developmental priority of parthenogenetically produced female nymphs to develop into neotenic queens and vice versa, what prevents the sexually produced nymphs from the development into female neotenic and makes them become alates. The developmental priority was previously ascribed to a multilocus homozygous determination system in the case of *Reticulitermes*, in which the queen parthenogens are homozygous at large majority of loci unlike the sexually produced alate-destined nymphs (Matsuura 2011; Yamamoto & Matsuura 2012). Yet, this hypothesis cannot explain the developmental determination in *E. neotenicus* and *S. minutus*, in which the parthenogens conserve most of the maternal heterozygosity due to automixis with central fusion. Whatever is the mechanistic basis of developmental priority of parthenogens to become neotenic, the mechanism appears not to be perfect; just as in all three *Reticulitermes* AQS species (Matsuura *et al.* 2009; Vargo *et al.* 2012; Luchetti *et al.* 2013), in *C. tuberosus* (Fournier *et al.* 2016), and also in *S. minutus*, a small proportion of neotenic females was produced sexually and, vice versa, a small portion of female alates were of parthenogenetic origin. As noted above, the intervention of sexually produced neotenic females is likely to increase the levels of inbreeding in some colonies, evaluated as extended families.

The ability to produce viable unfertilized eggs has been recorded in queens of several lower termites, including the relatively basal lineages of Archotermopsidae and Kalotermitidae (Light 1944; Afzal & Salihah 1985; Kobayashi & Miyaguni 2016), but also in higher termites (Stansly & Korman 1993). However, this capacity seems to apply only in emergency situations when the queen fails to pair with a king, and a relatively long evolutionary trajectory may be expected from this accidental parthenogenesis to true AQS, in which the thelytoky became a stable and obligatory element of the life history. During our campaign, investigating the breeding systems of higher termites in a small area of rainforest in French Guiana, as many as three different AQS species of Termitidae have been identified and several more candidates are under investigation (Hellemans *et al.* 2016). In most tropical species, details on breeding systems are unknown and rather difficult to obtain due to their nesting habits. In addition, inferences made from genetic structure of sterile castes are not much useful since they are masking the true occurrence of AQS, which is not manifested in the genotypes of sterile colony members. Therefore, we can indirectly predict here that multiple cases of AQS can be expected in termites, including the higher termites, throughout the tropics and subtropics of South America as well as other continents.

Acknowledgements

We are grateful to Czech Science Foundation (14-12774S), Grant Agency of the Charles University in Prague (358815) and to IOCB, CAS, Prague (RVO: 61388963) for financial support. We acknowledge P. Cerdan, Régis Vigouroux and the staff of the Laboratoire Environnement HYDRECO of Petit Saut (EDF-CNEH) for logistic support and A. Mougammadally for technical support.

Data Accessibility

Author Contributions

VR, YR, RH and DSD designed the study. JK, KD and RH collected the material. JK sampled all colonies and studied the lifecycle and sex allocation. RF, VR, SF and DSD developed the microsatellite markers and analyzed the genetics of colonies and populations. All authors participated on writing of the manuscript.

References

- Afzal M, Salihah Z (1985) Sex ratio, occurrence of parthenogenesis, ovarian development and oviposition behaviour of the primary reproductives of *Bifiditermes beelsoni* (Gardner) (Isoptera, Kalotermitidae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 100, 132–146.
- Balkenhol N, Cushman S, Storfer A, Waits L (2015) *Landscape Genetics: Concepts, Methods, Applications*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Barton NH, Charlesworth B (1998) Why sex and recombination? *Science*, 281, 1986–1990.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Catch F (2004) GENETIX 4.0. 5.2., Software under Windows™ for the genetics of the populations. University of Montpellier, Montpellier, France.
- Bell G (1982) *The Masterpiece of Nature: The evolution and genetics of sexuality*. University of California Press, Berkeley, California.
- Blair C, Weigel DE, Balazik M, Keeley AT, Walker FM, Landguth E, Cushman S, Murphy M, Waits L, Balkenhol N (2012) A simulation-based evaluation of methods for inferring linear barriers to gene flow. *Molecular Ecology Resources* 12, 822–833.
- Bourke AFG, Franks NR (1995) *Social Evolution in Ants*. Monographs in Behavior and Ecology. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Bulmer, M.S. & J.F.A. Traniello. 2002. Lack of aggression and spatial association of colony members in *Reticulitermes flavipes*. *Journal of Insect Behavior*, 15, 121–126.
- Chesser RK (1991) Gene diversity and female philopatry. *Genetics*, 127, 437–447.
- Clément J-L (1986) Open and closed societies in *Reticulitermes* termites (Isoptera, Rhinotermitidae): geographic and seasonal variation. *Sociobiology*, 11, 311–323.
- Dedeine F, Dupont S, Guyot S et al. (2016) Historical biogeography of *Reticulitermes* termites (Isoptera: Rhinotermitidae) inferred from analyses of mitochondrial and nuclear loci. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94, 778–790.
- Deheer CJ, Vargo EL (2004) Colony genetic organization and colony fusion in the termite *Reticulitermes flavipes* as revealed by foraging patterns over time and space. *Molecular Ecology*, 13, 431–441.
- Dobson FS, Chesser RK, Hoogland JL, Sugg DW, Foltz DW (1998) Breeding groups and gene dynamics in a socially structured population of prairie dogs. *Journal of Mammalogy*, 79, 671–680.

- Dupont L, Roy V, Bakkali A, Harry M (2009) Genetic variability of the soil-feeding termite *Labiotermes labralis* (Termitidae, Nasutitermitinae) in the Amazonian primary forest and remnant patches. *Insect Conservation and Diversity*, 2, 53–61.
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 359–361.
- Emerson AE (1925) The termites of Kartabo, Bartica District, British Guiana. *Zoologica*, 6, 291–459.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47.
- Fougeyrollas R, Dolejšová K, Sillam-Dussès D et al. (2015) Asexual queen succession in the higher termite *Embiratermes neotenicus*. *Proceedings of the Royal Society B*, 282, 20150260.
- Fournier D, Hellemans S, Hanus R, Roisin Y (2016) Facultative asexual reproduction and genetic diversity of populations in the humivorous termite *Cavitermes tuberosus*. *Proceedings of the Royal Society B*, 283, 20160196.
- Funk VA, Berry P, Alexander S, Hollowell TH, Kelloff CL (2007) Checklist of the plants of the Guiana Shield (Venezuela: Amazonas, Bolivar, Delta Amacuro; Guyana, Surinam, French Guiana). National Museum of Natural History, Washington.
- Goudet J (2001) FSTAT, version 2.9.3, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Lausanne University, Lausanne, Switzerland.
- Goudet J (2005) Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5, 184–186.
- Guillot G, Mortier F, Stoup A (2005) GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, 5, 712–715.
- Hellemans S, Fournier D, Hanus R, Roisin Y (2016) Investigating key traits for AQS emergence in Termitinae. European Meeting of the International Union for the Study of Social Insects, 8-11 August 2016, Helsinki, Finland.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1322–1332.

- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23, 1801–1806.
- Jombart, T (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24, 1403–1405.
- Kaib M, Brandl R (1992) Distribution, geographic variation and between-colony compatibility of *Schedorhinotermes lamanianus* in Kenya (Isoptera: Rhinotermitidae). In: *Biology and Evolution of Social Insects* (ed Billen J), pp. 121–131. Leuven University Press, Leuven, Belgium.
- Kobayashi K, Hasegawa E, Yamamoto Y et al. (2013) Sex ratio biases in termites provide evidence for kin selection. *Nature Communications*, 4, 2048.
- Kobayashi K, Miyaguni Y (2016) Facultative parthenogenesis in the Ryukyu drywood termite *Neotermes koshunensis*. *Scientific Reports*, 6, 30712.
- Konovalov DA, Manning C, Henshaw MT (2004) KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Molecular Ecology Notes*, 4, 779–782.
- Kyjaková P, Roy V, Jirošová A et al. (2016) Chemical systematics of Neotropical termite genera with symmetrically snapping soldiers (Termitidae: Termitinae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, doi: 10.1111/zoj.12486.
- Light SF (1944) Parthenogenesis in termites of the genus *Zootermopsis*. *University of California Publications in Zoology*, 43, 405–412.
- Luchetti A, Velonà A, Mueller M, Mantovani B (2013) Breeding systems and reproductive strategies in Italian *Reticulitermes* colonies (Isoptera: Rhinotermitidae). *Insectes Sociaux*, 60, 203–211.
- Malausa T, Gilles A, Megléc E et al. (2011) High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources*, 11, 638–644.
- Matsuura K (2011) Sexual and asexual reproduction in termites. In: *Biology of Termites: a Modern Synthesis* (eds Bignell DE, Roisin Y, Lo N), pp. 255–277. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Matsuura K, Nishida T (2001) Colony fusion in a termite: What makes the society "open"? *Insectes Sociaux*, 48, 378–383.
- Matsuura K, Vargo EL, Kawatsu K et al. (2009) Queen succession through asexual reproduction in termites. *Science*, 323, 1687.

- Maynard Smith J (1978) *The Evolution of Sex*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Pearcy M, Goodisman MAD, Keller L (2011) Sib mating without inbreeding in the longhorn crazy ant. *Proceedings of the Royal Society B*, 278, 2677–2681.
- Pearcy M, Hardy O, Aron S (2006) Thelytokous parthenogenesis and its consequences on inbreeding in an ant. *Heredity*, 96, 377–382.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Rabeling C, Kronauer DJ (2013) Thelytokous parthenogenesis in eusocial Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 58, 273–292.
- Ramasamy RK, Ramasamy S, Bindroo BB, Naik VG (2014) STRUCTURE PLOT: a program for drawing elegant STRUCTURE bar plots in user friendly interface. *SpringerPlus*, 3, 431.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248–249.
- Rocha MM, Canello EM, Carrijo TF (2012) Neotropical termites: revision of *Armitermes* Wasmann (Isoptera, Termitidae, Syntermitinae) and phylogeny of the Syntermitinae. *Systematic Entomology*, 37, 793–827.
- Ross KG (2001) Molecular ecology of social behaviour: analyses of breeding systems and genetic structure. *Molecular Ecology*, 10, 265–284.
- Schön I, Martens K, van Dijk P (2009) *Lost Sex: The Evolutionary Biology of Parthenogenesis*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Stansly PA, Korman AK (1993) Parthenogenic development in *Velocitermes* spp. (Isoptera: Nasutiterminae). *Sociobiology*, 23, 13–24.
- Thorne BL, Traniello JFA, Adams ES, Bulmer M (1999) Reproductive dynamics and colony structure of subterranean termites of the genus *Reticulitermes* (Isoptera Rhinotermitidae): a review of the evidence from behavioral, ecological, and genetic studies. *Ethology Ecology & Evolution*, 11, 149–169.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535–538.
- Vargo EL, Husseneder C (2011) Genetic structure of termite colonies and populations. In: *Biology of Termites: a Modern Synthesis* (eds Bignell DE, Roisin Y, Lo N), pp. 321–347. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

- Vargo EL, Juba TR, Deheer CJ (2006) Relative abundance and comparative breeding structure of subterranean termite colonies (*Reticulitermes flavipes*, *Reticulitermes hageni*, *Reticulitermes virginicus*, and *Coptotermes formosanus*) in a South Carolina lowcountry site as revealed by molecular markers. *Annals of the Entomological Society of America*, 99, 1101–1109.
- Vargo EL, Labadie PE, Matsuura K (2012) Asexual queen succession in the subterranean termite *Reticulitermes virginicus*. *Proceedings of the Royal Society B*, 279, 813–819.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358–1370.
- Wenseleers T, Van Oystaeyen A (2011) Unusual modes of reproduction in social insects: shedding light on the evolutionary paradox of sex. *BioEssays*, 33, 927–937.
- Yamamoto Y, Matsuura K (2012) Genetic influence on caste determination underlying the asexual queen succession system in a termite. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66, 39–46.

Tables

Tab. 1 Microsatellite loci used for the genetic study, asterisks mark *de novo* developed loci. Microsatellite characterization was performed using one soldier from 74 colonies collected throughout Petit Saut area.

Locus	Motif	Primer sequence (5'-3')	Label	N _A	Allele size range (bp)	H _E	H _O	F _{IS}
PCR multiplex 1								
Sm-02*	(tg) ₀₈	F : GGGTTGTGAAGTTGACCGTT R : GGGTCGACGATGATACAGGA	NED	2	193–197	0.171	0.162	0.060
Sm-22*	(ag) ₁₅	F : CTTGCGACGAAACGTCAGT R : TCACAACCAGTAATTGGAATGC	6FAM	18	146–196	0.889	0.904	-0.010
En-35	(ca) ₀₉	F : ACAGAGTGGCCTCTTTACGC R : CCCATTCAAGCACGTCTGTA	NED	11	127–151	0.604	0.589	0.031
En-39	(ag) ₀₉	F : GCTTCCAGTGTAATCACAATTC R : GCAGTGAGATTTGTAGCCCC	PET	5	159–171	0.212	0.216	-0.014
PCR multiplex 2								
Sm-05*	(ac) ₀₈	F : ACGCAGGGTCTTAGTGAAGC R : TTTATATCTTACATGATAATCACGGG	VIC	7	93–109	0.779	0.743	0.053
Sm-06*	(gt) ₀₉	F : AACCCACCTACAACCTGTGCC R : GCATGTGTTGGTGCACATAAAT	NED	11	147–181	0.798	0.740	0.080
Sm-16*	(ca) ₁₁	F : GGAAAGGGATAACAATAAAATCAGG R : TGCACGAACAACCTCAATGT	6FAM	20	110–158	0.930	0.932	0.004
Sm-23*	(ac) ₁₆	F : ACATGGCTTGAATCTGCTGC R : TCCACAACCTGATGATGGC	6FAM	15	263–305	0.866	0.811	0.070
Sm-25*	(ca) ₁₇	F : AAACAAACATGGCGTCCAAT R : TCAACTGATGTGGTGACAGTCT	VIC	12	194–220	0.845	0.797	0.063
Sm-27*	(ca) ₂₀	F : AGCAAACCTGACATGTGTCGC R : GAACGTAGTTGTCTTGGCAGG	PET	13	176–218	0.867	0.851	0.025
PCR multiplex 3								
Lal-5	(ca) ₁₈	F : TTTGTGGT CTGGTGCTTAT R : ATGCTGACTTTGGCAGAACG	PET	15	217–245	0.908	0.905	0.010
En-15	(ca) ₁₅	F : CGATGAGATTCCGTAGACACC R : AACCCCTAGCACCTCACATGC	NED	18	261–305	0.910	0.890	0.029

Footnote: H_E, expected heterozygosity; H_O, observed heterozygosity; N_A, number of alleles; F_{IS}, fixation index; Sm, *Silvestritermes minutus*; Lal, *Labiatermes labralis*; En, *Embiratermes neotenicus*

Tab. 2 F-statistics and relatedness coefficients for genotyped soldiers from 42 colonies.

Colony type	F_{IT}	F_{CT}	F_{IC}	r
All colonies (n = 42) (CI 95%)	0.019 (0–0.038)	0.265 (0.254–0.276)	-0.335 (-0.353– -0.316)	0.502
Simple families (n = 35) (CI 95%)	0.005 (-0.016–0.027)	0.265 (0.251–0.281)	-0.353 (-0.373– -0.333)	0.51
Extended families (n = 3) (CI 95%)	0.158 (0.072–0.244)	0.354 (0.293–0.416)	-0.303 (-0.347– -0.251)	0.476
Mixed families (n = 4) (CI 95%)	-0.001 (-0.002–0.020)	0.174 (0.174–0.013)	-0.212 (-0.237– -0.180)	0.273

Footnote: n, number of colonies; CI 95%, 95% confidence interval.

Figures

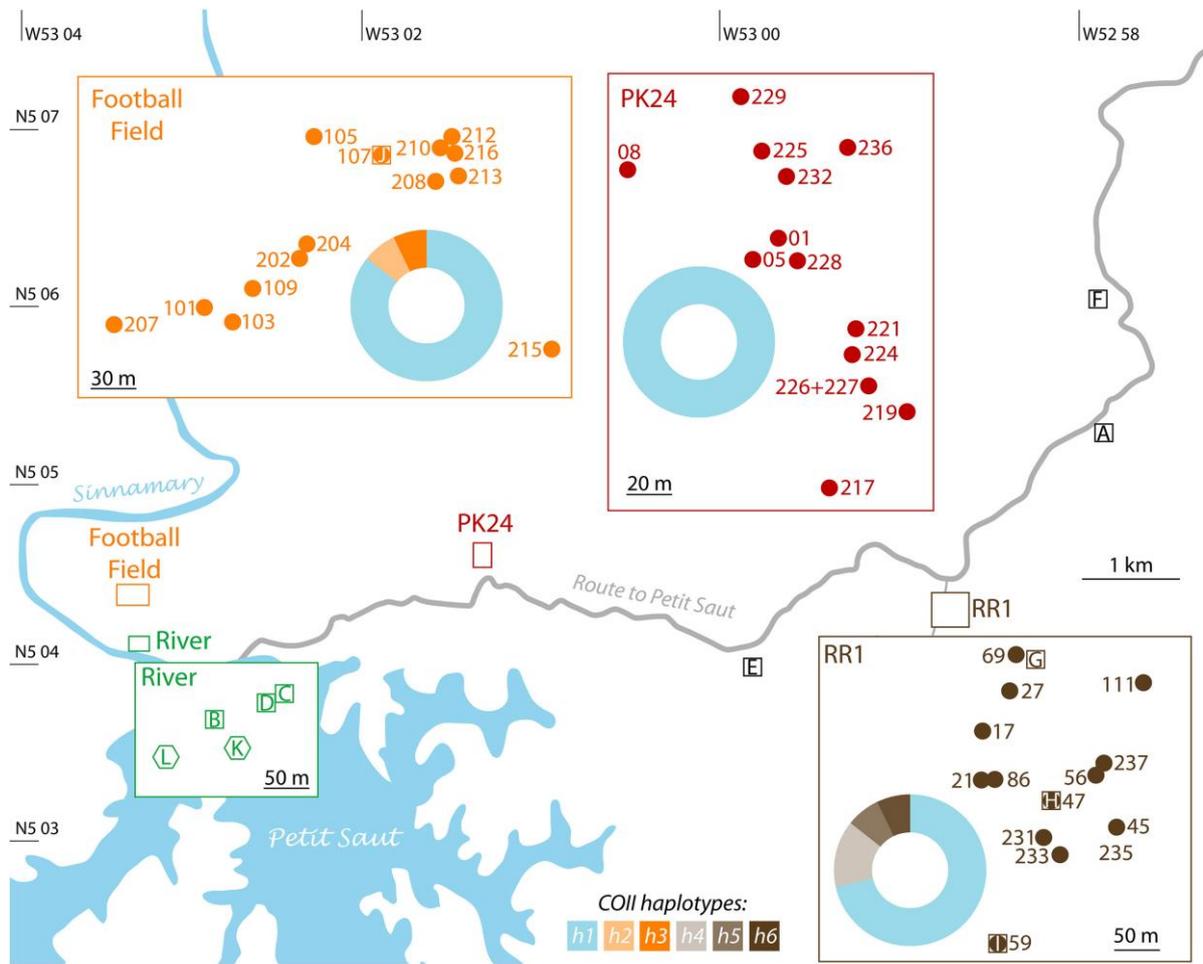


Fig. 1 Map of the study area along the Route to Petit Saut and Sinnamary river (French Guiana), indicating the colonies studied with respect to the breeding system (A-J, squares) and the genetic origin of alate dispersers (K and L, hexagons), and the 42 colonies from three sites used for the analysis of genetic structure at the population level (dots). Distribution of the six identified COII haplotypes in the three sites is indicated in the pie charts.

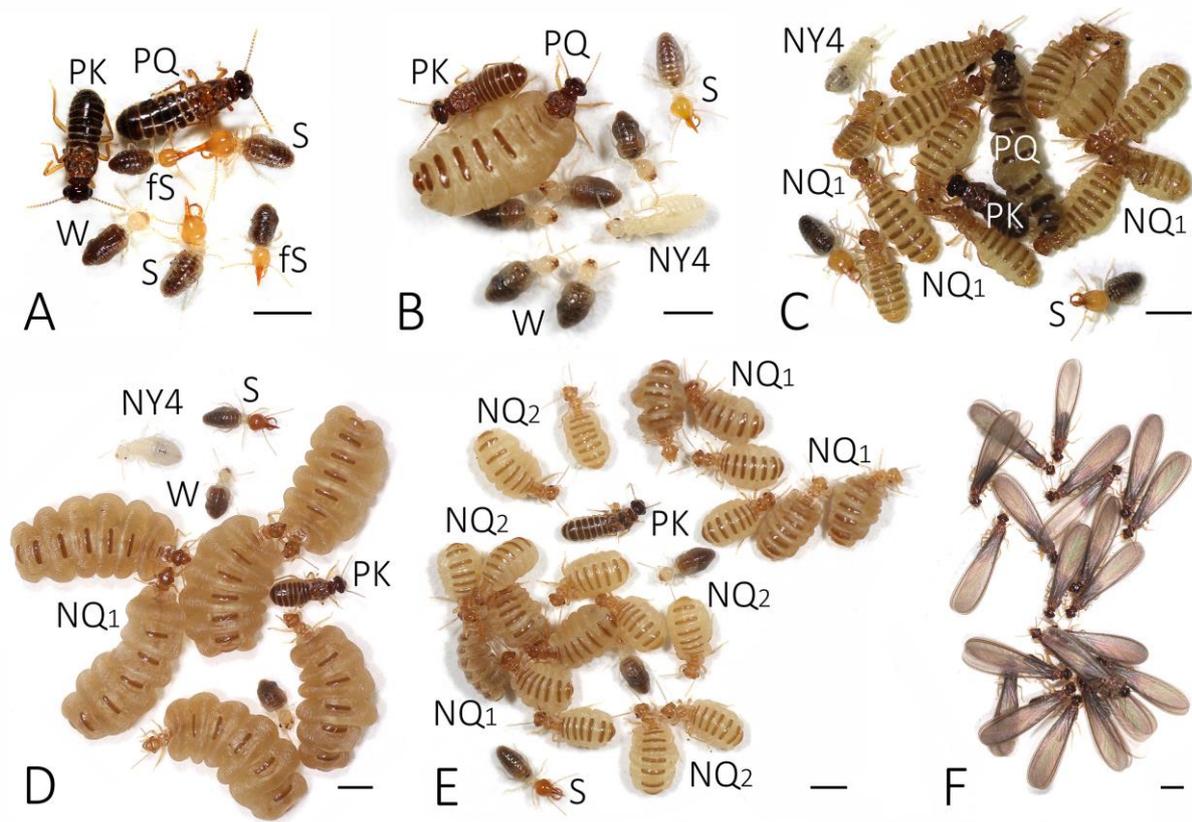


Fig. 2 Social structures of colonies in different stages of the life cycle based on observations of 132 colonies collected over three successive years in two different periods of the year. A. Incipient primary colony ca. 4 months after colony foundation. B. Advanced primary colony ca. 11 months after colony foundation. C. Early secondary colony during the replacement period, with the primary queen still present, but senescent and with atrophied ovaries, ca. 16 months after colony foundation. D. Advanced secondary colony with highly physogastric neotenic queens of the first generation, ca. 22 months of the colony life. E. Late secondary colony, with ageing neotenic queens being gradually replaced by the second generation of neotenic females, ca. 28 months of the colony existence. F. Dispersing colony containing numerous alates of both sexes and sterile castes, only rarely neotenic queens and primary king, 3 years after colony foundation. PK, primary king; PQ, primary queen; NQ₁, 1st generation neotenic queens; NQ₂, 2nd generation neotenic queens; NY4, 4th stage female nymph; S, soldier; fS, first soldier; W, worker. Scale bars represent 2 mm.

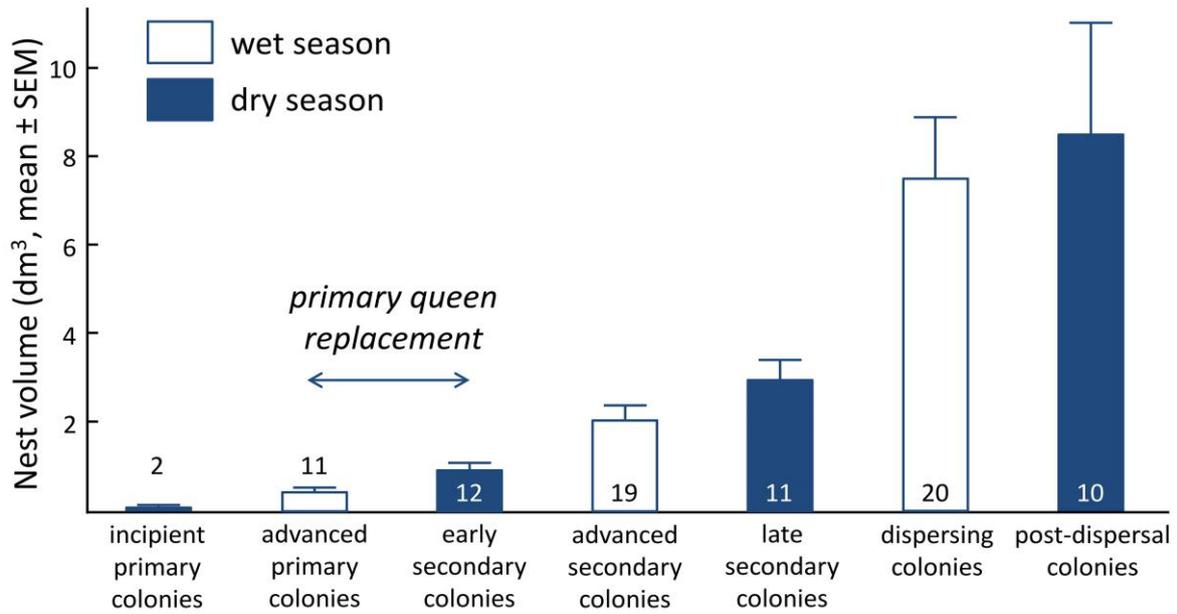


Fig. 3 Reconstruction of *S. minutus* life cycle based on the social structure of 132 colonies and nest sizes of 85 colonies, sampled over three successive years in two different periods of the year. Definitions of the social structures are given in the Results sections and in Fig. 2. Numbers by each bar represent the number of nests measured.

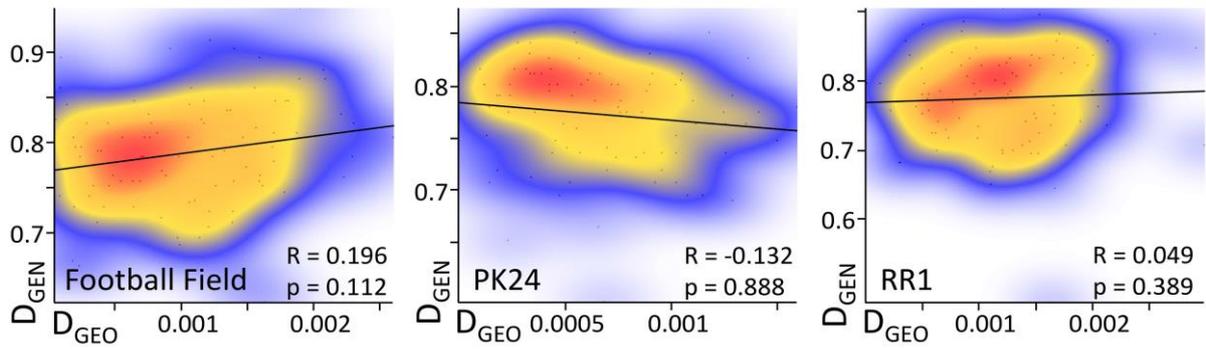


Fig. 4 Genetic structuration of populations. Example of plots obtained for the isolation by distance analysis on one replicate, for each sampling site: Football field, PK24 and RR1. Local density of points was plotted using a two-dimensional kernel density estimation. D_{GEO} , geographical distances (Euclidian distances), D_{GEN} , genetic distances (Edwards' distances).

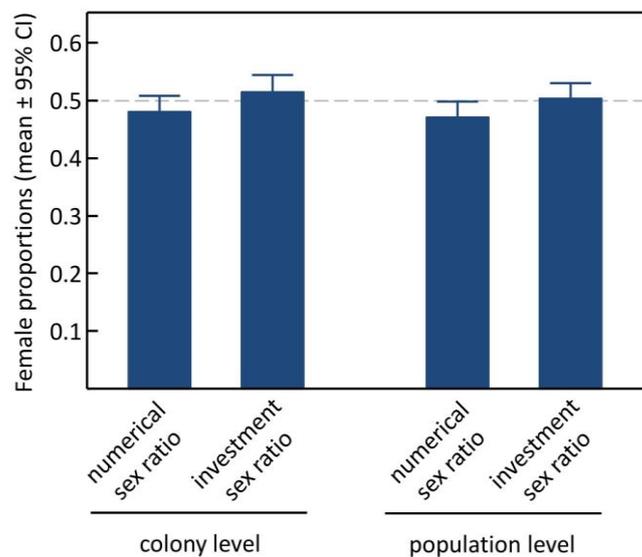


Fig. 5 Sex ratio of future alate dispersers calculated for 24,403 late stage nymphs and alates originating in 14 dispersing colonies, expressed as proportion of females. Left bars show unweighted mean proportion of females and energetic investment into females in the 14 colonies, right bars show the population values, taking into account the total productivity of each colony.

Supplementary material

Tab. S1 List of colonies sampled for the study on breeding system (white) and on the genetic structure of populations (blue).

Code	Site	GPS coordinates	Collection date	Primary queen	Primary king	Alates (♀/♂)	Neotenic ♀ 1 st /2 nd generation	4 th stage ♀ nymphs	Workers	Soldiers
A	P305	N5 05.320 W52 57.869	3.14	-	1	-	10 / 0	-	15	15
B	River	N5 04.121 W53 03.230	3.14	-	1	-	14 / 0	-	15	15
C	River	N5 04.131 W53 03.197	3.14	-	1	-	18 / 0	-	15	15
D	River	N5 04.131 W53 03.198	3.14	-	1	-	18 / 0	-	15	15
E	Maman Lézard	N5 04.005 W52 59.813	3.14	1	1	-	2 / 0	-	15	15
F	Clio	N5 06.054 W52 57.896	3.14	-	1	-	18 / 0	-	15	15
G	RR1	N5 04.430 W52 58.753	10.14	1	1	-	10 / 0	-	29	-
H	RR1	N5 04.342 W52 58.735	4.15	-	1	-	20 / 4	3	15	15
I	RR1	N5 04.257 W52 58.767	4.15	-	1	-	10 / 1	10	15	15
J	Football field	N5 04.421 W53 03.243	4.15	-	1	-	16 / 0	-	15	15
K	River	N5 04.104 W53 03.214	6.16	-	-	30 / 30	-	-	18	18
L	River	N5 04.098 W53 03.261	6.16	-	-	30 / 30	-	-	18	18
101	Football field	N5 04.366 W53 03.305	4.15	-	-	-	-	-	-	15
103	Football field	N5 04.361 W53 03.295	4.15	-	-	-	-	-	-	15
105	Football field	N5 04.427 W53 03.266	4.15	-	-	-	-	-	-	15
107	Football field	N5 04.421 W53 03.243	4.15	-	-	-	-	-	-	15
109	Football field	N5 04.373 W53 03.288	4.15	-	-	-	-	-	-	15
207	Football field	N5 04.360 W53 03.337	11.15	-	-	-	-	-	-	15
202	Football field	N5 04.384 W53 03.271	11.15	-	-	-	-	-	-	15
204	Football field	N5 04.389 W53 03.269	11.15	-	-	-	-	-	-	15
208	Football field	N5 04.411 W53 03.223	11.15	-	-	-	-	-	-	15
210	Football field	N5 04.423 W53 03.221	11.15	-	-	-	-	-	-	15
212	Football field	N5 04.427 W53 03.217	11.15	-	-	-	-	-	-	15
213	Football field	N5 04.413 W53 03.215	11.15	-	-	-	-	-	-	15
215	Football field	N5 04.351 W53 03.182	11.15	-	-	-	-	-	-	15
216	Football field	N5 04.424 W53 03.216	11.15	-	-	-	-	-	-	15
1	PK24	N5 04.634 W53 01.325	3.15	-	-	-	-	-	-	15
5	PK24	N5 04.628 W53 01.331	3.15	-	-	-	-	-	-	15
8	PK24	N5 04.650 W53 01.361	3.15	-	-	-	-	-	-	15
217	PK24	N5 04.574 W53 01.313	11.15	-	-	-	-	-	-	15
219	PK24	N5 04.592 W53 01.295	11.15	-	-	-	-	-	-	15
221	PK24	N5 04.612 W53 01.307	11.15	-	-	-	-	-	-	15
224	PK24	N5 04.605 W53 01.309	11.15	-	-	-	-	-	-	15
225	PK24	N5 04.654 W53 01.329	11.15	-	-	-	-	-	-	15
226	PK24	N5 04.598 W53 01.304	11.15	-	-	-	-	-	-	15
227	PK24	N5 04.598 W53 01.304	11.15	-	-	-	-	-	-	15
228	PK24	N5 04.628 W53 01.321	11.15	-	-	-	-	-	-	15
229	PK24	N5 04.667 W53 01.334	11.15	-	-	-	-	-	-	15
232	PK24	N5 04.648 W53 01.324	11.15	-	-	-	-	-	-	15
236	PK24	N5 04.655 W53 01.309	11.15	-	-	-	-	-	-	15
17	RR1	N5 04.383 W52 58.775	4.15	-	-	-	-	-	-	15
21	RR1	N5 04.354 W52 58.776	4.15	-	-	-	-	-	-	15
27	RR1	N5 04.408 W52 58.759	4.15	-	-	-	-	-	-	15
45	RR1	N5 04.326 W52 58.696	4.15	-	-	-	-	-	-	15
47	RR1	N5 04.342 W52 58.735	4.15	-	-	-	-	-	-	15
56	RR1	N5 04.357 W52 58.708	4.15	-	-	-	-	-	-	15
59	RR1	N5 04.257 W52 58.767	4.15	-	-	-	-	-	-	15
69	RR1	N5 04.429 W52 58.755	4.15	-	-	-	-	-	-	15
86	RR1	N5 04.354 W52 58.768	4.15	-	-	-	-	-	-	15
111	RR1	N5 04.411 W52 58.680	4.15	-	-	-	-	-	-	15
231	RR1	N05 04.319 W52 58.739	11.15	-	-	-	-	-	-	15
237	RR1	N05 04.363 W52 58.703	11.15	-	-	-	-	-	-	15

233	RR1	N05 04.310 W52 58.729	11.15	-	-	-	-	-	-	15
235	RR1	N05 04.318 W52 58.712	11.15	-	-	-	-	-	-	15

Tab. S2 Genotypes recorded in 12 *S. minutus* colonies studied with respect to the reproductive structure and genetic origin of castes. Exclusive paternal alleles in bold, genotypes unexpected under sexual reproduction in red and genotypes with exclusive paternal allele in female neotenic in blue (inf, inferred; gen, genotyped).

Colony	Caste	Locus											
		Sm-02	Sm-05	Sm-22	Sm-25	Lal-5	En-35	Sm-06	Sm-16	Sm-23	Sm-27	En-15	En-39
A	prim. queen (inf)	193/197	103/103	150/162	204/210	225/233	127/131	147/179	134/152	289/291	194/210	285/299	159/167
	prim. king (inf/gen)	193/193	103/103	180/182	204/218	223/227	127/129	147/175	142/146	291/293	206/208	275/295	159/167
	workers/soldiers												
	nb of alleles	2	1	4	3	4	3	3	4	3	4	4	2
	genotypes (30)	193/197	103/103	150/ 180	204/210	223/225	127/127	147/147	134/ 142	289/291	194/ 206	275/299	159/167
		193/193		162/ 180	204/204	223/233	127/129	175/179	142/152	291/293	206/210	285/295	159/159
				150/ 182	204/218	225/227	127/131	147/179	134/ 146	289/293	208/210	295/299	167/167
				162/ 182	210/218	227/233	129/131	147/175	146/152	291/291	194/208	275/285	
	neotenic females												
	nb of alleles	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	genotypes (10)	193/197	103/103	150/162	204/210	225/233	127/131	147/179	134/152	289/291	194/210	285/299	159/167
				150/150	204/204		127/127		152/152	289/289	194/194	299/299	159/159
										291/291			

Colony	Caste	Locus											
		Sm-02	Sm-05	Sm-22	Sm-25	Lal-5	En-35	Sm-06	Sm-16	Sm-23	Sm-27	En-15	En-39
B	prim. queen (inf)	193/197	103/103	162/178	204/208	231/235	127/141	147/181	136/146	267/269	202/208	275/303	159/159
	prim. king (inf/gen)	193/193	105/105	150/150	212/216	221/235	127/127	147/149	110/132	267/285	208/210	281/289	159/159
	workers/soldiers												
	nb of alleles	2	2	3	4	3	2	3	4	3	3	4	1
	genotypes (30)	193/193	103/ 105	150/178	208/216	221/231	127/127	147/181	110/146	267/285	202/208	289/303	159/159
		193/197		150/162	204/216	221/235	127/141	147/147	132/146	269/285	208/208	275/289	
					204/212	235/235		149/181	110/136	267/269	202/210	275/281	
					208/212	231/235		147/149	132/136	267/267	208/210	281/303	
	neotenic females												
	nb of alleles	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	genotypes (14)	193/197	103/103	162/178	204/208	231/235	127/141	147/181	136/146	267/269	202/208	275/303	159/159
				162/162	204/204		127/127	147/147	146/146	269/269	202/202	275/275	
				178/178				141/141	136/136	267/267	208/208		

Colony	Caste	Locus											
		Sm-02	Sm-05	Sm-22	Sm-25	Lal-5	En-35	Sm-06	Sm-16	Sm-23	Sm-27	En-15	En-39
C	prim. queen (inf)	193/193	93/103	150/150	212/216	229/239	127/147	177/181	114/132	267/269	202/202	289/297	159/159
	prim. king (inf/gen)	193/ 197	93/ 105	150/ 162	194/204	237/243	127/131	159/177	114/ 138	271/291	210/216	275/285	159/159
	workers/soldiers												
	nb of alleles	2	3	2	4	4	3	3	3	4	3	4	1
	genotypes (30)	193/ 197	93/ 105	150/ 162	194/216	229/ 237	127/127	159/177	132/ 138	269/291	202/210	275/297	159/159
		193/193	103/ 105	150/150	204/216	229/ 243	127/147	159/181	114/ 138	269/271	202/216	275/289	
		93/93		204/212	237/239	127/ 131	177/181	114/132	267/271		285/297		

		93/103		194/212	239/243	131/147	177/177	114/114	267/291		285/289	
neotenic females												
nb of alleles	1	2	1	3	3	3	3	3	3	2	3	1
genotypes (18)	193/193	93/103	150/150	212/216	229/239	127/147	177/181	114/132	267/269	202/202	289/297	159/159
		93/93		212/212	229/229	147/147	181/181	114/114	269/269	202/210	289/289	
		103/103		194/216	237/239	127/127	159/181	132/132	267/267		297/297	
						131/147		132/138	269/271		275/297	

Colony	Caste	Locus											
		Sm-02	Sm-05	Sm-22	Sm-25	Lal-5	En-35	Sm-06	Sm-16	Sm-23	Sm-27	En-15	En-39
D	prim. queen (inf)	193/197	97/109	182/184	204/212	221/239	127/131	147/179	124/132	271/293	202/206	293/297	159/167
	prim. king (inf/gen)	193/193	101/103	182/184	212/216	239/241	141/141	177/181	128/148	269/271	208/210	291/295	159/159
	workers/soldiers												
	nb of alleles	2	4	2	3	3	3	4	4	3	4	4	2
	genotypes (30)	193/197	97/103	182/184	214/212	221/239	127/ 141	179/181	128/132	271/293	202/ 208	293/295	159/159
		193/193	101/109	184/184	204/216	221/241	131/141	147/181	132/148	271/271	206/208	291/293	159/167
			103/109	182/182	212/212	239/239		177/179	124/148	269/293	202/210	295/297	
			97/101		212/216	239/241		147/177	124/128	269/271	206/210	291/297	
	neotenic females												
	nb of alleles	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
genotypes (18)	193/197	97/109	182/184	204/212	221/239	127/131	147/179	124/132	271/293	202/206	293/297	159/159	
	193/193	97/97	184/184	212/212	221/221	127/127	147/147	132/132	271/271	206/206	297/297		
			182/182				179/179			202/202	293/293		

Colony	Caste	Locus											
		Sm-02	Sm-05	Sm-22	Sm-25	Lal-5	En-35	Sm-06	Sm-16	Sm-23	Sm-27	En-15	En-39
E	prim. queen (inf/gen)	193/193	103/105	176/182	212/216	219/227	131/147	161/177	136/142	267/271	206/210	275/279	167/167
	prim. king (inf/gen)	193/193	103/103	150/176	206/212	239/239	127/133	147/177	142/142	271/271	206/208	281/303	159/159
	workers/soldiers												
	nb of alleles	1	2	3	3	3	4	3	2	2	3	4	2
	genotypes (30)	193/193	103/105	176/176	206/212	219/ 239	127/147	147/177	142/142	267/271	206/206	275/281	159/167
			103/103	150/176	206/216	227/239	133/147	177/177	136/142	271/271	208/210	279/303	
				150/182	212/216		131/133	161/177			206/208	275/303	
				176/182	212/212		127/131	147/161			206/210	279/281	
	neotenic females												
	nb of alleles	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1
genotypes (2)	193/193	103/105	176/176	216/216	219/227	131/131	177/177	136/142	267/267	206/206	275/279	167/167	
			182/182	212/216		131/147	161/177		267/271				

Colony	Caste	Locus											
		Sm-02	Sm-05	Sm-22	Sm-25	Lal-5	En-35	Sm-06	Sm-16	Sm-23	Sm-27	En-15	En-39
F	prim. queen (inf)	193/193	97/103	174/186	206/208	223/249	133/141	147/149	126/142	265/271	204/210	291/293	159/159
	prim. king (inf/gen)	193/193	105/105	180/180	210/214	237/237	127/127	147/147	116/116	269/269	206/206	275/275	159/167
	workers/soldiers												
	nb of alleles	1	3	3	4	3	3	2	3	3	3	3	2
	genotypes (30)	193/193	103/105	180/186	208/210	223/237	127/141	147/147	116/142	265/269	206/210	275/291	159/159
			97/105	174/180	206/210	237/249	127/133	147/149	116/126	269/271	204/206	275/293	159/167
					206/214								
					208/214								
	neotenic females												
	nb of alleles	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
genotypes (18)	193/193	97/103	174/186	206/208	223/249	133/141	147/149	126/142	265/271	204/210	291/293	159/159	
		103/103	186/186	208/208		133/133		126/126	271/271	204/204	291/291		
		97/97	174/174	206/206		141/141		142/142	265/265	210/210	293/293		

Colony	Caste	Locus											
		Sm-02	Sm-05	Sm-22	Sm-25	L.al-5	En-35	Sm-06	Sm-16	Sm-23	Sm-27	En-15	En-39
G	prim. queen (inf/gen)	193/193	103/105	150/182	204/216	229/231	127/127	147/147	134/146	263/271	200/206	281/297	159/159
	prim. king (inf/gen)	193/193	93/105	176/182	208/210	227/235	133/147	147/177	136/144	263/271	208/210	287/295	159/159
	workers												
	nb of alleles	1	3	3	4	4	3	2	4	2	4	4	1
	genotypes (29)	193/193	93/103	150/182	208/216	227/229	127/133	147/147	134/136	263/271	200/210	287/297	159/159
			105/105	182/182	204/210	227/231	127/147	147/177	144/146	263/263	206/208	281/295	
			93/105	176/182	204/208	229/235			136/146	271/271	200/208	295/297	
			103/105	150/176	210/216	231/235			134/144		206/210	281/287	
	neotenic females												
	nb of alleles	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1
genotypes (10)	193/193	103/105	150/182	204/216	229/231	127/127	147/147	134/146	263/271	200/206	281/297	159/159	
		103/103	150/150		231/231			134/134	263/263	200/200	281/281		

Colony	Caste	Locus											
		Sm-02	Sm-05	Sm-22	Sm-25	L.al-5	En-35	Sm-06	Sm-16	Sm-23	Sm-27	En-15	En-39
H	prim. queen (inf)	193/193	93/103	162/182	194/210	225/241	127/127	159/177	126/136	267/293	210/214	281/293	159/159
	prim. king (inf/gen)	193/193	93/101	178/184	202/218	221/231	127/127	159/177	128/136	269/271	214/218	281/291	159/171
	workers/soldiers												
	nb of alleles	1	3	4	4	4	1	2	3	4	3	3	2
	genotypes (30)	193/193	101/103	182/184	210/218	221/241	127/127	159/177	128/136	267/271	214/218	281/281	159/159
			93/103	178/182	202/210	231/241		159/159	126/128	269/293	210/214	281/291	159/171
			93/93	162/178	194/218	221/225		177/177	136/136	271/293	214/214	281/293	
			93/101	162/184	194/202	225/231			126/136	267/269	210/218	291/293	
	neotenic females												
	nb of alleles	1	2	4	4	4	1	2	3	4	3	3	1
genotypes (20)	193/193	103/103	162/182	194/210	225/241	127/127	159/177	126/136	267/293	210/214	281/293	159/159	
		93/103	162/162	194/194	241/141		159/159	126/126	267/267	210/210	281/281		
			182/182	210/210	221/241		177/177	136/136	271/293	214/214	293/293		
			182/184	210/218	231/241			126/128	267/269	210/218	291/293		
			162/178	202/210	221/225			128/136		214/218	281/291		
2nd gen.			162/184	194/218									
neotenic females													
nb of alleles	1	2	3	3	3	1	2	2	2	2	3	1	
genotypes (4)	193/193	93/103	162/178	194/218	221/225	127/127	159/177	136/136	267/267	210/214	281/291	159/159	
		103/103	162/182	194/210	225/241		177/177	126/126	267/293	214/214	281/293		
				194/194	241/241					210/210			
				210/210									
4th stage													
female nymphs													
nb of alleles	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	
genotypes (3)	193/193	103/103	162/162	194/194	225/241	127/127	159/177	136/136	267/267	210/214	281/293	159/159	
			162/182	194/210	241/241		177/177	126/126	267/293	210/210			

Colony	Caste	Locus											
		Sm-02	Sm-05	Sm-22	Sm-25	Lal-5	En-35	Sm-06	Sm-16	Sm-23	Sm-27	En-15	En-39
I	prim. queen (inf)	193/193	93/101	176/184	202/206	233/233	127/133	159/177	140/142	269/277	200/208	289/303	159/159
	prim. king (inf/gen)	193/193	103/105	172/178	206/218	229/243	127/133	147/173	136/140	269/271	176/214	275/291	159/159
	workers/soldiers												
	nb of alleles	1	4	4	3	3	2	4	3	3	4	4	1
	genotypes (30)	193/193	101/ 103	172/176	206/206	229/233	127/127	159/173	140/140	269/271	200/214	275/289	159/159
			93/105	178/184	202/218	233/243	133/133	147/159	140/142	269/269	208/214	275/303	
			101/105	176/178	202/206		127/133	173/177	136/140	269/277	176/200	289/291	
			93/103	172/184	206/218			147/177	136/142	271/277	176/208	291/303	
	neotenic females												
	nb of alleles	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	1
	genotypes (10)	193/193	93/101	176/184	202/206	233/233	127/133	159/177	140/142	269/277	200/208	289/303	159/159
			93/93	176/176					140/140	269/269	200/200		
	2nd gen.		101/101							277/277			
	neotenic females												
	nb of alleles	1	1	2	2	1	2	2	1	2	1	2	1
	genotypes (1)	193/193	93/93	176/184	202/206	233/233	127/133	159/177	140/140	269/277	200/200	289/303	159/159
	4th stage												
female nymphs													
nb of alleles	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	
genotypes (10)	193/193	93/101	176/184	202/206	233/233	127/127	159/159	140/142	269/277	200/200	289/303	159/159	
		93/93	176/176	206/206		127/133	159/177	140/140	277/277	200/208	289/289		
		101/101				133/133		142/142		208/208			

Colony	Caste	Locus											
		Sm-02	Sm-05	Sm-22	Sm-25	Lal-5	En-35	Sm-06	Sm-16	Sm-23	Sm-27	En-15	En-39
J	prim. queen (inf)	193/193	101/105	182/182	210/212	233/241	127/127	149/149	128/138	263/269	202/216	289/289	159/159
	prim. king (inf/gen)	193/193	93/105	150/176	204/216	223/239	127/145	149/181	126/138	263/295	202/214	289/305	159/159
	workers/soldiers												
	nb of alleles	1	3	3	4	4	2	2	3	3	3	2	1
	genotypes (30)	193/193	101/105	150/182	204/212	239/241	127/127	149/149	126/138	269/295	214/216	289/289	159/159
			93/101	176/182	210/216	223/233	127/145	149/181	126/128	263/269	202/216	289/305	
			93/105		212/216	223/241			128/138	263/263	202/202		
			105/105		204/210	233/239			138/138	263/295	202/214		
	neotenic females												
	nb of alleles	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1
	genotypes (16)	193/193	101/105	182/182	210/212	233/241	127/127	149/149	128/138	263/269	202/216	289/289	159/159
			101/101		212/212				138/138	269/269	216/216		
									128/128	263/263	202/202		

Colony	Caste	Locus											
		Sm-02	Sm-05	Sm-22	Sm-25	Lal-5	En-35	Sm-06	Sm-16	Sm-23	Sm-27	En-15	En-39
K	parent 1 (inf)	193/193	93/97	150/158	208/214	221/233	127/127	149/159	132/140	267/269	208/214	261/261	159/159
	parent 2 (inf)	193/193	97/103	172/182	210/216	225/239	127/127	177/177	132/134	269/273	176/202	275/291	159/167
	workers/soldiers												
	nb of alleles	1	3	4	4	4	1	3	3	3	4	3	2
	genotypes (36)	193/193	93/97	150/172	208/210	221/239	127/127	149/177	132/140	267/269	176/208	261/291	159/159
			97/103	150/182	208/216	221/225		159/177	132/134	267/273	176/214	261/275	159/167
			97/97	158/182	210/214	225/233			132/132	269/273	202/208		
			93/103	158/172	214/216	233/239			134/140	269/269	202/214		
	female alates												
	nb of alleles	1	3	4	4	4	1	3	3	3	4	3	2
	genotypes (30)	193/193	93/97	150/172	208/210	221/239	127/127	149/177	132/140	267/269	176/208	261/291	159/159
			97/103	150/182	208/216	221/225		159/177	132/134	267/273	176/214	261/275	159/167
			97/97	158/182	210/214	225/233		177/177	132/132	269/273	202/208	275/275	
			93/103	158/172	214/216	233/239			134/140	269/269	202/214		
				172/182	210/210	225/239			134/134		202/202		
male alates													
nb of alleles	1	3	4	4	4	1	3	3	3	4	3	2	
genotypes (30)	193/193	93/97	150/172	208/210	221/239	127/127	149/177	132/140	267/269	176/208	261/291	159/159	
		97/103	150/182	208/216	221/225		159/177	132/134	267/273	176/214	261/275	159/167	
		97/97	158/182	210/214	225/233			132/132	269/273	202/208			
		93/103	158/172	214/216	233/239			134/140	269/269	202/214			

Colony	Caste	Locus											
		Sm-02	Sm-05	Sm-22	Sm-25	Lal-5	En-35	Sm-06	Sm-16	Sm-23	Sm-27	En-15	En-39
L	parent 1 (inf)	193/193	103/103	174/184	212/216	239/241	127/127	149/159	134/148	267/293	196/210	275/275	159/159
	parent 2 (inf)	193/193	101/103	150/174	210/220	223/235	127/127	177/179	140/136	269/269	202/210	291/303	159/159
	workers/soldiers												
	nb of alleles	1	2	3	4	4	1	4	4	3	3	3	1
	genotypes (36)	193/193	103/103	150/174	210/216	223/239	127/127	149/179	134/136	267/269	196/210	275/291	159/159
			101/103	150/184	210/212	223/241		149/177	134/140	269/293	196/202	275/303	
				174/174	212/220	235/239		159/179	136/148		202/210		
				174/184	216/220	235/241		159/177	140/148		210/210		
	female alates												
	nb of alleles	1	2	3	4	4	1	4	4	3	3	3	1
	genotypes (30)	193/193	103/103	150/174	210/216	223/239	127/127	149/179	134/136	267/269	196/210	275/291	159/159
			101/103	150/184	210/212	223/241		149/177	134/140	269/293	196/202	275/303	
			101/101	174/174	212/220	235/239		159/179	136/148	269/269	202/210	291/303	
				174/184	216/220	235/241		159/177	140/148		210/210	303/303	
					210/220	223/235		149/159	140/140				
				210/210			149/149	136/136					
male alates													
nb of alleles	1	2	3	4	4	1	4	4	3	3	3	1	
genotypes (30)	193/193	103/103	150/174	210/216	223/239	127/127	149/179	134/136	267/269	196/210	275/291	159/159	
		101/103	150/184	210/212	223/241		149/177	134/140	269/293	196/202	275/303		
			174/174	212/220	235/239		159/179	136/148		202/210			
			174/184	216/220	235/241		159/177	140/148		210/210			

Tab. S3 Transitions to homozygosity in parthenogenetic females. PQ_{het} , number of heterozygous inferred primary queens; NF_{tot} , total number of the first generation parthenogenetic neotenic females from a heterozygous mother; NF_{hom} , number of homozygous parthenogenetic neotenic females; R , observed rate of transition to homozygosity; r , expected generational rate of transition to homozygosity; NS, not significant; ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$.

Locus	PQ_{het}	NF from PQ_{het}	NF_{hom}	R	Apomixis		Automixis		
						Gamete duplication	Terminal fusion	Central fusion	Random fusion
					($r = 0$)	($r = 1$)	($r = 0.33-1$)	($r = 0-0.33$)	($r = 0.33$)
Sm02	3	42	3	0.07	***	***	***	NS	***
Sm05	7	96	33	0.34	***	***	NS	NS	NS
Sm22	8	96	18	0.19	***	***	**	NS	**
Sm25	10	130	19	0.15	***	***	***	NS	***
Lal-05	9	117	6	0.05	***	***	***	NS	***
En-35	7	89	25	0.28	***	***	NS	NS	NS
Sm06	8	118	11	0.09	***	***	***	NS	***
Sm16	10	132	36	0.27	***	***	NS	NS	NS
Sm23	9	116	30	0.26	***	***	**	NS	**
Sm27	9	115	35	0.30	***	***	NS	NS	NS
En15	9	117	22	0.19	***	***	**	NS	**

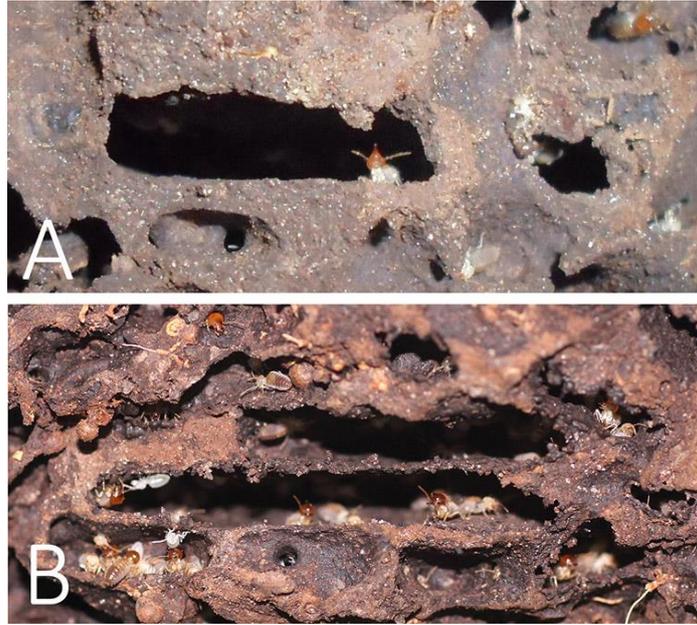


Fig. S1 Cross section of the royal chambers of *S. minutus* nests. A. Simple one floor royal chamber in a primary colony. B. Two floor royal chamber in a secondary colony.

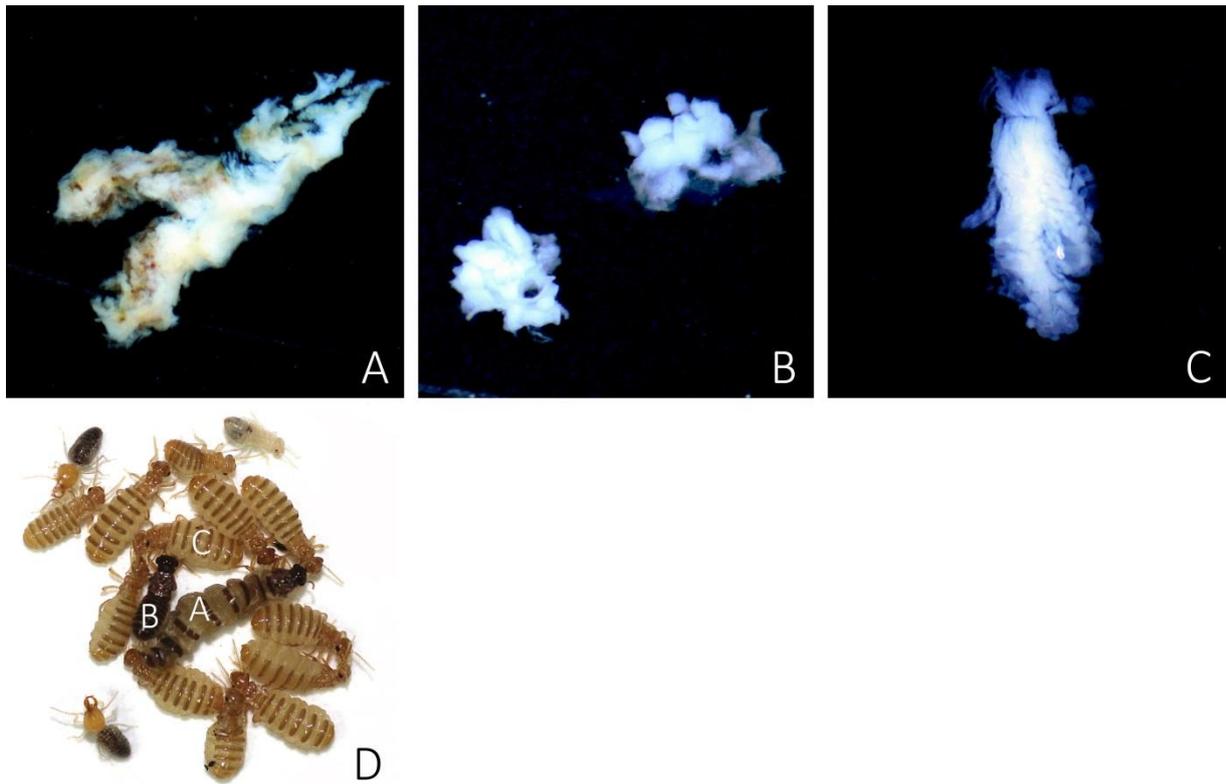


Fig. S2 Gonads dissected from reproductives found in an early secondary colony during the primary queen replacement. A. Atrophied ovaries of the primary queen. B. Testes of the primary king. C. Developing ovaries of the neotenic queen. D. Photograph of the colony with dissected individuals marked (A, primary queen; B, primary king; C, neotenic queen).



Fig. S3 Development of neotenic queens. A. 4th stage female nymph moulting into a neotenic. Arrows show the 4th stage nymph wing pads shed with the old cuticle. B. Freshly moulted neotenic female, acquiring the body pigmentation. C. Mature neotenic queen, reaching maximum physogastry in mature secondary colonies. D. Senescent neotenic queen of the 1st generation found in a late secondary colony. Scale bar indicates 1 mm.

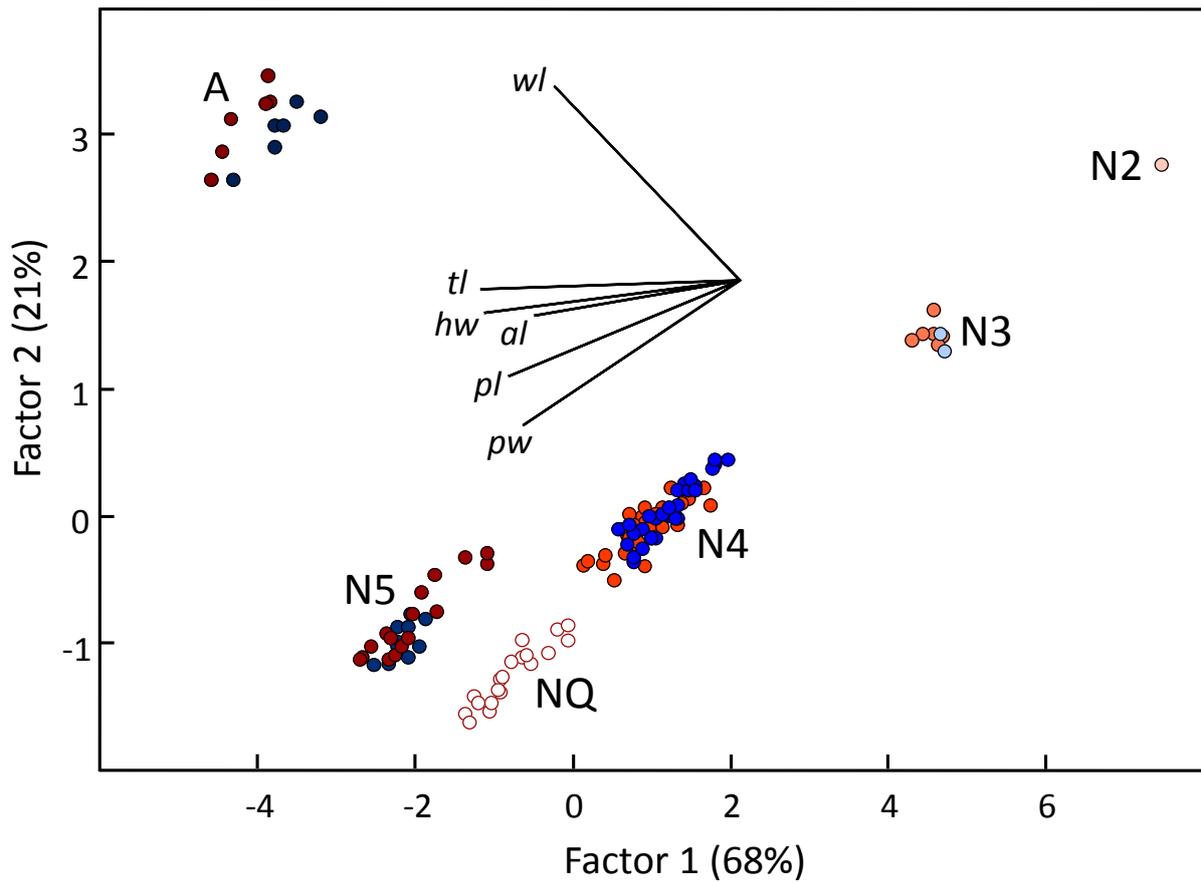


Fig. S4 Developmental origin of neotenic females. Morphometric study of nymphal stages, neotenic queens and alates visualized using principal component analysis, combining data from four colonies, centered for the head width of 4th stage female nymphs. N2–N5, 2nd to 5th stage nymphs; NQ, neotenic females; A, alates; *wl*, fore wing pads or wing length from apex to anterior margin of mesonotum; *tl*, length of left hind tibia; *hw*, head width; *al*, length of antennal growth zone; *pl*, pronotum length; *pw*, pronotum width. Males in blue colors, females in red colors.

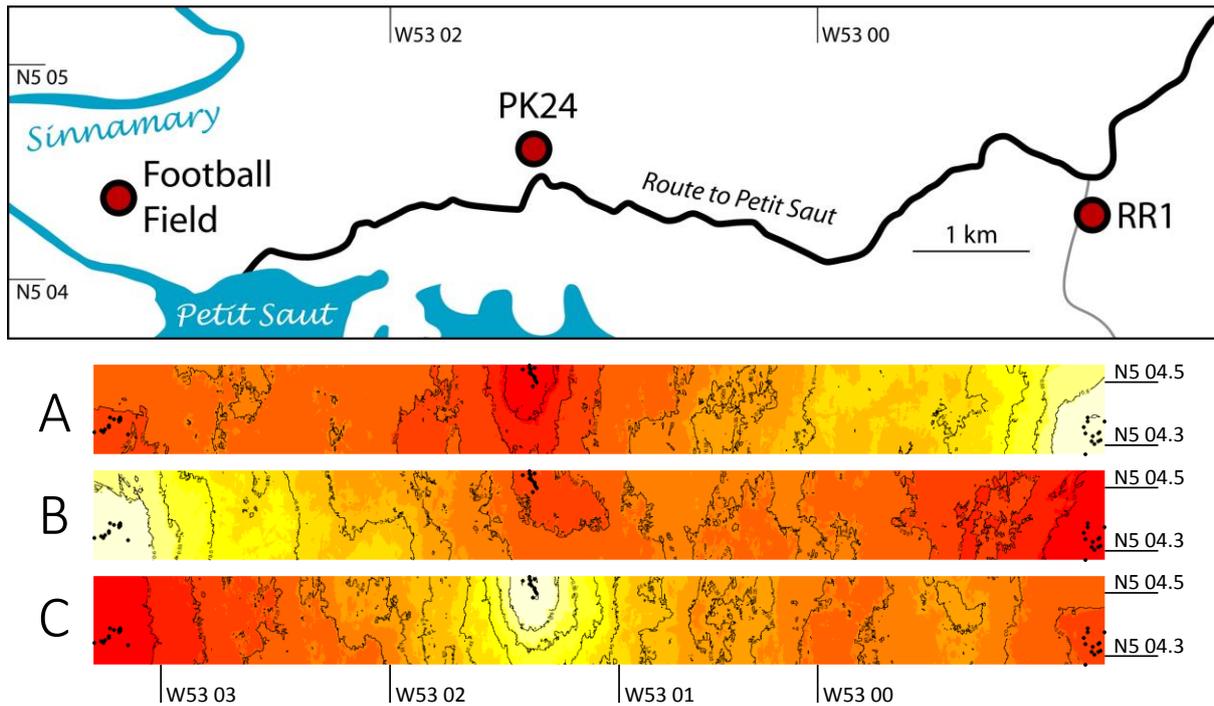


Fig. S5 Example of maps of GENELAND individual assignments to clusters for $K = 3$ obtained for one replicate. A. Map of posterior probabilities of the first cluster. B. Map of posterior probabilities of the second cluster. C. Map of posterior probabilities of the third cluster. The highest membership values are in light yellow and the level curves illustrate the spatial changes in assignment values. The hypothesis $K = 3$ corresponded to the three geographical sites : Football field (cluster 1), PK24 (cluster 2), and RR1 (cluster 3).

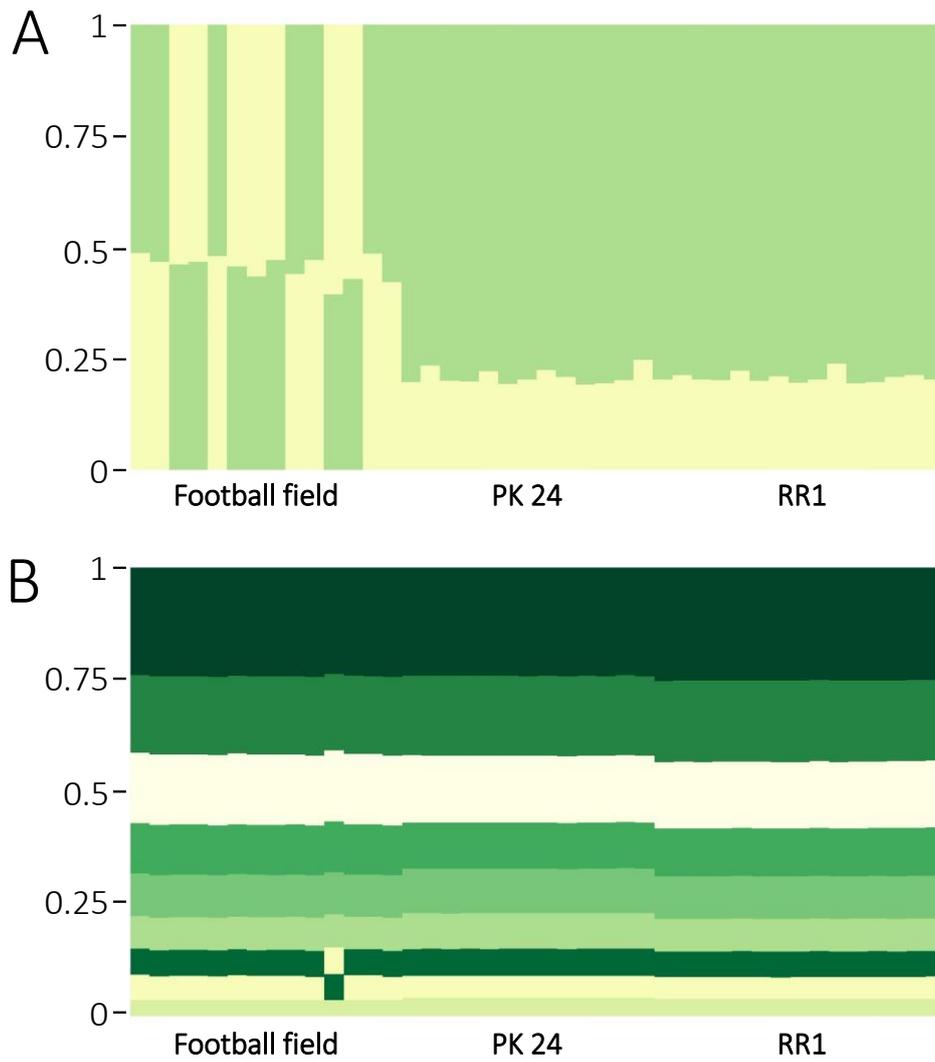


Fig. S6 Examples of STRUCTURE plots obtained from two different replicates. A. $K = 2$. B. $K = 9$. The Y-axis represents the posterior probabilities of assignment.

3. Principaux résultats de l'article 3

- L'analyse de la composition sociale et des dimensions de 164 nids de *S. minutus* échantillonnés sur une période de trois ans, couvrant les saisons sèches et les saisons humides, ont permis de reconstruire le cycle de vie de cette espèce. Les colonies de *S. minutus* sont fondées à partir d'un couple d'imagos en fin de saison humide (Figure 13). Durant la première année, ces colonies se développent, la reine primaire devient physogastre et produit les individus stériles, avant d'être remplacée au cours de la deuxième année par la première génération de femelles néoténiques nymphoïdes (Figure 13). En fin de deuxième année, les femelles néoténiques deviennent matures (physogastrie apparente) et peuvent produire, en début de troisième année, une nouvelle génération de femelles néoténiques (Figure 13). Dans les derniers stades de développement des colonies, un grand nombre de nymphes destinées à se différencier en imagos est produit. Un seul essaimage massif de ces imagos a lieu en fin de troisième année et seuls des individus stériles persistent dans les colonies, qui finissent par disparaître en l'absence de reproducteurs (Figure 13). L'évolution de la structure sociale des colonies au cours du cycle de vie s'accompagne également d'une augmentation croissante de la taille des nids (de 0,07 dm³ pour les jeunes colonies à 8,52 dm³ pour les colonies essaimantes).
- L'observation de nymphes femelles N4 prélevées dans des colonies non essaimantes et isolées du reste de la colonie a permis de mettre en évidence une différenciation de ces individus en femelles néoténiques au bout de 24h. De plus, l'analyse morphométrique réalisée à partir de cinq caractères mesurés sur des nymphes femelles de stade 2 à 5, des femelles néoténiques et des imagos a confirmé que **la différenciation des nymphes en femelles néoténiques s'effectue à partir du stade N4**. Dans le cycle de vie de *S. minutus*, il est probable que les nymphes femelles produites pendant les premières années soient prédestinées à devenir des femelles néoténiques de première ou de deuxième génération tandis que celles produites dans les colonies pré-essaimantes se différencient en imagos femelles.
- Nous avons développé une nouvelle banque de microsatellites spécifiques à *S. minutus* à partir de laquelle nous avons identifié **huit loci microsatellites polymorphes**. Nous avons complété cette sélection avec quatre autres loci développés chez deux espèces proches (trois chez *Embiratermes neotenicus* et un chez *Labiatermes labralis*) et qui

se sont révélés amplifiables et polymorphes chez *S. minutus*. Ainsi, les analyses génétiques ont été réalisées à partir de **douze microsatellites indépendants** possédant de deux à vingt allèles.

- L'analyse de l'origine génétique des différentes castes appartenant à neuf colonies dans lesquelles ont été trouvées plusieurs femelles nymphoïdes avec un seul roi primaire a permis de mettre en évidence que tous les ouvriers, les soldats, 93% des imagos (mâles et femelles) et quelques femelles néoténiques (4%) étaient produits par reproduction sexuée tandis que 96% des femelles néoténiques et 7% des imagos femelles, étaient issus de parthénogenèse thélytoque à partir de la reine primaire. Ces résultats illustrent **un nouveau cas d'AQS chez les Termitidae**.
- **Le mode de restauration de la diploïdie le plus probable impliqué dans la production des femelles nymphoïdes est identique à celui décrit chez *E. neotenicus*, à savoir la fusion centrale.**

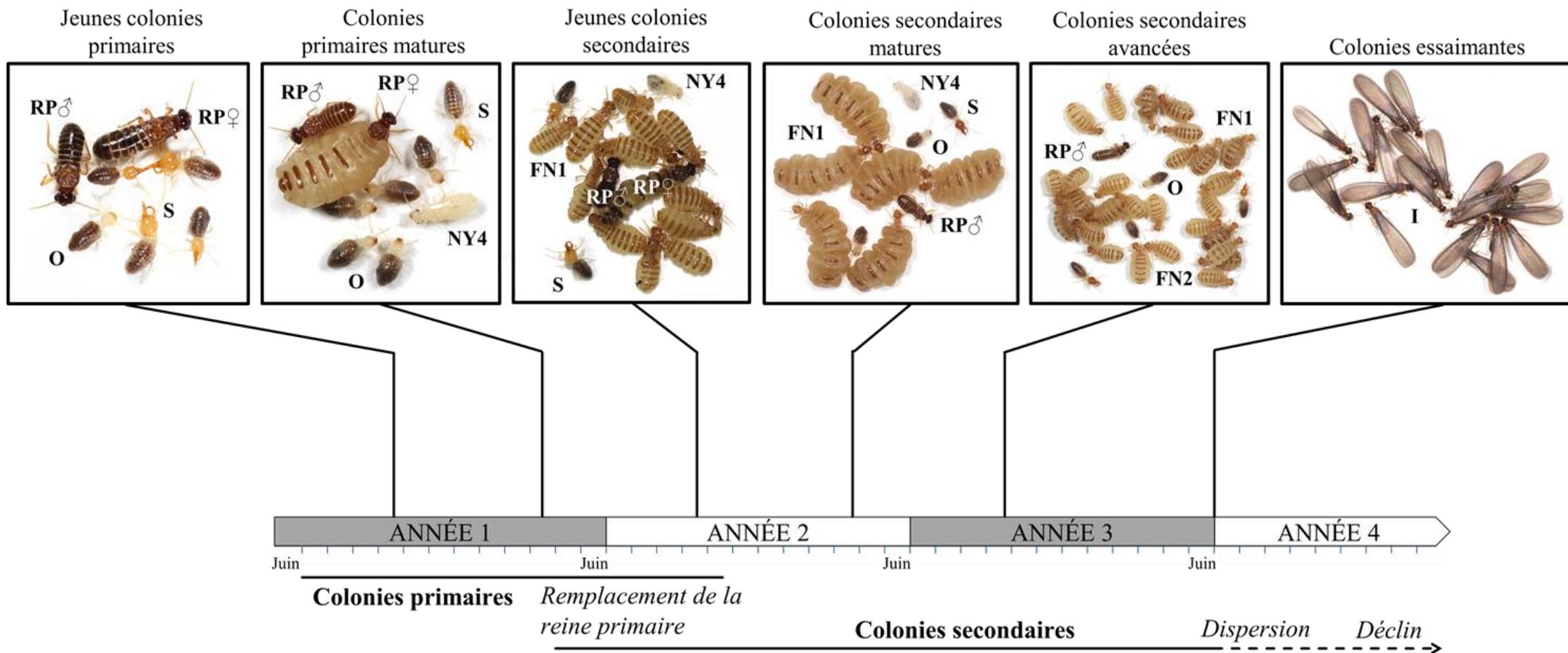


Figure 13 : Cycle de vie de *S. minutus* reconstruit à partir de la structure sociale observée dans 132 nids collectés en saison sèche et humide au cours de quatre années. RP♂ : roi primaire, RP♀ : reine primaire, NY4 : nymphe de stade 4, FN1 : femelle néoténique de première génération, FN2 : femelle néoténique de deuxième génération, I : imago, O : ouvrier, S : soldat.

- La majorité des colonies était fondée par un couple de reproducteurs non apparentés. **L'absence d'isolement par la distance sur une échelle spatiale de 500 mètres suggère que les imagos dispersent assez loin, ce qui leur permet d'éviter un accouplement entre apparentés.**
- *S. minutus* a montré **très peu de différenciation génétique** ($F_{ST} = 0,02$) entre les trois sites d'échantillonnage, ce qui suggère **un flux génique non contraint sur des distances allant jusqu'à 6 kilomètres et donc peu de barrières au brassage génétique**. Malgré cette structuration génétique très faible, un site d'échantillonnage, Football Field, est ressorti de l'approche Bayésienne par regroupement spatialisée. L'isolement génétique de ce site pourrait être expliqué par ses conditions écologiques particulières, liées à la proximité du barrage et par son isolement géographique.
- L'analyse du sexe ratio réalisée à partir des futurs imagos (nymphe N4 et N5) et des imagos collectés dans des colonies essaimantes a montré **une absence de biais en faveur d'un des deux sexes sur le nombre d'individus à l'échelle coloniale, mais un léger biais en faveur des mâles à l'échelle populationnelle**. Cependant, **aucune différence significative n'a été relevée pour l'investissement entre les mâles et les femelles à ces deux échelles**.
- En conclusion, *S. minutus* tire bénéfice du système AQS en **maximisant le taux de croissance des colonies dans le cadre d'un cycle de vie très court**, plutôt que de prolonger la durée de vie de la colonie, comme proposé chez les autres espèces AQS.

-Discussion générale-

1. L'AQS chez les Termitidae

L'étude des systèmes de reproduction d'*E. neotenicus* et *S. minutus* (Termitidae, Syntermitinae) a montré que les reines primaires de ces deux espèces étaient capables de (i) produire des femelles nymphoïdes par reproduction asexuée, qui la remplacent à un stade assez précoce de développement de la colonie, et (ii) produire les ouvriers, les soldats et les imagos par reproduction sexuée avec le roi primaire. Cette stratégie reproductive avait été décrite jusqu'alors chez seulement trois espèces xylophages de Rhinotermitidae : *Reticulitermes speratus* (Matsuura *et al.*, 2009), *R. virginicus* (Vargo *et al.*, 2012) et *R. lucifugus* (Luchetti *et al.*, 2013b). En parallèle de ce travail de thèse, une autre équipe du consortium a découvert et décrit une troisième espèce de Termitidae humivore capable de réaliser l'AQS : *Cavitermes tuberosus* (Termitinae) (Fournier *et al.*, 2016). L'étude de la stratégie reproductive de cette espèce a été réalisée sur le même site d'échantillonnage que celui d'*E. neotenicus* et de *S. minutus*, à savoir le site de Petit Saut en Guyane. Une telle stratégie existe donc chez deux familles phylogénétiquement éloignées, les Rhinotermitidae et les Termitidae, qui diffèrent dans leurs modes de vie (« intermediate nesters » *vs.* « separate nesters ») et leurs régimes alimentaires (xylophages *vs.* humivores), mais qui montrent un réel succès écologique, car très répandues dans leur milieu respectif (milieu urbain *vs.* forêt tropicale).

1.1. Évolution du système AQS

La découverte de trois cas d'AQS chez les Termitidae soulève de nouvelles interrogations quant à l'émergence du système et son évolution chez les termites. *E. neotenicus* et *S. minutus* appartiennent à deux genres différents au sein des Syntermitinae mais partagent un même mode de parthénogenèse, la fusion centrale (articles 1 et 3). *C. tuberosus* appartient aux Termitinae et montre un mécanisme différent de restauration de la ploïdie, la duplication gamétique (Fournier *et al.*, 2016). Ces premiers résultats concernant l'AQS chez les Termitidae suggèrent que le système a évolué de manière indépendante dans ce groupe. De la même manière, une apparition multiple de l'AQS a été suggérée dans le genre *Reticulitermes*, chez qui les trois espèces AQS partagent le même mode de parthénogenèse mais appartiennent à trois lignées distinctes (Dedeine *et al.*, 2016). L'existence de ce système particulier avec des modalités différentes, chez deux familles, atteste de l'origine polyphylétique de l'AQS chez les termites. Au vu des avantages d'une telle stratégie, il reste à expliquer pourquoi des espèces proches phylogénétiquement et vivant dans

les mêmes conditions que les espèces AQS n'utilisent pas ce système. En effet, les espèces proches phylogénétiquement et sympatriques d'*E. neotenicus* et de *S. minutus* n'ont jamais été observées avec de nombreuses femelles néoténiques à la place de la reine primaire, pouvant être un signe précurseur de la présence d'AQS. *Labiotermes labralis*, qui est l'une des espèces de Syntermitinae humivores les plus abondantes en forêt Amazonienne, n'a jamais montré la présence de reproducteurs surnuméraires, mais seulement un couple de reproducteurs primaires (Dupont *et al.*, 2009). *Silvestritermes heyeri*, une espèce de Syntermitinae répandue en Amérique du Sud, est souvent présente en sympatrie avec *S. minutus* et ces deux espèces partagent de nombreux traits. La dissection de nombreux nids de *S. heyeri* a mis en évidence une organisation classique avec un roi primaire, sans remplacement de la reine primaire par de nombreuses femelles secondaires (données non publiées).

Il est difficile de retracer l'évolution du système AQS à cause du nombre trop limité de cas décrits à ce jour chez les termites. Ceci peut s'expliquer par le peu d'éléments permettant de repérer facilement cette stratégie sur le terrain. L'indice le plus évident pour suspecter la présence d'AQS chez une espèce est un nombre de femelles secondaires très largement supérieur à celui des mâles, dans un grand nombre de nids. L'accès aux nids et à l'ensemble des reproducteurs étant souvent difficile, la structure génétique des castes stériles a été utilisée pour décrire la structure sociale des colonies. Cependant, les modalités particulières de l'AQS rendent impossible la détection du système et beaucoup d'études ont pu passer à côté de l'AQS en génotypant seulement les castes stériles. Toutefois, le système AQS apparaît comme bien plus répandu géographiquement, écologiquement et évolutivement que ce que l'on pensait au moment de sa découverte. De nouvelles espèces ont été repérées comme candidates potentielles au système AQS, notamment chez les Termitidae (données non publiées) et leur étude ultérieure promet d'apporter des éléments intéressants pour comprendre l'évolution de la stratégie, son maintien et son potentiel caractère adaptatif.

1.2. Implications du système AQS dans le cycle de vie des espèces

L'étude du système AQS chez *E. neotenicus*, *S. minutus* et *C. tuberosus* a été initiée par l'observation sur le terrain de nombreuses colonies possédant de multiples femelles néoténiques accompagnées le plus souvent d'un unique roi primaire, sans reine primaire. Cette stratégie est apparue stable dans le cycle de vie des espèces, alors que la présence de reproducteurs néoténiques reste rare au sein des Termitidae (Hartke et Baer, 2011, Myles, 1999). Dans cette famille, la stratégie de reproduction est le plus souvent basée sur la présence

d'un couple monogame de reproducteurs primaires avec une reine présentant une physogastrie très développée et une durée de vie importante (Hartke et Baer, 2011, Myles, 1999). Dans la stratégie AQS, la conservation et la transmission des allèles maternels sont permises par le remplacement de la reine primaire par des femelles nymphoïdes produites via la parthénogenèse thélytoque, entraînant d'un point de vue génétique un prolongement de la monogamie, et cela malgré la présence de multiples reproductrices secondaires. Si l'AQS présente des intérêts communs à l'ensemble des espèces utilisant ce mode de reproduction, comme le développement rapide des colonies, nous avons montré que le rôle adaptatif qu'il jouait variait de manière assez claire selon les espèces et leur cycle de vie.

Chez *E. neotenicus*, le remplacement de la reine primaire par ses filles parthénogènes semble s'effectuer relativement tôt dans le cycle de vie. En effet, un seul très jeune nid, de petite taille, a été trouvé avec le couple primaire sans néoténiques au cours des différentes missions d'échantillonnage (article 1). Un autre nid, un peu plus avancé, a été trouvé avec seulement une dizaine de femelles néoténiques physogastres en présence du couple primaire (données non publiées). Dans ce cas, la reine était sénescence, illustrant sans doute un stade de transition avec une reine sur le point d'être remplacée (transition entre la colonie primaire et secondaire). Cependant, la partie du cycle de vie correspondant à la fondation et au stade nid très jeune est très difficile à reconstruire chez *E. neotenicus*. Cette partie du cycle correspond à une phase le plus souvent souterraine et les nids ne deviennent réellement visibles et analysables qu'à partir du moment où les femelles néoténiques interviennent de manière significative dans la production de la colonie. De ce fait, la grande majorité des nids observés sur le terrain a montré une taille importante, abritant plusieurs dizaines voire centaines de femelles nymphoïdes physogastres (jusqu'à 225 dans une colonie). Ces femelles se reproduisent avec le roi primaire et produisent une seconde génération de femelles néoténiques, comme l'atteste l'observation de jeunes néoténiques peu physogastres dans certaines colonies. Les colonies d'*E. neotenicus* semblent ainsi se développer rapidement après l'apparition des femelles néoténiques, donnant de grands nids populeux pouvant subsister pendant plus de quatre ans, avec plusieurs vagues d'essaimage.

Le cycle de vie de *S. minutus* a pu être étudié en détail du fait des dimensions réduites des colonies et du faible effectif des populations (article 3). De plus, les différents stades étaient accessibles sur le terrain, y compris les très jeunes colonies. L'étude approfondie du cycle de vie nous a permis de constater que l'AQS présentait un intérêt différent chez cette espèce, du fait de la durée de vie réduite des colonies. Dès la première année suivant la

fondation de la colonie, la reine primaire produit des nymphes femelles parthénogènes destinées à se différencier en néoténiques. Au cours de la deuxième année, des stades intermédiaires sont observés avec une reine primaire sénescence accompagnée de la première génération de néoténiques non matures sexuellement (physogastrie peu développée). Ces néoténiques prennent la tête de la colonie aux côtés du roi primaire dès la fin de cette deuxième année et atteignent leur potentiel reproductif maximum (physogastrie très développée). Durant la troisième année, une seconde génération de femelles nymphoïdes est engendrée par parthénogenèse par les femelles néoténiques de première génération. La colonie s'étend encore et un grand nombre de nymphes, majoritairement issues de l'accouplement entre les femelles nymphoïdes et le roi primaire, est produit et devient les imagos qui essaimeront. Un seul essaimage massif a lieu à la fin de cette troisième année. À ce stade, les colonies sont composées presque uniquement d'imagos et d'individus stériles. L'absence de tout reproducteur ou futur reproducteur dans les colonies après l'essaimage entraîne la mort des colonies. Dans le cas de *S. minutus*, le remplacement rapide de la reine par des femelles nymphoïdes parthénogènes permet le développement rapide de la colonie et optimise l'essaimage unique par la production de très nombreux reproducteurs ailés. En comparaison des autres espèces AQS, le nombre de femelles néoténiques trouvé dans les nids de *S. minutus* est relativement faible (jusqu'à 34) mais ce nombre est compensé par une physogastrie extrême des femelles, bien supérieure à celle observée chez la reine primaire. L'AQS peut être vu chez cette espèce comme une réponse à son apparente vulnérabilité aux contraintes environnementales dues à la taille réduite des individus et des nids, situés à seulement quelques centimètres du sol, et la durée de vie restreinte des colonies.

Contrairement aux cas décrits précédemment, le remplacement de la reine primaire par des femelles secondaires semble être un événement facultatif chez *C. tuberosus* et quand il a lieu, celui-ci semble survenir tardivement dans le cycle de vie des colonies (Fournier *et al.*, 2016). En effet, sur l'ensemble des colonies collectées, 41% d'entre elles possédaient une reine primaire sans femelles néoténiques contre seulement 29% des colonies où des femelles secondaires ont été trouvées. Les femelles néoténiques collectées (jusqu'à 667) étaient de petite taille et non physogastriques ce qui laisse sous-entendre que leur fécondité était limitée.

Chez *C. tuberosus*, l'AQS semble jouer un rôle différent de celui décrit chez les autres espèces. Une hypothèse serait que la reine primaire puisse se maintenir dans les colonies et assurer seule le développement de celles-ci pendant quelques années et atteindrait ensuite dans les colonies matures un plateau ou un déclin dans sa fécondité, ce qui expliquerait son

remplacement par les femelles néoténiques. Les auteurs proposent également que le remplacement de la reine puisse être un moyen d'augmenter rapidement le taux de croissance des colonies dans les cas où l'espèce coloniserait les nids abandonnés par d'autres espèces. Cela a été observé avec des *C. tuberosus* collectés dans des nids de *Labiotermes labralis* et de *Silvestritermes heyeri* (Fournier *et al.*, 2016).

1.3. Modes de parthénogenèse chez les espèces AQS : variabilité et conséquences

La découverte du système AQS chez *E. neotenicus*, *S. minutus* et *C. tuberosus* a permis de mettre en évidence deux nouveaux modes de restauration de la ploïdie chez les termites. Les études sur *R. speratus*, *R. virginicus* et *R. lucifugus* ont montré que respectivement 97%, 97,4 % et 98,2% des femelles néoténiques génotypées pour des loci microsatellites étaient homozygotes pour au moins un des allèles maternels. Ces proportions importantes d'homozygotes chez les parthénogènes ont amené les auteurs à conclure que le mode de parthénogenèse le plus probable était la thélytoquie automictique avec une fusion terminale des gamètes haploïdes (Luchetti *et al.*, 2013b, Matsuura *et al.*, 2009, Vargo *et al.*, 2012) (Figure 3). Ce mécanisme de restauration de la ploïdie entraîne une homozygotie complète en absence de recombinaison et une réduction rapide de l'hétérozygotie au cours des générations (Pearcy *et al.*, 2006). Un autre mode de parthénogenèse, la duplication gamétique, n'a pas été écarté chez *R. virginicus*, celui-ci entraînant une homozygotie totale avec ou sans évènement de recombinaison (Pearcy *et al.*, 2006, Vargo *et al.*, 2012).

Contrairement à ce qui a été décrit chez les *Reticulitermes* spp., nous avons montré que la grande majorité des femelles néoténiques chez *E. neotenicus* et *S. minutus* était hétérozygote, quand la reine primaire l'était. Les taux de transition vers l'homozygotie chez les femelles parthénogènes variaient de 2 à 8% en fonction des loci chez *E. neotenicus* et de 5 à 34% chez *S. minutus*. Pour ces deux espèces, le mécanisme de restauration de la ploïdie le plus probable est l'automixie avec fusion centrale, impliquant une conservation de l'hétérozygotie ou une faible réduction de celle-ci lors d'évènements de recombinaison (articles 1 et 3) (Figure 3). Chez *C. tuberosus*, l'ensemble des femelles néoténiques parthénogènes a montré une homozygotie complète sur l'ensemble des loci, attestant d'un mode de parthénogenèse par duplication gamétique (Fournier *et al.*, 2016) (Figure 3).

Chez les espèces de *Reticulitermes* montrant de la restauration de la ploïdie par fusion terminale, l'hypothèse que la parthénogenèse puisse induire un conflit génétique en première division de méiose a été évoquée (Malausa *et al.*, 2011). Les données observées chez les trois

Reticulitermes suggèrent effectivement l'existence d'un tel conflit, avec un biais très net dans la répartition des génotypes en faveur d'une classe d'homozygotes sur certains loci chez les femelles néoténiques (transmission d'un allèle maternel favorisée). L'hypothèse d'un élément égoïste qui biaiserait les paires de chromosomes chez ces femelles pour augmenter son propre taux de transmission à la génération suivante a été proposée (Malausa *et al.*, 2011). L'hétérozygotie étant majoritairement conservée chez *E. neotenicus* et *S. minutus*, nous n'avons observé aucun biais de cette nature chez les femelles parthénogènes des deux espèces. Malgré l'homozygotie complète décrite chez les femelles néoténiques de *C. tuberosus*, aucun déséquilibre dans les fréquences génotypiques n'a été relevé qui pourrait supporter l'hypothèse de gènes de distorsion méiotique (Fournier *et al.*, 2016).

Une conséquence de la parthénogenèse automictique, menant à une augmentation du niveau d'homozygotie comme chez les *Reticulitermes*, est la dépression de consanguinité au niveau de la colonie (Pearcy *et al.*, 2006). Par définition, la dépression de consanguinité entraîne une baisse de la valeur sélective, qui peut être contrebalancée par différents mécanismes tels que la purge des allèles récessifs délétères (Hedrick et Garcia-Dorado, 2016, Roff, 2002). Dans le cas des femelles néoténiques parthénogènes, le coût lié à l'homozygotie reste faible car même si leur valeur sélective est réduite, celle-ci restent protégées à l'intérieur du nid sans être exposées aux conditions environnementales. La production successive de femelles parthénogènes permet également de prévenir la transmission des allèles récessifs délétères à la prochaine génération, par le phénomène de purge évoqué plus haut (Matsuura, 2011, Vargo *et al.*, 2012).

Chez *E. neotenicus* et *S. minutus*, la thélytoquie automictique avec fusion centrale prévoit au contraire une diminution plus lente de l'hétérozygotie au cours des générations. Ce mécanisme de restauration de la ploïdie a également été démontré chez les fourmis parthénogènes ainsi que chez l'abeille *Apis mellifera capensis* (Rabeling et Kronauer, 2013). Chez ces organismes haplo-diploïdes, les mutations délétères sont exposées de façon constante à la sélection via la production des mâles haploïdes par arrhénotoquie, ce qui limite la dépression de consanguinité entraînée par l'automixie. Chez les espèces qui produisent des femelles par parthénogenèse automictique avec fusion centrale, d'autres mécanismes ont été décrits pour pallier à la perte progressive de l'hétérozygotie provoquée par les événements de recombinaison. Chez *Cataglyphis cursor*, la fusion centrale a été déterminée à partir de taux de transitions vers l'homozygotie allant jusqu'à 34%, taux similaires à ceux calculés chez *S. minutus* (Pearcy *et al.*, 2006). La reine peut être remplacée par des gynes ou des ouvrières

d'origine sexuée capables de se reproduire, entraînant une baisse de la consanguinité en maintenant un certain niveau d'hétérozygotie (Pearcy *et al.*, 2006). Une étude complète réalisée chez cette espèce a confirmé l'utilisation facultative de la thélytoquie par la reine dans la production des gynes et la compensation des coûts liés à la thélytoquie automictique, en réduisant le niveau de consanguinité chez les gynes (Doums *et al.*, 2013). Les études menées chez *Wasmannia auropunctata* ont montré que l'hétérozygotie de la reine était conservée chez les gynes parthénogènes avec des taux de transition vers l'homozygotie très faible entre 0 et 2,8% selon les loci, suggérant de l'automixie avec fusion centrale (Fournier *et al.*, 2016, Rey, 2011). Ce mode de restauration de la ploïdie accompagné d'un faible taux de recombinaison permet aux gynes produites par parthénogenèse de bénéficier des avantages de la thélytoquie en évitant les coûts liés à une éventuelle dépression de consanguinité. D'autres cas similaires ont été décrits notamment chez *A. m. capensis* et la fourmi *Platythyrea punctata*, montrant de la fusion centrale avec un taux de recombinaison réduit (Baudry *et al.*, 2004, Kellner et Heinze, 2011).

1.4. Différenciation des nymphes, ce que nous apportent les nouvelles espèces AQS

Chez les six espèces AQS décrites, l'ensemble des reproducteurs secondaires trouvés dans les colonies étudiées étaient des nymphoïdes (issus de la différenciation des nymphes) et aucun reproducteur secondaire ergatoïde (issu de la différenciation des ouvriers) n'a été observé. Les nymphes se différencient soit en néoténiques soit en imagos, selon les besoins de la colonie au cours de son cycle de vie. Les femelles nymphoïdes représentent la quasi-totalité des individus parthénogènes dans les colonies étudiées chez les différentes espèces AQS. Ce biais important suggère que la différenciation des parthénogènes en femelles nymphoïdes puisse être génétiquement induite. Ainsi, on peut se demander quel mécanisme génétique est à l'origine de la différenciation prioritaire des nymphes parthénogènes en nymphoïdes, et donc des nymphes sexuées en imagos femelles, lorsque que ces deux types de nymphes sont présentes au même moment dans la colonie. L'observation d'une homozygotie presque complète chez les femelles néoténiques sur une majorité de loci, due à l'automixie avec fusion terminale, chez les trois *Reticulitermes* spp. (Luchetti *et al.*, 2013b, Matsuura *et al.*, 2009, Vargo *et al.*, 2012), a laissé supposer que ce mécanisme pourrait être lié à l'état homozygote ou hétérozygote des individus à certains loci (Matsuura, 2011). Une étude expérimentale menée chez *R. speratus*, a montré qu'une perte de l'hétérozygotie sur certains loci engendrait un biais de différenciation vers la néoténie et qu'il existerait ainsi un système de détermination

« multi loci » chez les termites AQS, qui orienterait le développement des nymphes parthénogènes homozygotes en femelles néoténiques (Yamamoto et Matsuura, 2012).

Ce mécanisme étant basé sur la présence d'un taux d'homozygotie très important chez les femelles néoténiques parthénogènes, il est applicable chez les *Reticulitermes* spp. (Luchetti *et al.*, 2013b, Matsuura *et al.*, 2009, Vargo *et al.*, 2012) et chez *C. tuberosus* dont les femelles nymphoïdes sont totalement homozygotes car issues d'automixie avec duplication gamétique (Fournier *et al.*, 2016). Le mode de parthénogenèse par fusion centrale démontré chez *E. neotenicus* et *S. minutus* soutient peu cette hypothèse car l'hétérozygotie de la reine primaire est conservée chez la plupart des femelles nymphoïdes parthénogènes. Chez *S. minutus*, la production des nymphes destinées à devenir des nymphoïdes et celle des nymphes destinées à se différencier en imagos semblent avoir lieu à différentes périodes dans le cycle de vie des colonies. La connaissance détaillée du cycle de vie de cette espèce permet d'avancer des hypothèses concernant le devenir des nymphes produites selon le stade de développement des colonies. Durant les trois premières années du cycle de vie, les nymphes femelles de stade N2 à N4 observées dans les colonies (stade jeune colonie à colonie secondaire mature) sont très probablement destinées à se différencier en femelles néoténiques de première ou deuxième générations. Les résultats obtenus sur deux colonies qui possédaient des femelles néoténiques matures de première génération, des jeunes femelles néoténiques de deuxième génération ainsi que des nymphes femelles N4 (stade transitoire entre colonies secondaires matures et avancées) ont montré que l'ensemble des nymphes était issu de parthénogenèse. Ceci renforce l'idée que ces nymphes soient amenées à se différencier en femelles néoténiques, ici de seconde génération. Dans les stades ultimes des colonies, juste avant l'essaimage (colonies essaimantes), un grand nombre de nymphes N4, N5 et d'imagos a été trouvé. L'analyse des génotypes d'imagos mâles et femelles récoltés de deux colonies a montré que la grande majorité de ces individus avait une origine sexuée. De plus, nos analyses expérimentales et morphométriques ont révélé que la différenciation en femelles nymphoïdes de *S. minutus* s'opérait à partir des nymphes de stade N4 et de ce fait, l'ensemble des nymphes femelles N5 se développerait uniquement en imagos. L'étude du développement des castes chez deux autres espèces du genre *Silvestritermes* a montré que les nymphoïdes issus de reproduction sexuée se différenciaient à partir des stades nymphes N4 ou N5 chez *S. heyeri* (Barbosa *et al.*, 2012) et à partir du stade N3 chez *S. euamignathus* (Haifig et Costa-Leonardo, 2016). Il existerait donc une certaine plasticité développementale dans la différenciation des nymphoïdes dans le genre *Silvestritermes*. Dans le genre *Embiratermes*,

aucune étude n'a décrit les voies de différenciation des castes sexuées. Chez *E. neotenicus*, nous avons pu observer dans de très rares cas des mues de nymphes N4 en cours de différenciation en femelles nymphoïdes. Cela suggère que la différenciation des femelles nymphoïdes se produit probablement et principalement à partir du stade N4. L'analyse de quelques nymphes N4, mâles et femelles, collectés dans deux colonies avant la saison où a normalement lieu l'essaimage, donc probablement destinées à devenir des imagos, a montré qu'elles étaient issues de reproduction sexuée à l'exception d'environ 33% des nymphes femelles qui ont été identifiées comme issues de parthénogenèse. Pour ces nymphes, il n'y a aucun moyen de savoir si elles se destinent à devenir des futures femelles néoténiques ou des futurs imagos. Une étude expérimentale menée chez *E. festivellus*, consistant à isoler des ouvriers, des soldats et des nymphes de stade N3, a montré au bout d'un an la présence de reproducteurs néoténiques nymphoïdes, deux femelles et deux mâles pigmentés (Constantino, 1998). La pigmentation des nymphoïdes suggère la présence de plusieurs mues à partir du stade trois (N3) qui serait ainsi le point de départ dans la voie de différenciation en nymphoïde. De plus, les femelles nymphoïdes se sont avérées être fonctionnelles en produisant des œufs mais sans être physogastres contrairement aux femelles nymphoïdes trouvées dans la nature.

Très récemment, un nouveau modèle génétique basé sur l'empreinte génomique (mécanisme épigénétique qui se manifeste par l'inhibition de certains gènes maternels ou paternels soumis à l'empreinte, au travers de la méthylation de l'ADN ou de la modification des histones) a été évoqué pour expliquer le développement prioritaire des nymphes femelles parthénogènes en femelles néoténiques. Ce modèle est applicable pour les différents modes de parthénogenèse automictique et pas seulement pour les modes menant à la réduction drastique de l'hétérozygotie (Matsuura, 2016).

La présence de cas particuliers chez la plupart des espèces AQS démontre que s'il existe un mécanisme génétique influençant la détermination des castes, celui-ci ne serait pas entièrement efficace. En effet, des femelles nymphoïdes issues de reproduction sexuée et des imagos femelles issus de parthénogenèse ont été détectés chez *R. speratus* (3% et 5%, respectivement) (Matsuura *et al.*, 2009), *R. virginicus* (2,6% et 18%, respectivement) (Vargo *et al.*, 2012), *C. tuberosus* (18% et 7%, respectivement) (Fournier *et al.*, 2016) et également chez *S. minutus* (4% et 7%, respectivement) (article 3). La présence de femelles néoténiques issues de reproduction sexuée induirait, dans le cas où elles participeraient à la reproduction en s'accouplant avec le roi primaire, une hausse du taux de consanguinité ainsi qu'une baisse

de l'hétérozygotie dans la descendance sexuée due à l'accouplement père-fille(s) (Figure 5). La production d'imagos femelles issus de parthénogenèse aurait pour conséquence une diminution de la diversité génétique et donc une sensibilité potentielle aux pressions environnementales. Cependant, la présence de quatre colonies menées par des reines primaires issus de parthénogenèse chez *C. tuberosus*, dont deux colonies produisant des imagos, témoigne de la capacité de ces femelles à fonder des colonies viables, dans une proportion non négligeable (Fournier *et al.*, 2016).

1.5. Mâles néoténiques : occurrence, rôle et conséquences génétiques

La présence presque systématique du roi primaire dans les colonies AQS ayant atteint un certain stade de développement montre d'une part, que le roi vit plus longtemps que la reine primaire et d'autre part, que son remplacement par un ou plusieurs mâles secondaires est un évènement rare dans le cycle de vie d'une colonie. Sur 41 nids inspectés chez *E. neotenicus*, neuf contenaient des mâles néoténiques, souvent en plus du roi primaire (de 1 à 21 mâles néoténiques selon les colonies). La reconstruction des génotypes parentaux à partir des castes stériles dans chacune de ces colonies a montré que les mâles néoténiques étaient peu ou pas actifs dans la reproduction, la descendance sexuée échantillonnée et génotypée étant identifiée comme celle du roi primaire. Chez *S. minutus*, sur 132 nids examinés, le roi primaire était remplacé par un seul mâle néoténique, dans un seul des nids. Sur les 95 colonies étudiées chez *C. tuberosus*, quatre possédaient un mâle néoténique et dans une de ces colonies, celui-ci cohabitait avec le roi primaire (Fournier *et al.*, 2016). L'analyse de la descendance sexuée de cette colonie a montré qu'elle n'était pas issue du mâle néoténique, suggérant que le roi primaire était toujours actif. Dans les études menées chez les *Reticulitermes*, seules trois colonies avec un mâle secondaire ont été recensées chez *R. speratus* (Matsuura, 2011, Matsuura *et al.*, 2009) et aucun mâle secondaire n'a été observé chez *R. virginicus*. Cependant chez cette dernière espèce, des valeurs élevées d'apparentement entre la reine primaire et le père inféré génétiquement de la descendance ont suggéré que ce dernier pourrait être le fils ou le petit-fils de la reine primaire dans 60% des colonies étudiées (Vargo *et al.*, 2012). Le remplacement du roi primaire se produirait donc relativement tôt chez cette espèce.

Le système AQS équilibre la contribution génétique entre le roi et la reine primaires à chaque génération, aussi longtemps que le roi primaire est présent dans la colonie, du fait de la production par parthénogenèse des femelles néoténiques. La disparition du roi et son

remplacement par un mâle secondaire sexué, issu du couple primaire, va nécessairement amener à une asymétrie dans la contribution des sexes à la descendance sexuée. Ainsi, les ouvriers, les soldats et les imagos qui seront produits sexuellement à partir du couple mâle néoténique – reine primaire ou femelle(s) secondaire(s) seront trois fois plus apparentés avec la mère du fait d'une transmission des allèles maternels favorisée. Une hypothèse avance que cette sélection de parentèle pour les allèles de la mère induise un biais dans le sexe ratio des ailés en faveur des femelles (Matsuura, 2011). La sélection de parentèle proposée par Hamilton en 1964 prédit qu'en investissant d'avantage de ressources dans certains parents proches, un individu peut maximiser le taux de transmission de ses gènes à la génération suivante par reproduction avec un membre de sa famille (Hamilton, 1964, Kobayashi *et al.*, 2013). Ce mécanisme évolutif a notamment été étudié chez les Hyménoptères dont le système haplo-diploïde entraîne une asymétrie dans l'apparentement entre frères et sœurs avec des ouvrières plus apparentées entre elles (0,75) qu'avec leur frère (0,25), ce qui engendre un biais de sexe ratio en faveur des femelles (Queller et Strassmann, 1998). La prédiction d'un biais de sexe ratio en faveur des femelles chez les imagos de *R. speratus* et *R. virginicus* en raison du système AQS montrant des mâles néoténiques, a été testé grâce à des modèles mathématiques. Ces modèles ont été comparés avec trois espèces non-AQS, *R. flavipes*, *R. okinawanus* et *R. yaeyamanus* (Kobayashi *et al.*, 2013). Les résultats de cette étude ont montré un investissement significativement plus élevé pour les imagos femelles pour les deux espèces AQS comparativement aux trois espèces non-AQS. Une contribution plus importante chez *R. virginicus* que chez *R. speratus* a aussi été observée, résultat expliqué par le fait que le roi primaire semble remplacé plus rapidement chez cette espèce. Le modèle prédit qu'un seul remplacement du roi primaire peut entraîner un biais dans le sexe ratio des imagos et que les remplacements successifs du roi entraîneraient une contribution génétique de la reine primaire accrue et donc un biais plus important en faveur des femelles imagos (Kobayashi *et al.*, 2013). Cette hypothèse a pu être vérifiée chez *R. lucifugus* dont un sexe ratio biaisé chez les imagos femelles a été reporté (Luchetti *et al.*, 2013b). Les résultats obtenus chez *S. minutus* ont montré une absence d'asymétrie dans la répartition des sexes chez les imagos, avec un investissement égal entre les mâles et les femelles, probablement à mettre en relation avec le très faible nombre de mâles néoténiques. Ainsi, un sexe ratio biaisé en faveur des femelles chez les imagos ne peut pas être un indice exclusif pour mettre en évidence la présence d'AQS.

2. Stratégies d'accouplement et dispersion chez les Termitidae utilisant l'AQS

Les stratégies d'accouplement et les patrons de dispersion, s'ajoutant aux barrières environnementales et aux processus historiques, sont à même d'affecter la structuration génétique des populations. Aussi, étudier la structure génétique des colonies et des populations à fine échelle de nos espèces AQS a permis de fournir des informations intéressantes pour comprendre leur succès écologique. En particulier, nous avons montré qu'*E. neotenicus* et *S. minutus*, comme *C. tuberosus*, fondaient leurs colonies à partir de couples monogames pas ou peu souvent apparentés, suggérant que le vol des essaimants est suffisamment long pour éviter des accouplements consanguins. Ce résultat a également été confirmé par une absence d'isolement par la distance et peu de barrière aux flux de gènes sur le site d'étude, pour les trois espèces de Termitidae utilisant l'AQS.

2.1. Re-définition des structures familiales appliquées à l'AQS

Chez les espèces pratiquant l'AQS, les castes neutres sont produites par reproduction sexuée entre le roi et les femelles néoténiques portant uniquement les gènes de la reine primaire. Dans la plupart des cas, la répartition des génotypes des neutres ne diffère pas statistiquement de celle attendue pour la descendance d'un couple monogame. La structure génétique des colonies AQS est donc caractéristique de celle d'une famille simple, selon la nomenclature établie (Deheer et Vargo, 2004, Matsuura, 2011, Vargo, 2003a). Il est ainsi compréhensible que, sans accès direct aux reproducteurs, les colonies de *Reticulitermes* spp. pratiquant l'AQS aient été classées dans un premier temps en familles simples (Vargo et Husseneder, 2011). Cependant, il est important de noter que la présence d'un élément égoïste peut parfois induire un biais dans les fréquences génotypiques des castes stériles (Matsuura, 2011). Cette particularité est à l'origine de la désignation de certaines colonies sans reproducteurs secondaires d'origine sexuée en familles étendues. Luchetti *et al.* (2013b) suggèrent donc qu'il est important de différencier les familles étendues dérivées du système AQS, avec un roi et plusieurs femelles secondaires issue de parthénogenèse, des familles étendues canoniques composées de plusieurs reines et rois secondaires issus de reproduction sexuée. Ces deux types de familles étendues impactent différemment la structure physique des colonies. En effet, le roi et les femelles néoténiques des familles étendues issues de l'AQS sont localisés dans des chambres royales tandis que les reproducteurs secondaires des familles étendues canoniques se déplacent en créant des colonies satellites par bourgeonnement (Luchetti *et al.*, 2013b).

Concernant *E. neotenicus* et *S. minutus*, l'analyse de la structure génétique des colonies à partir de marqueurs microsatellites a révélé une très large prédominance de familles simples sur le site étudié. Pour *E. neotenicus*, la totalité des colonies génotypées (100%, N=41) a été identifiée comme des familles simples (article 2). Il est peu probable que ces colonies matures et populeuses soient menées par un couple monogame classique décrit habituellement dans la définition d'une famille simple. En effet, d'après la structure sociale observée, il est plus probable que la plupart de ces colonies soient menées par un roi primaire et de multiples femelles néoténiques issue de parthénogenèse, ayant remplacé la reine primaire relativement tôt dans le cycle de vie des colonies. En effet, sur 43 colonies examinées, 24 possédaient des femelles néoténiques (article 1). Chez *S. minutus*, une large majorité de familles simples a également été mise en évidence génétiquement (83%, N=42). Les observations de terrain permettent de dire que ces colonies étaient menées soit par un couple de reproducteurs primaires (colonies primaires), soit par un roi et de multiples femelles nymphoïdes issues de parthénogenèse (colonies secondaires) (article 3). Chez *C. tuberosus*, une proportion importante de familles simples a également été identifiée génétiquement (62%, N=65). Cependant, l'examen des colonies a montré que 39/95 contenaient la reine primaire alors que seulement 28/95 contenaient des femelles néoténiques (Fournier *et al.*, 2016, Luchetti *et al.*, 2013b). Ces chiffres confirment qu'indépendamment de l'utilisation de la stratégie AQS, la fondation des colonies par un couple monogame semble prédominer chez les Termitidae comme l'attestent les quelques études génétiques entreprises dans ce groupe e.g. chez *L. labralis* (100% de familles simples, N=17) (Dupont *et al.*, 2009), *Nasutitermes nigriceps* (95%, N=136) (Thompson et Hebert, 1998a, Thompson et Hebert, 1998b) et *Cubitermes* spp. (76%, N=15) (Roy *et al.*, 2010).

Tandis que les colonies d'*E. neotenicus* ne présentaient que des familles simples, chez *S. minutus*, trois colonies ont été identifiées comme étendues (7%, N=42) (article 3). Comme les mâles néoténiques sont très rares dans l'ensemble des colonies de *S. minutus* échantillonnées, les familles étendues seraient plutôt expliquées par la présence de femelles néoténiques issues de reproduction sexuée, qui s'accoupleraient avec leur père ou grand-père, le roi primaire. Des familles étendues ont également été relevée chez *C. tuberosus* dans une proportion non négligeable (38%, N=65) (Fournier *et al.*, 2016). La présence de femelles néoténiques d'origine sexuée et de mâles néoténiques chez cette espèce indique que la plupart de ces colonies sont probablement menées par des reproducteurs secondaires issus du couple primaire ou de l'association entre reproducteurs primaires et secondaires. Chez *S. minutus*,

quatre colonies ont également été définies comme des familles mixées (10%, N=42), suggérant la présence d'au moins trois reproducteurs non apparentés à l'origine de la descendance stérile analysée. Trois de ces colonies étaient des colonies sans reproducteurs, possédant un grand nombre d'imagos prêt à essaimer (colonies essaimantes). Cette observation permet de proposer que la structure mixée soit le résultat d'un mélange entre colonies proches, suite à la disparition des reproducteurs dans des nids sur le déclin. Un argument en faveur de la fusion de colonies est apparu dans une des trois colonies essaimantes, avec la présence de deux fratries clairement définies génétiquement issues avec deux couples de reproducteurs non apparentés. L'origine des familles mixées, décrites chez quelques espèces de Termitidae, est rarement connue e.g. chez *Cubitermes* sp. *affinis subarquatus* (24% de familles mixées, N=15) (Roy *et al.*, 2010) et chez *S. euamignathus*, une espèce proche de *S. minutus*, où il a récemment été montré la présence de reproducteurs secondaires non apparentés issus d'au moins quatre couples de reproducteurs dans une colonie (Haifig *et al.*, 2016). Chez *Macrotermes michaelsoni* (12% de familles mixées, N=118), il apparait cependant clair que le processus impliqué soit la pléométrie (Hacker *et al.*, 2005).

2.2. Apparentement des reproducteurs et stratégies d'accouplement

La mesure du taux de consanguinité et du coefficient de parenté entre les membres stériles de la colonie a permis de confirmer la structure familiale i.e. le nombre de reproducteurs à la tête des colonies mais aussi de préciser leur apparentement. Chez *S. minutus*, les familles simples étaient issues d'un couple de reproducteurs non apparentés ($F_{IT} = 0,005$) (article 3). Les résultats obtenus chez *E. neotenicus* ont indiqué que certaines colonies étaient fondées à partir d'un couple de reproducteurs faiblement mais significativement apparentés ($F_{IT} = 0,039$) (article 2). De la même manière, un faible apparentement a été trouvé entre les reproducteurs à la tête des familles simples chez *C. tuberosus* ($F_{IT} = 0,060$) (Fournier *et al.*, 2016). Une colonie fondée par des reproducteurs apparentés montre un taux de consanguinité élevé dans la descendance sexuée, pouvant entraîner une baisse de la valeur sélective des individus. Les imagos étant amenés à quitter le nid pour fonder de nouvelles colonies, ce mode de reproduction pourrait être considéré comme désavantageux.

Les analyses moléculaires réalisées sur les espèces xylophages ont montré que l'apparentement entre reproducteurs primaires était peu fréquent, suggérant qu'il existe des mécanismes permettant de réguler la consanguinité chez les termites (Vargo et Husseneder, 2011). Il existe deux types de mécanismes influençant l'apparentement entre les reproducteurs

(Vargo et Husseneder, 2011) : les mécanismes indirects, qui se produisent avant la rencontre des futurs reproducteurs, et les mécanismes directs, qui se produisent lorsqu'ils entrent en contact. Parmi les mécanismes indirects, la distance de dispersion des imagos, des différences dans les capacités de dispersion des mâles et des femelles ou encore des différences dans la production des mâles et des femelles au sein d'une colonie, peuvent limiter la rencontre entre individus apparentés. Parmi les mécanismes directs, il est décrit la discrimination active des apparentés durant le choix du partenaire.

Concernant la distance de dispersion des imagos, il existe à ce jour peu d'études décrivant directement les distances de vol chez les termites mais ces rares observations de terrain estiment que les vols dépassent rarement une centaine de mètres (Nutting, 1969). Chez les Macrotermitinae, la distance de vol des ailés a été estimée à environ 30 mètres dans le genre *Macrotermes* (Neoh et Lee, 2009) et exceptionnellement jusqu'à 700 mètres dans le genre *Odontotermes* (Hu *et al.*, 2007). Il a été décrit que la dispersion des ailés diminuait le long du gradient d'humification correspondant aux différents régimes alimentaires (Eggleton et Tayasu, 2001). Ainsi, les termites humivores sont connus pour disperser sur de particulièrement courtes distances et présentent les plus faibles capacités de recolonisation en cas de perturbation de l'habitat (Eggleton et Tayasu, 2001, Gathorne-Hardy *et al.*, 2000, Nutting, 1969).

La plupart des données génétiques tendent au contraire à montrer que la distance de vol est suffisante pour limiter la rencontre entre individus apparentés et limiter ainsi la consanguinité dans les colonies. En effet, l'isolement par la distance, conséquence génétique directe d'une dispersion limitée n'a clairement été démontré que chez deux espèces de termites souterrains, *R. mallei* (Vargo et Carlson, 2006) et *S. lamanianus* (Husseneder *et al.*, 1998, Vargo et Husseneder, 2011). Chez les Termitidae humivores, *C. tuberosus* n'a montré aucune viscosité à l'échelle locale de 500 m (Fournier *et al.*, 2016). Les résultats obtenus sur *E. neotenicus* et *S. minutus* confirment cette absence de viscosité, avec un isolement par la distance non significatif à l'échelle de quelques kilomètres (articles 2 et 3). Les espèces AQS semblent donc capables d'éviter les accouplements consanguins par une dispersion efficace des ailés. La distance de vol dépend de nombreux facteurs environnementaux tels que le vent (vitesse et direction), la luminosité ou la pluie. Le vent semble être celui qui affecte le plus les distances de dispersion des ailés (Hu *et al.*, 2007) et pourrait intervenir de manière récurrente en forêt tropicale dans le cas de ces trois espèces.

L'hypothèse d'une différence dans la capacité de dispersion des mâles et des femelles est généralement plus difficile à argumenter. Un seul cas de biais en faveur d'un des deux sexes dans la distance de dispersion a été décrit chez *Zootermopsis nevadensis* (Shellman-Reeve, 1996). Il a été montré que les imagos femelles de cette espèce possédaient des réserves lipidiques, sources d'énergie utilisées pendant le vol, plus importantes que les mâles. Ceci leur permettrait de voler plus loin que les imagos mâles et donc d'éviter les accouplements entre apparentés. Chez *C. tuberosus*, les patrons de dispersion n'ont pas montré de différence significative entre imagos mâles et femelles, d'après les indices de différenciation génétique estimés à partir des génotypes microsatellites des reines et des rois (Fournier *et al.*, 2016). Chez *E. neotenicus* et *S. minutus*, les reines étaient trop peu nombreuses pour effectuer cette analyse. Cependant, une structuration plus marquée de la population de Petit Saut semble apparaître pour le génome mitochondrial de ces deux espèces, en particulier *S. minutus*, en comparaison avec le peu de structuration spatiale des marqueurs microsatellites. Ces résultats, très préliminaires et à interpréter avec prudence, pourraient indiquer une différence de patron de dispersion entre les sexes, avec un sexe femelle qui disperserait moins (articles 2 et 3). Des différences dans la production des imagos mâles et des femelles au sein d'une colonie permettraient également d'éviter la consanguinité. Cela a été observé chez quelques espèces comme *Coptotermes formosanus* (Rhinotermitidae) (Roisin et Lenz, 2002) et *Pseudacanthotermes militaris* (Termitidae, Macrotermitinae), chez qui un biais en faveur des mâles a été trouvé (Connétable *et al.*, 2012). Chez *S. minutus*, aucun biais de sexe ratio n'a été relevé dans la production des essaimants, à l'échelle coloniale comme populationnelle (article 3).

Un mécanisme direct basé sur la reconnaissance des individus apparentés a également été mis en évidence chez *Z. nevadensis*. Chez cette espèce, les imagos évitent de s'apparier avec des individus du même nid pendant la fondation de la colonie (Shellman-Reeve, 2001). Dans un cas opposé et relativement proche de ce que nous avons trouvé chez *E. neotenicus*, une étude réalisée sur *C. lacteus* a montré que les couples de reproducteurs à la tête des colonies étaient très faiblement apparentés, malgré une absence de structuration génétique à fine échelle (Thompson *et al.*, 2007). Ces résultats ont été interprétés par les auteurs comme une préférence pour des partenaires très légèrement apparentés par rapport à des partenaires sans aucun lien génétique, une stratégie appelée « optimal outbreeding » selon Bateson (1983). En effet, des accouplements entre partenaires légèrement apparentés pourraient avoir

des effets positifs sur la valeur sélective des parents, en augmentant la représentation des gènes identiques par descendance dans les futures générations (Kokko et Ots, 2006).

En conclusion, les essaimages des espèces AQS se traduisent par un vol couvrant des distances suffisantes pour assurer des accouplements entre individus peu ou pas apparentés. D'autres mécanismes, comme le choix du partenaire, sont susceptibles d'intervenir pour expliquer que les reproducteurs ne s'accouplent pas totalement au hasard, comme chez *E. neotenicus*. La perception des stratégies reproductives permet de mieux comprendre leurs conséquences sur le brassage génétique et la structuration des populations à plus large échelle.

2.3. Structuration génétique des populations

Le terme de « flux de gènes » est généralement employé pour désigner la migration efficace de gènes d'une population dans une autre, mais il peut également s'appliquer aux échanges de gènes entre individus au sein d'une même population. Au même titre que la sélection, la dérive génétique ou la mutation, les flux de gènes constituent un facteur évolutif majeur et jouent un rôle particulièrement important dans l'organisation de la diversité génétique à différentes échelles spatiales. Ainsi, le degré de différenciation génétique estimé entre les populations de termites est le résultat de processus contemporains de dispersion et de flux géniques, et des processus historiques de dérive et de sélection (Vargo et Husseneder, 2011).

Les résultats obtenus pour les trois espèces de Termitidae AQS, *E. neotenicus*, *S. minutus* et *C. tuberosus* montrent des niveaux de différenciation génétique bas ($F_{ST} = 0,03$, $0,02$ et $0,03$, respectivement) pour une échelle spatiale de l'ordre de 1 à 11 km, suggérant des flux de gènes très peu contraints sur le site de Petit Saut. Ces résultats sont très similaires à ceux trouvés chez deux autres Termitidae, *Macrotermes michaelseni* ($F_{ST} = 0,017$ pour une échelle spatiale de 0-50 km) (Brandl *et al.*, 2005) et *Nasutitermes nigriceps* ($F_{ST} = 0,03-0,11$ pour une échelle spatiale de 100-200 km) (Thompson et Hebert, 1998a, Thompson et Hebert, 1998b) pour qui les populations peuvent être considérées comme panmictiques. La faible structuration génétique a été confirmée chez les Termitidae AQS par un échec des algorithmes Bayésiens de regroupement non spatialisés à retrouver des clusters correspondant aux différents sites d'échantillonnage.

Il a été souligné que quand les données génétiques contiennent relativement peu d'information les algorithmes Bayésiens de regroupement non spatialisés, comme le

programme Structure, ne fournissent souvent pas d'indication claire de la structuration des populations. Cette observation est valable même quand les valeurs de F_{ST} entre sites sont significatives (Hubisz *et al.*, 2009), comme c'est le cas ici pour les trois espèces AQS. Au contraire, les algorithmes Bayésiens de regroupement explicitement spatialisés, comme le programme Geneland, exploitent les positions GPS des échantillons comme paramètres supplémentaires à l'analyse et sont à même de détecter une très faible structuration des populations. Dans le cas d'*E. neotenicus* et de *S. minutus*, les colonies échantillonnées sur les sites localisés près du barrage (River et Football Field pour les deux espèces, respectivement) ont pu être regroupées dans des clusters isolés du reste de la population de Petit Saut. Sur la base de simulations, il a été montré que le modèle implémenté dans Geneland semblait approprié pour inférer des barrières récentes aux flux géniques, comme les conséquences de la fragmentation ou la destruction d'un habitat (Balkenhol *et al.*, 2009, Blair *et al.*, 2012). L'isolement des sites River et Football Field pourrait ainsi être expliqué pour leur position particulièrement reculée au bout de la route de Petit Saut et leur inondation récurrente pouvant impacter les populations.

La différenciation des sites River et Football Field a été confirmée par les marqueurs mitochondriaux, avec la présence d'haplotypes uniques (haplotype 2 à River pour *E. neotenicus* et haplotypes 2 et 3 à Football Field pour *S. minutus*) (articles 2 et 3). Cette différenciation plus marquée du génome mitochondrial pourrait être expliquée par : 1) le plus petit effectif de taille efficace de population des marqueurs mitochondriaux et leur plus grande susceptibilité à la dérive génétique ou/et 2) une différence dans le patron de dispersion entre les sexes, avec le sexe femelle qui disperserait moins, tel que cela a été évoqué dans le paragraphe 2.2. Une telle différence est bien connue chez les fourmis, chez qui la combinaison de classes de marqueurs avec des modes alternés de transmission est souvent utilisée pour distinguer les contributions maternelles et paternelles aux flux géniques (Hardy *et al.*, 2008).

Au final, ces résultats constituent les premières données de structuration des populations pour les espèces de Termitidae AQS dans une trame de forêt continue sans, ou avec peu, de barrières limitant les échanges génétiques. Ces données viennent compléter les rares estimations de différenciation génétique existant pour les Termitidae à une échelle spatiale dépassant la dispersion active des ailés.

-Conclusion générale et perspectives-

L'analyse de la stratégie reproductive d'*E. neotenicus* et de *S. minutus*, deux termites Syntermitinae humivores, complétée par l'étude menée en parallèle de cette thèse sur *C. tuberosus*, Termitinae humivore, nous a permis de mettre en évidence le système « Asexual Queen Succession » chez les Termitidae (articles 1 et 3) (Founier *et al.*, 2016), stratégie jusqu'à maintenant décrite uniquement chez les espèces xylophages de la famille des Rhinotermitidae (Luchetti *et al.*, 2013b, Matsuura *et al.*, 2009, Vargo *et al.*, 2012). L'existence de l'AQS chez des groupes phylogénétiquement éloignés soulève la question de l'origine évolutive de cette stratégie au sein des termites. Comme chez les Rhinotermitidae, la stratégie AQS semble avoir évolué indépendamment au sein des Termitidae, comme l'atteste l'existence d'espèces très proches d'*E. neotenicus* et de *S. minutus* ne pratiquant pas la parthénogenèse. Ces premiers résultats sur le groupe des Termitidae, associés aux futures recherches sur d'autres espèces actuellement suspectées de pratiquer l'AQS, permettront de mieux comprendre l'évolution du système et son implication dans le succès écologique des espèces.

Nous avons en effet montré un avantage commun à l'ensemble des espèces AQS, à savoir la production d'un grand nombre de femelles issues de parthénogenèse par la reine primaire, ce qui permet la croissance rapide des colonies et la production d'un grand nombre d'imagos sexués avant l'essaimage. Cependant, le rôle adaptif du système semble variable et intimement lié aux cycles de vie, qui présentent des particularités propres aux espèces. Ainsi, les espèces AQS tirent bénéfice du même système pour prolonger la vie de la colonie (*Reticulitermes* spp. et *E. neotenicus*), optimiser un cycle de vie court (*S. minutus*), contrer un plateau de fertilité de la reine ou tirer parti de situations d'inquilinisme (*C. tuberosus*). Nos travaux ont également montré que les modes de parthénogenèse étaient très différents en fonction des espèces étudiées, les femelles néoténiques des Termitidae n'étant pas toutes homozygotes comme chez les Rhinotermitidae. La découverte et la publication des résultats sur les nouvelles espèces AQS ont ainsi remis en question et prolongé la réflexion sur les mécanismes génétiques sous-tendant le système. Le modèle d'empreintes génétiques paraît à ce jour une piste intéressante, et valable pour toutes les espèces AQS, pour comprendre le déterminisme de développement des femelles issues de parthénogenèse en néoténiques (Matsuura, 2016).

D'autre part, l'analyse de la structure génétique des colonies et des populations à fine échelle spatiale nous a apporté des réponses quant aux potentialités de dispersion des espèces de Termitidae AQS. Chez les trois espèces étudiées, l'analyse de la structure coloniale a

montré que la très grande majorité des colonies était fondée par un couple de reproducteurs non ou très faiblement apparentés. Ces résultats, confortés par une absence de viscosité à l'échelle locale, traduisent le fait que les imagos sont capables de disperser relativement loin et évitent ainsi la rencontre entre apparentés. Ces données sont en accord avec les quelques études génétiques menées chez d'autres Termitidae en faveur d'une capacité de dispersion des imagos sur de longues distances, contrairement à ce qui est classiquement décrit pour ce groupe, considéré comme un très mauvais colonisateur (Nutting, 1969). Cependant, il est important de noter que ces résultats ont été obtenus pour une matrice forestière continue, avec très peu d'obstacles physiques à la dispersion et à l'installation des reproducteurs pour la fondation. Les résultats obtenus sur la structuration génétique de la population de Petit Saut montrent en effet pour les trois espèces un flux de gènes très peu contraint à une échelle de plus de 10 km. L'analyse génétique des colonies d'*E. neotenicus* isolées dans des fragments forestiers de la mosaïque forêt-savane de la zone côtière en Guyane montrera très prochainement si la stratégie reproductive et de dispersion des ailés est impactée dans des habitats où la pression environnementale est forte.

-Références bibliographiques-

- AB MAJID, A. H., *et al.* 2014. Colony genetic organization and breeding pattern of subterranean termite (*Reticulitermes flavipes*) over the three field seasons in Nebraska, U.S.A. *Entomology, Ornithology & Herpetology*, 3, 133.
- ABE, T. 1987. Evolution of life types in termites. *Evolution and coadaptation in biotic communities*. Tokyo: University of Tokyo Press
- AFZAL, M. & SALIHAH, Z. 1985. Sex ratio, occurrence of parthenogenesis, ovarian development and oviposition behaviour of the primary reproductives of *Bifiditermes beesoni* (Gardner) (Isoptera, Kalotermitidae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 100, 132-146.
- ALDRICH, B. T. & KAMBHAMPATI, S. 2004. Microsatellite markers for two species of dampwood termites in the genus *Zootermopsis* (Isoptera: Termopsidae). *Molecular Ecology Notes*, 4, 719-721.
- ALDRICH, B. T. & KAMBHAMPATI, S. 2007. Population structure and colony composition of two *Zootermopsis nevadensis* subspecies. *Heredity*, 99, 443-451.
- ATKINSON, L. & ADAMS, E. S. 1997. The origins and relatedness of multiple reproductives in colonies of the termite *Nasutitermes corniger*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 264, 1131-1136.
- ATKINSON, L., *et al.* 2007. Microsatellite markers for the polygamous termite *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). *Molecular Ecology Notes*, 7, 299-301.
- ATKINSON, L., *et al.* 2008. Lack of evidence for nepotism by workers tending queens of the polygynous termite *Nasutitermes corniger*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62, 805-812.
- BALKENHOL, N., *et al.* 2009. Statistical approaches in landscape genetics: an evaluation of methods for linking landscape and genetic data. *Ecography*, 32, 818-830.
- BANDEIRA, A. G., *et al.* 2003. Effects of habitat disturbance on the termite fauna in a highland humid forest in the Caatinga domain, Brazil. *Sociobiology*, 42, 117-128.
- BANKHEAD-DRONNET, S., *et al.* 2015. Spatial structuring of the population genetics of a European subterranean termite species. *Ecology and Evolution*, 5, 3090-3102.
- BARBOSA, J. R. C., *et al.* 2012. Caste differentiation pathways in the Neotropical termite *Armitermes holmgreni* (Isoptera: Termitidae). *Zoological Science*, 29, 738-742.
- BATESON, P. 1983. Optimal outbreeding. In: BATESON, P. (ed.) *Mate choice*. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press.
- BAUDRY, E., *et al.* 2004. Whole-genome scan in thelytokous-laying workers of the Cape honeybee *Apis mellifera capensis*: central Fusion, reduced recombination rates and centromere mapping using half-tetrad analysis. *Genetics*, 167, 243-252.
- BELKHIR, K., *et al.* 2004. GENETIX 4.0. 5.2., Software under Windows™ for the genetics of the populations. Montpellier, France: University of Montpellier
- BENGTSSON, B. O. 2009. Asex and evolution: a very large-scale overview. In: SCHÖN, I., MARTENS, K. & DIJK, P. (eds.) *Lost sex: the evolutionary biology of parthenogenesis*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- BIGNELL, D. E. 2006. Termites as soil engineers and soil processors. In: KÖNIG, H. & VARMA, A. (eds.) *Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates*. Berlin, Heidelberg: Springer.

- BIGNELL, D. E. & EGGLETON, P. 2000. Termites in ecosystems. In: ABE, T., BIGNELL, D. & HIGASHI, M. (eds.) *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- BLAIR, C., *et al.* 2012. A simulation-based evaluation of methods for inferring linear barriers to gene flow. *Molecular Ecology Resources*, 12, 822-833.
- BONNET, C. 1745. *Traité d'insectologie, ou observations sur les pucerons*, Paris, Durand.
- BOOTH, W., *et al.* 2012. Population genetic structure and colony breeding system in dampwood termites (*Zootermopsis angusticollis* and *Z. nevadensis nuttingi*). *Insectes Sociaux*, 59, 127-137.
- BOOTH, W., *et al.* 2008. Identification and characterization of 15 polymorphic microsatellite loci in the western drywood termite, *Incisitermes minor* (Hagen). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1102-1104.
- BORDEREAU, C. & PASTEELS, J. M. 2011. Pheromones and chemical ecology of dispersal and foraging in termites. In: BIGNELL, E. D., ROISIN, Y. & LO, N. (eds.) *Biology of termites: a modern synthesis*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- BOURGUIGNON, T., *et al.* 2014. The evolutionary history of termites as inferred from 66 mitochondrial genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 32, 406-421.
- BOURKE, A. F. & FRANKS, N. R. 1995. *Social evolution in ants*, Princeton University Press.
- BRANDL, R., *et al.* 2004. Yearly variation in polygyny in the termite *Macrotermes michaelseni* (Sjöstedt). *Insectes Sociaux*, 51, 294-298.
- BRANDL, R., *et al.* 2005. High gene flow between populations of *Macrotermes michaelseni* (Isoptera, Termitidae). *Insectes Sociaux*, 52, 344-349.
- BRAUMAN, A. & FALL, S. Impact des termites humivores et de leur microflore digestive sur la transformation de la matière organique du sol. Congrès Mondial de la Science du Sol : Actes 1998 Montpellier.
- BUCHLI, H. 1950. Recherche sur la fondation et le développement des nouvelles colonies chez le termite lucifuge (*Reticulitermes lucifugus* Ressi). *Physiologia Comparata et Oecologia*, 2, 145-160.
- BULMER, M. S. & TRANIELLO, J. F. A. 2002. Foraging range expansion and colony genetic organization in the subterranean termite *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Environmental Entomology*, 31, 293-298.
- BULMER, S. M., *et al.* 2001. Variation in colony structure in the subterranean termite *Reticulitermes flavipes*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 49, 236-243.
- CAGNIANT, H. 1979. La parthénogénèse thélytoque et arrhénotoque chez la fourmi *Cataglyphis cursor* Fonsc. (Hym. Form.) cycle biologique en élevage des colonies avec reine et des colonies sans reine. *Insectes Sociaux*, 26, 51-60.
- CHENG, S., *et al.* 2013. Microsatellite markers uncover cryptic species of *Odontotermes* (Termitoidea: Termitidae) from Peninsular Malaysia. *Gene*, 518, 412-418.
- CLÉMENT, J. 1981. Enzymatic polymorphism in the European populations of various *Reticulitermes* species (Isoptera). *Biosystematics of Social Insects*, 19, 49-62.
- CONNÉTABLE, S., *et al.* 2012. Dispersal flight and colony development in the fungus-growing termites *Pseudacanthotermes spiniger* and *P. militaris*. *Insectes Sociaux*, 59, 269-277.
- CONSTANTINO, R. 1992. Notes on *Embiratermes* Fontes (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae), with descriptions of two new species from Amapa State, Brazil. *Boletim Do Museu Paraense Emilio Goeldi Serie Zoologia*, 8, 329-336.
- CONSTANTINO, R. 1994. A new genus of Nasutitermitinae with mandibulate soldiers from tropical North America (Isoptera: Termitidae). *Sociobiology*, 25, 285-294.

- CONSTANTINO, R. 1998. Catalog of the living termites of the New World (Insecta: Isoptera). Update on website <http://164.41.140.9/catal/>. *Arquivos de Zoologia*, 35, 135-231.
- CONSTANTINO, R. 2002. An illustrated key to Neotropical termite genera (Insecta: Isoptera) based primarily on soldiers. *Zootaxa*, 67, 1-40.
- CONSTANTINO, R. & CARVALHO, S. 2011. *Paracurvitermes*, a new genus of Syntermitinae (Isoptera : Termitidae). *Sociobiology*, 57, 377-388.
- COPREN, K. A. 2007. Characterization of microsatellite loci in the western subterranean termite, *Reticulitermes hesperus*, and cross-amplification in closely related cryptic species. *Journal of Insect Science*, 7.
- COSTA-LEONARDO, A. M., *et al.* 1998. Response to orphaning in two Neotropical termites: *Armitermes euamignathus* and *Embiratermes festivellus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 88, 109-114.
- CRESPI, B. J. & YANEGA, D. 1995. The definition of eusociality. *Behavioral Ecology*, 6, 109-115.
- CROZIER, R. H. & PAMILO, P. 1996. *Evolution of social insect colonies*, Oxford University Press.
- CUELLAR, O. 1977. Animal parthenogenesis. *Science*, 197, 837-843.
- DARLINGTON, J. 1985. Multiple primary reproductives in the termite *Macrotermes michaelseni* (Sjostedt). In: WATSON, J., OKOT-KOTBER, B. & NOIROT, C. (eds.) *Caste differentiation in social insects*. Oxford: Pergamon Press.
- DAVIES, R. G. 2002. Feeding group responses of a Neotropical termite assemblage to rain forest fragmentation. *Oecologia*, 133, 233-242.
- DEDEINE, F., *et al.* 2016. Historical biogeography of *Reticulitermes* termites (Isoptera: Rhinotermitidae) inferred from analyses of mitochondrial and nuclear loci. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94, Part B, 778-790.
- DEHEER, C. J. & KAMBLE, S. T. 2008. Colony genetic organization, fusion and inbreeding in *Reticulitermes flavipes* from the Midwestern U.S. *Sociobiology*, 51, 307-325.
- DEHEER, C. J., *et al.* 2005. The breeding system and population structure of the termite *Reticulitermes grassei* in Southwestern France. *Heredity*, 95, 408-415.
- DEHEER, C. J. & VARGO, E. L. 2004. Colony genetic organization and colony fusion in the termite *Reticulitermes flavipes* as revealed by foraging patterns over time and space. *Molecular Ecology*, 13, 431-441.
- DESJARDINS, P. & CONKLIN, D. 2010. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments*, e2565-e2565.
- DONOVAN, S. E., *et al.* 2001. Gut content analysis and a new feeding group classification of termites. *Ecological Entomology*, 26, 356-366.
- DOUMS, C., *et al.* 2013. Facultative use of thelytokous parthenogenesis for queen production in the polyandrous ant *Cataglyphis cursor*. *Journal of Evolutionary Biology*, 26, 1431-1444.
- DRONNET, S., *et al.* 2004. Polymorphic microsatellite loci in the European subterranean termite, *Reticulitermes santonensis* Feytaud. *Molecular Ecology Notes*, 4, 127-129.
- DRONNET, S., *et al.* 2005. Genetic analysis of the breeding system of an invasive subterranean termite, *Reticulitermes santonensis*, in urban and natural habitats. *Molecular Ecology*, 14, 1311-1320.
- DUPONT, L., *et al.* 2009. Genetic variability of the soil-feeding termite *Labiatermes labralis* (Termitidae, Nasutitermitinae) in the Amazonian primary forest and remnant patches. *Insect Conservation and Diversity*, 2, 53-61.

- EARL, D. A. & VONHOLDT, B. M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 359-361.
- EGGLETON, P. 2000. Global patterns of termite diversity. In: ABE, T., BIGNELL, D. & HIGASHI, M. (eds.) *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- EGGLETON, P. 2011. An introduction to termites: biology, taxonomy and functional morphology. In: BIGNELL, E. D., ROISIN, Y. & LO, N. (eds.) *Biology of termites: a modern synthesis*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- EGGLETON, P., *et al.* 2007. Response to Lo *et al.* *Biology Letters*, 3, 564-565.
- EGGLETON, P., *et al.* 1996. The diversity, abundance and biomass of termites under differing levels of disturbance in the Mbalmayo Forest Reserve, southern Cameroon. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 351, 51-68.
- EGGLETON, P., *et al.* 1995. The species richness of termites (Isoptera) under differing levels of forest disturbance in the Mbalmayo Forest Reserve, Southern Cameroon. *Journal of Tropical Ecology*, 11, 85-98.
- EGGLETON, P., *et al.* 1998. Body size and energy use in termites (Isoptera): the responses of soil feeders and wood feeders differ in a tropical forest assemblage. *Oikos*, 81, 525-530.
- EGGLETON, P. & TAYASU, I. 2001. Feeding groups, lifestyles and the global ecology of termites. *Ecological Research*, 16, 941-960.
- EMERSON, A. E. 1925. The termites of Kartabo, Bartica District, British Guiana. *Zoologica*, 6, 291-459.
- ENGEL, M. S., *et al.* 2009. Termites (Isoptera): their phylogeny, classification, and rise to ecological dominance. *American Museum Novitates*, 3650, 1-27.
- ENGEL, M. S. & KRISHNA, K. 2004. Family-group names for termites (Isoptera). *American Museum Novitates*, 1-9.
- ENSAF, A. 2010. *Les termites de la Guyane française : Isoptera: Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Termitidae*, Saarbrücken, Germany, Editions Universitaires Européennes.
- EVANNO, G., *et al.* 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611-2620.
- EVANS, T. A. 2010. Invasive termites. *Biology of termites: a modern synthesis*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- FOLMER, O., *et al.* 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294-299.
- FONTES, L. R. 1985. New genera and new species of Nasutitermitinae from the Neotropical region (Isoptera, Termitidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 3, 7-25.
- FOUGEYROLLAS, R., *et al.* 2015. Asexual queen succession in the higher termite *Embiratermes neotenicus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282, 20150260.
- FOURNIER, D., *et al.* 2005. Clonal reproduction by males and females in the little fire ant. *Nature*, 435, 1230-1234.
- FOURNIER, D., *et al.* 2016. Facultative asexual reproduction and genetic diversity of populations in the humivorous termite *Cavitermes tuberosus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283, 20160196.

- FUCHS, A., *et al.* 2003. Isolation and characterization of six microsatellite loci in the drywood termite *Cryptotermes secundus* (Kalotermitidae). *Molecular Ecology Notes*, 3, 355-357.
- GARCÍA, J., *et al.* 2002. Population structure and genetic diversity in insular populations of *Nasutitermes takasagoensis* (Isoptera: Termitidae) analyzed by AFLP markers. *Zoological Science*, 19, 1141-1146.
- GARNIER-SILLAM, E., *et al.* 1991. Rôle des termites sur le spectre poral des sols forestiers tropicaux. Cas de *Thoracotermes macrothorax* Sjöstedt (Termitinae) et de *Macrotermes mülleri* (Sjöstedt)(Macrotermitinae). *Insectes Sociaux*, 38, 397-412.
- GARNIER-SILLAM, E. & HARRY, M. 1995. Distribution of humic compounds in mounds of some soil-feeding termite species of tropical rainforests: its influence on soil structure stability. *Insectes Sociaux*, 42, 167-185.
- GATHORNE-HARDY, F., *et al.* 2000. The recolonization of the Krakatau islands by termites (Isoptera), and their biogeographical origins. *Biological Journal of the Linnean Society*, 71, 251-267.
- GOODISMAN, M. A. D. & CROZIER, R. H. 2002. Population and colony genetic structure of the primitive termite *Mastotermes darwiniensis*. *Evolution*, 56, 70-83.
- GOODISMAN, M. A. D., *et al.* 2001. Microsatellite markers in the primitive termite *Mastotermes darwiniensis*. *Molecular Ecology Notes*, 1, 250-251.
- GORDO, I. & CAMPOS, P. R. A. 2008. Sex and deleterious mutations. *Genetics*, 179, 621-626.
- GOUDET, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).
- GOUDET, J. 2005. Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5, 184-186.
- GRASSÉ, P. P. 1949. *Traité de zoologie*, Paris, Masson.
- GRASSÉ, P. P. (ed.) 1982. *Termitologia. Tome I. Anatomie. Physiologie. Reproduction*, Paris: Masson.
- GRASSÉ, P. P. (ed.) 1984. *Termitologia. Tome II. Fondation des sociétés - Construction*, Paris: Masson.
- GRASSÉ, P. P. (ed.) 1986. *Termitologia. Tome III. Comportement. Socialité. Ecologie. Evolution. Systématique*, Paris: Masson.
- GRIMALDI, D. A. & ENGEL, M. S. 2005. *Evolution of the insects*, Cambridge, U.K., Cambridge University Press.
- GUILLOT, G., *et al.* 2005. GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, 5, 712-715.
- HACKER, M., *et al.* 2005. Unrelated queens coexist in colonies of the termite *Macrotermes michaelseni*. *Molecular Ecology*, 14, 1527-1532.
- HAIFIG, I. & COSTA-LEONARDO, A. M. 2016. Caste differentiation pathways in the Neotropical termite *Silvestritermes euamignathus* (Isoptera: Termitidae). *Entomological Science*, 19, 174-179.
- HAIFIG, I., *et al.* 2016. Unrelated secondary reproductives in the neotropical termite *Silvestritermes euamignathus* (Isoptera: Termitidae). *The Science of Nature*, 103, 1-8.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999. 95-98.
- HAMILTON, W. D. 1964. The genetical evolution of social behaviour II. *Journal of theoretical biology*, 7, 17-52.
- HARDY, O. J., *et al.* 2008. Small-scale spatial genetic structure in an ant species with sex-biased dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 93, 465-473.

- HARRY, M., *et al.* 2001. Microsatellite markers in soil-feeding termites (*Cubitermes subarquatus*, Isoptera, Termitidae, Termitinae). *Molecular Ecology Notes*, 1, 226-228.
- HARRY, M., *et al.* 2007. Isolation and characterization of microsatellite markers in *Labiatermes labralis* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). *Molecular Ecology Notes*, 7, 121-123.
- HARTKE, T. R. & BAER, B. 2011. The mating biology of termites: a comparative review. *Animal Behaviour*, 82, 927-936.
- HAUSBERGER, B., *et al.* 2011. Uncovering cryptic species diversity of a termite community in a West African savanna. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61, 964-969.
- HAYASHI, Y., *et al.* 2005. Diverse colony genetic structures in the Japanese subterranean termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera:Rhinotermitidae). *Sociobiology*, 46, 175-184.
- HAYASHI, Y., *et al.* 2002. Microsatellite loci in the Japanese subterranean termite, *Reticulitermes speratus*. *Molecular Ecology Notes*, 2, 518-520.
- HAYASHI, Y., *et al.* 2003. Parthenogenetic reproduction in neotenic of the subterranean termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Entomological Science*, 6, 253-257.
- HEBERT, P. D. N., *et al.* 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 313-321.
- HEBERT, P. D. N., *et al.* 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 96-99.
- HEDRICK, P. W. & GARCIA-DORADO, A. 2016. Understanding inbreeding depression, purging, and genetic rescue. *Trends in Ecology & Evolution*, in press.
- HOLMGREN, N. 1906. Studien fiber sfidamerikanische Termiten. *Zoologische Jahrbuecher Systematik*, 23, 371-676.
- HOLMGREN, N. 1912. Systematik der Termiten. Die familie Metatermitidae. *Termitenstudien III.: Kol.Svenska Vetenskapakad. Handl.*
- HOWARD, R. W., *et al.* 1981. Laboratory evaluation of within-species, between-species, and parthenogenetic reproduction in *Reticulitermes flavipes* and *Reticulitermes virginicus*. *Psyche*, 88, 75-87.
- HU, J., *et al.* 2007. Alate dispersal distances of the black-winged subterranean termite *Odontotermes formosanus* (Isoptera: Termitidae) in southern China. *Sociobiology*, 50, 513-520.
- HUANG, Q., *et al.* 2013. Genetic analysis of population structure and reproductive mode of the termite *Reticulitermes chinensis* Snyder. *PLoS ONE*, 8, e69070.
- HUBISZ, M. J., *et al.* 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1322-1332.
- HUSSENER, C., *et al.* 1998. Variation between and within colonies in the termite: morphology, genomic DNA, and behaviour. *Molecular Ecology*, 7, 983-990.
- HUSSENER, C., *et al.* 2013. Characterization of microsatellites for population genetic analyses of the fungus-growing termite *Odontotermes formosanus* (Isoptera: Termitidae). *Environmental Entomology*, 42, 1092-1099.
- HUSSENER, C. & GRACE, J. K. 2001a. Evaluation of DNA fingerprinting, aggression tests, and morphometry as tools for colony delineation of the Formosan subterranean termite. *Journal of Insect Behavior*, 14, 173-186.
- HUSSENER, C. & GRACE, J. K. 2001b. Similarity is relative: hierarchy of genetic similarities in the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) in Hawaii. *Environmental Entomology*, 30, 262-266.

- HUSSENER, C., *et al.* 2012. Transcriptome profiling of female alates and egg-laying queens of the Formosan subterranean termite. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 7, 14-27.
- HUSSENER, C., *et al.* 2006. Genetic diversity and genotypic differentiation between the sexes in swarm aggregations decrease inbreeding in the Formosan subterranean termite. *Insectes Sociaux*, 53, 212-219.
- HUSSENER, C., *et al.* 2002. Multilocus DNA fingerprinting and microsatellite genotyping: complementary molecular approaches to investigating colony and population genetic structure in subterranean termites. *Sociobiology*, 40, 217-226.
- HUSSENER, C., *et al.* 2003. Molecular genetic methods: new approaches to termite biology. *Wood deterioration and preservation*. American Chemical Society.
- INDRAYANI, Y., *et al.* 2006. Development of microsatellite markers for the drywood termite *Incisitermes minor* (Hagen). *Molecular Ecology Notes*, 6, 1249-1251.
- INWARD, D., *et al.* 2007a. Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. *Biology Letters*, 3, 331-335.
- INWARD, D. J. G., *et al.* 2007b. A comprehensive phylogenetic analysis of termites (Isoptera) illuminates key aspects of their evolutionary biology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 953-967.
- JAKOBSSON, M. & ROSENBERG, N. A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23, 1801-1806.
- JOMBART, T. 2008. ADEGENET: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24, 1403-1405.
- JONES, A. G. 2005. gerud 2.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. *Molecular Ecology Notes*, 5, 708-711.
- JONES, C. G., *et al.* 1996. Organisms as ecosystem engineers. *Ecosystem management: selected readings*. New York: Springer.
- JONES, D., *et al.* 2003. Termite assemblage collapse along a land-use intensification gradient in lowland central Sumatra, Indonesia. *Journal of Applied Ecology*, 40, 380-391.
- JONES, O. R. & WANG, J. 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources*, 10, 551-555.
- KAIB, M., *et al.* 2000. Microsatellite loci in *Macrotermes michaelseni* (Isoptera: Termitidae). *Molecular Ecology*, 9, 502-504.
- KAIB, M., *et al.* 1996. Kin-biased foraging in a termite. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 263, 1527-1532.
- KAWATSU, K. & MATSUURA, K. 2013. Preadaptation for parthenogenetic colony foundation in subterranean termites *Reticulitermes* spp. (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Ethology*, 31, 123-128.
- KEARNEY, M. R. 2003. Why is sex so unpopular in the Australian desert? *Trends in ecology & evolution*, 18, 605-607.
- KELLNER, K. & HEINZE, J. 2011. Mechanism of facultative parthenogenesis in the ant *Platythyrea punctata*. *Evolutionary Ecology*, 25, 77-89.
- KOBAYASHI, K., *et al.* 2013. Sex ratio biases in termites provide evidence for kin selection. *Nature Communications*, 4.
- KOBAYASHI, K. & MIYAGUNI, Y. 2016. Facultative parthenogenesis in the Ryukyu drywood termite *Neotermes koshunensis*. *Scientific Reports*, 6, 30712.
- KOKKO, H. & OTS, I. 2006. When not to avoid inbreeding. *Evolution*, 60, 467-475.

- KONOVALOV, D. A., *et al.* 2004. kingroup: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Molecular Ecology Notes*, 4, 779-782.
- KRISHNA, K., *et al.* 2013. Treatise on the Isoptera of the world. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 377, 2433-2705.
- KRONAUER, D. J. C., *et al.* 2012. Asexual reproduction in introduced and native populations of the ant *Cerapachys biroi*. *Molecular Ecology*, 21, 5221-5235.
- LAWTON, J. H., *et al.* 1998. Biodiversity inventories, indicator taxa and effects of habitat modification in tropical forest. *Nature*, 391, 72-76.
- LEBRUN, D. 1978. Implications hormonales dans la morphogenese des castes du termite *Kaloterme flavicollis* Fabr. *Bulletin de la Société zoologique de France*.
- LEFEUVE, P. 1990. A propos des termites de Guyane Française. *Bois et forêts des tropiques*, 224, 59-64.
- LENIAUD, L., *et al.* 2010. Geographical distribution, genetic diversity and social organization of a new European termite, *Reticulitermes urbis* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Biological Invasions*, 12, 1389-1402.
- LI, Z.-Q. 2014. Development and isolation of 17 polymorphic microsatellite loci in *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology*, 59, 1151-1155.
- LIGHT, S. 1944. Experimental studies on ectohormonal control of the development of supplementary reproductives in the termite genus *Zootermopsis* (formerly *Termopsis*). *University of California Publications in Zoology*, 43, 454.
- LIU, H. & BECKENBACH, A. T. 1992. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1, 41-52.
- LO, N., *et al.* 2009. Should environmental caste determination be assumed for termites? *The American Naturalist*, 173, 848-53.
- LOPES DE GERENYU, V. O., *et al.* 2015. Termites as a factor of spatial differentiation of CO₂ fluxes from the soils of monsoon tropical forests in southern Vietnam. *Eurasian Soil Science*, 48, 208-217.
- LUCHETTI, A., *et al.* 2013a. Extreme genetic mixing within colonies of the wood-dwelling termite *Kaloterme flavicollis* (Isoptera, Kalotermitidae). *Molecular Ecology*, 22, 3391-3402.
- LUCHETTI, A., *et al.* 2013b. Breeding systems and reproductive strategies in Italian *Reticulitermes* colonies (Isoptera: Rhinotermitidae). *Insectes Sociaux*, 60, 203-211.
- LUKE, S. H., *et al.* 2014. Functional structure of ant and termite assemblages in old growth forest, logged forest and oil palm plantation in Malaysian Borneo. *Biodiversity and Conservation*, 23, 2817-2832.
- LUYKX, P. 1993. Turnover in termite colonies: a genetic study of colonies of *Incisitermes schwarzi* headed by replacement reproductives. *Insectes Sociaux*, 40, 191-205.
- LYNCH, M. & GABRIEL, W. 1990. Mutation load and the survival of small populations. *Evolution*, 44, 1725-1737.
- MALAUSSA, T., *et al.* 2011. High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources*, 11, 638-644.
- MASUKO, K. 2013. Thelytokous parthenogenesis in the ant *Strumigenys hexamera* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 106, 479-484.
- MASUKO, K. 2014. Thelytokous parthenogenesis in the ant *Myrmecina nipponica* (Hymenoptera: Formicidae). *Zoological Science*, 31, 582-586.
- MATHEWS, A. 1977. *Studies on termites from the Mato Grosso State, Brazil*. Academia Brasileira de Ciências.

- MATSUURA, K. 2011. Sexual and asexual reproduction in termites. *In*: BIGNELL, D. E., ROISIN, Y. & LO, N. (eds.) *Biology of termites: a modern synthesis*. Dordrecht, The Netherlands: Springer
- MATSUURA, K. 2016. Genetics of social systems, social evolution and pheromone communication in termites. *Journal of Experimental Biology Symposium 2016 : Evolution of Social Behaviour*. Mürren, Switzerland.
- MATSUURA, K., *et al.* 2004. Sexual and asexual colony foundation and the mechanism of facultative parthenogenesis in the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera, Rhinotermitidae). *Insectes Sociaux*, 51, 325-332.
- MATSUURA, K. & KOBAYASHI, N. 2007. Size, hatching rate, and hatching period of sexually and asexually produced eggs in the facultatively parthenogenetic termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Applied Entomology and Zoology*, 42, 241-246.
- 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, 119-124.
- MATSUURA, K., *et al.* 2009. Queen succession through asexual reproduction in termites. *Science*, 323, 1687.
- MEEÛS, T., *et al.* 2007. Asexual reproduction: genetics and evolutionary aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1355-1372.
- MITTWOCH, U. 1978. Parthenogenesis. *Journal of Medical Genetics*, 15, 165-181.
- MIURA, T., *et al.* 2000. Molecular phylogeny and biogeography of the nasute termite genus *Nasutitermes* (Isoptera: Termitidae) in the pacific tropics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17, 1-10.
- MIYAGUNI, Y., *et al.* 2013. The unusual neotenic system of the Asian dry wood termite, *Neotermes koshunensis* (Isoptera: Kalotermitidae). *Sociobiology*, 60, 65-68.
- MONAGHAN, M. T., *et al.* 2009. Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Systematic Biology*, 58, 298-311.
- MUNA, N. & O'RYAN, C. 2016. Isolation and characterization of the first microsatellite markers for the southern harvester termite, *Microhodotermes viator*. *Bulletin of Entomological Research*, 106, 488-493.
- MYLES, T. G. 1999. Review of secondary reproduction in termites (Insecta: Isoptera) with comments on its role in termite ecology and social evolution. *Sociobiology*, 33, 1-91.
- NALEPA, A. C., *et al.* 2001. Flight characteristics of *Mastotermes darwiniensis* (Isoptera, Mastotermitidae). *Insectes Sociaux*, 48, 144-148.
- NEAVES, W. B. & BAUMANN, P. 2011. Unisexual reproduction among vertebrates. *Trends in Genetics*, 27, 81-88.
- NEOH, K.-B. & LEE, C.-Y. 2009. Flight activity of two sympatric termite species, *Macrotermes gilvus* and *Macrotermes carbonarius* (Termitidae: Macrotermitinae). *Environmental Entomology*, 38, 1697-1706.
- NOBRE, T., *et al.* 2008. Colony interactions in *Reticulitermes grassei* population assessed by molecular genetic methods. *Insectes Sociaux*, 55, 66-73.
- NOIROT, C. 1956. Les sexués de remplacement chez les Termites supérieurs (Termitidae). *Insectes Sociaux*, 3, 145-158.
- NOIROT, C. 1969. Formation of castes in the higher termites. *In*: KRISHNA, K. & WEESNER, F. (eds.) *Biology of termites*. New York: Academic Press.
- NUTTING, W. L. 1969. Flight and colony foundation. *In*: KRISHNA, K. & WEESNER, F. M. (eds.) *Biology of termites*. New York: Academic Press.
- OHKAWARA, K., *et al.* 2006. Clonal reproduction and genetic caste differences in a queen-polymorphic ant, *Vollenhovia emeryi*. *Biology Letters*, 2, 359-363.

- OHKUMA, M., *et al.* 2004. Molecular phylogeny of Asian termites (Isoptera) of the families Termitidae and Rhinotermitidae based on mitochondrial COII sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31, 701-710.
- PAMILO, P., *et al.* 1997. Molecular population genetics of social insects. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28, 1-25.
- PARMAN, V. & VARGO, E. L. 2008. Population density, species abundance, and breeding structure of subterranean termite colonies in and around infested houses in Central North Carolina. *Journal of Economic Entomology*, 101, 1349-1359.
- PEARCY, M., *et al.* 2004. Conditional use of sex and parthenogenesis for worker and queen production in ants. *Science*, 306, 1780-1783.
- PEARCY, M., *et al.* 2011. Sib mating without inbreeding in the longhorn crazy ant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278, 2677-2681.
- PEARCY, M., *et al.* 2006. Thelytokous parthenogenesis and its consequences on inbreeding in an ant. *Heredity*, 96, 377-382.
- PERDEREAU, E., *et al.* 2010. High occurrence of colony fusion in a European population of the American termite *Reticulitermes flavipes*. *Insectes Sociaux*, 57, 393-402.
- PERDEREAU, E., *et al.* 2015. Relationship between invasion success and colony breeding structure in a subterranean termite. *Molecular Ecology*, 24, 2125-2142.
- PERDEREAU, E., *et al.* 2013. Colony breeding structure of the invasive termite *Reticulitermes urbis* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology*, 106, 2216-2224.
- POSTLE, A. C. & SCHEFFRAHN, R. H. 2016. A new termite (Isoptera, Termitidae, Syntermitinae, Macuxitermes) from Colombia. *ZooKeys*, 587, 21-35.
- PRITCHARD, J., *et al.* 2010. Documentation for structure software: Version 2.3. Chicago: University of Chicago.
- QUELLER, D. C. & STRASSMANN, J. E. 1998. Kin selection and social Insects. Social insects provide the most surprising predictions and satisfying tests of kin selection. *Bioscience*, 48, 165-175.
- RABELING, C. & KRONAUER, D. J. C. 2013. Thelytokous parthenogenesis in eusocial Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 58, 273-292.
- RABELING, C., *et al.* 2009. Thelytokous parthenogenesis in the fungus-gardening ant *Mycocepurus smithii* (Hymenoptera: Formicidae). *PLoS ONE*, 4, e6781.
- RAMASAMY, R. K., *et al.* 2014. STRUCTURE PLOT: a program for drawing elegant STRUCTURE bar plots in user friendly interface. *SpringerPlus*, 3, 1.
- RATNASINGHAM, S. & HEBERT, P. D. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7, 355-364.
- REY, O. 2011. *Systèmes de reproduction et scénarios d'invasion chez la petite fourmi de feu, Wasmannia auropunctata*. Thèse de Doctorat SupAgro.
- ROCHA, M. M., *et al.* 2012. Neotropical termites: revision of *Armitermes* Wasmann (Isoptera, Termitidae, Syntermitinae) and phylogeny of the Syntermitinae. *Systematic Entomology*, 37, 793-827.
- ROFF, D. A. 2002. Inbreeding depression: tests of the overdominance and partial dominance hypotheses. *Evolution*, 56, 768-775.
- ROISIN, Y. 1992. Development of non-reproductive castes in the neotropical termite genera *Cornitermes*, *Embiratermes* and *Rhynchotermes* (Isoptera, Nasutitermitinae). *Insectes Sociaux*, 39, 313-324.
- ROISIN, Y. 2000. Diversity and evolution of caste patterns. In: ABE, T., BIGNELL, D. & HIGASHI, M. (eds.) *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

- ROISIN, Y. & KORB, J. 2011. Social organisation and the status of workers in termites. *In*: BIGNELL, E. D., ROISIN, Y. & LO, N. (eds.) *Biology of termites: a modern synthesis*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- ROISIN, Y. & LENZ, M. 2002. Origin of male-biased sex allocation in orphaned colonies of the termite, *Coptotermes lacteus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 51, 472-479.
- ROSS, K. G. 2001. Molecular ecology of social behaviour: analyses of breeding systems and genetic structure. *Molecular Ecology*, 10, 265-284.
- ROUGHGARDEN, J. 1991. The evolution of sex. *The American Naturalist*, 138, 934-953.
- ROULAND-LEFÈVRE, C. 2011. Termites as pests of agriculture. *In*: BIGNELL, E. D., ROISIN, Y. & LO, N. (eds.) *Biology of termites: a modern synthesis*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- ROUSSET, F. 2008. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103-106.
- ROY, V., *et al.* 2014. Species delimitation and phylogeny in the genus *Nasutitermes* (Termitidae: Nasutitermitinae) in French Guiana. *Molecular Ecology*, 23, 902-920.
- ROY, V., *et al.* 2010. Parentage analysis in Gabonese colonies of soil-feeding termites belonging to the *Cubitermes* sp. *affinis subarquatus* complex of species (Termitidae: Termitinae). *Insect Science*, 17, 84-90.
- SCHAEFER, I., *et al.* 2006. No evidence for the 'Meselson effect' in parthenogenetic oribatid mites (Oribatida, Acari). *Journal of Evolutionary Biology*, 19, 184-193.
- SCHMIDT, A. M., *et al.* 2013. Isolated in an ocean of grass: low levels of gene flow between termite subpopulations. *Molecular Ecology*, 22, 2096-2105.
- SCHMIDT, A. M., *et al.* 2007. Isolation and characterization of 10 microsatellite loci in the magnetic termite, *Amitermes meridionalis* (Isoptera: Termitidae). *Molecular Ecology Notes*, 7, 1045-1047.
- SCHWANDER, T. & CRESPI, B. J. 2009. Multiple direct transitions from sexual reproduction to apomictic parthenogenesis in *Timema* stick insects. *Evolution*, 63, 84-103.
- SHELLMAN-REEVE, J. S. 1996. Operational sex ratios and lipid reserves in the dampwood termite *Zootermopsis nevadensis* (Hagen) (Isoptera: Termopsidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 69, 139-146.
- SHELLMAN-REEVE, J. S. 1997. The spectrum of eusociality in termites. *In*: CHOE, J. C. & CRESPI, B. J. (eds.) *The evolution of social behavior in insects and arachnids*. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press.
- SHELLMAN-REEVE, J. S. 2001. Genetic relatedness and partner preference in a monogamous, wood-dwelling termite. *Animal Behaviour*, 61, 869-876.
- SCHÖN, I., *et al.* 2009. *Lost sex: the evolutionary biology of parthenogenesis*, Springer Science & Business Media.
- SIEBERS, N., *et al.* 2015. Origin and alteration of organic matter in termite mounds from different feeding guilds of the Amazon rainforests. *PLoS ONE*, 10, e0123790.
- SILLAM-DUSSES, D. 2011. Trail pheromones and sex pheromones in termites: glandular origin, chemical nature, and potential use in pest management. *In*: GREGORY, I. (ed.) *Pheromones: theories, types and uses*. New York: Nova Publishers.
- SILLAM-DUSSÈS, D. 2010. *Trail pheromones and sex pheromones in termites*, Nova Science Publishers/Novinka.
- SIMON, J. C., *et al.* 2003. Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79, 151-163.

- SINGHAM, G. V., *et al.* 2012. Polymorphic microsatellite loci from an indigenous Asian fungus-growing termite, *Macrotermes gilvus* (Blattodea: Termitidae) and cross amplification in related taxa. *Environmental Entomology*, 41, 426-431.
- STANSLY, P. A. & KORMAN, A. K. 1993. Parthenogenic development in *Velocitermes* spp. (Isoptera: Nasutiterminae). *Sociobiology*, 23, 13-24.
- SU, N.-Y. & SCHEFFRAHN, R. H. 2000. Termites as pests of buildings. *In*: ABE, T., BIGNELL, D. E. & HIGASHI, M. (eds.) *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- SUOMALAINEN, E. 1950. Parthenogenesis in animals. *In*: FRIEDMANN, T., DUNLAP, J. C. & GOODWIN, S. F. (eds.) *Advances in genetics*. Academic Press.
- TAMURA, K., *et al.* 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- THOMPSON, G. J. & HEBERT, P. D. N. 1998a. Population genetic structure of the Neotropical termite *Nasutitermes nigriceps* (Isoptera: Termitidae). *Heredity*, 80, 48-55.
- THOMPSON, G. J., *et al.* 2000. Microsatellites in the subterranean, mound-building termite *Coptotermes lacteus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Molecular Ecology*, 9, 1932-1934.
- THOMPSON, G. J., *et al.* 2007. Molecular-genetic analyses of dispersal and breeding behaviour in the Australian termite *Coptotermes lacteus*: evidence for non-random mating in a swarm-dispersal mating system. *Australian Journal of Zoology*, 55, 219-227.
- THOMPSON, J. G. & HEBERT, N. P. D. 1998b. Probing termite social systems through allozyme and mtDNA analysis: a case study of *Nasutitermes nigriceps* and *Nasutitermes costalis* (Isoptera, Termitidae). *Insectes Sociaux*, 45, 289-299.
- THORNE, B. 1982. Polygyny in termites: multiple primary queens in colonies of *Nasutitermes corniger* (Motschuls) (Isoptera: Termitidae). *Insectes Sociaux*, 29, 102-117.
- THORNE, B. L. 1984. Polygyny in the Neotropical termite *Nasutitermes corniger*: life history consequences of queen mutualism. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 14, 117-136.
- THORNE, B. L. 1997. Evolution of eusociality in termites. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28, 27-54.
- THORNE, B. L., *et al.* 2003. Evolution of eusociality and the soldier caste in termites: influence of intraspecific competition and accelerated inheritance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 12808-12813.
- THORNE, B. L., *et al.* 1999. Reproductive dynamics and colony structure of subterranean termites of the genus *Reticulitermes* (Isoptera Rhinotermitidae): a review of the evidence from behavioral, ecological, and genetic studies. *Ethology Ecology & Evolution*, 11, 149-169.
- TIMMERMANS, M. T. N. & ELLERS, J. 2009. *Wolbachia* endosymbiont is essential for egg hatching in a parthenogenetic arthropod. *Evolutionary Ecology*, 23, 931-942.
- TSAI, Y.-H. E. 2011. PhyloGeoViz: a web-based program that visualizes genetic data on maps. *Molecular Ecology Resources*, 11, 557-561.
- VAN OOSTERHOUT, C., *et al.* 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535-538.
- VARGO, E. L. 2000. Polymorphism at trinucleotide microsatellite loci in the subterranean termite *Reticulitermes flavipes*. *Molecular Ecology*, 9, 817-820.
- VARGO, E. L. 2003a. Genetic structure of *Reticulitermes flavipes* and *R. virginicus* (Isoptera: Rhinotermitidae) colonies in an urban habitat and tracking of colonies following treatment with Hexaflumuron Bait. *Environmental Entomology*, 32, 1271-1282.

- VARGO, E. L. 2003b. Hierarchical analysis of colony and population genetic structure of the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes*, using two classes of molecular markers. *Evolution*, 57, 2805-2818.
- VARGO, E. L. & CARLSON, J. R. 2006. Comparative study of breeding systems of sympatric subterranean termites (*Reticulitermes flavipes* and *R. hageni*) in Central North Carolina using two classes of molecular genetic markers. *Environmental Entomology*, 35, 173-187.
- VARGO, E. L. & HENDERSON, G. 2000. Identification of polymorphic microsatellite loci in the Formosan subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Molecular Ecology*, 9, 1935-1938.
- VARGO, E. L. & HUSSENER, C. 2009. Biology of subterranean termites: insights from molecular studies of *Reticulitermes* and *Coptotermes*. *Annual Review of Entomology*, 54, 379-403.
- VARGO, E. L. & HUSSENER, C. 2011. Genetic structure of termite colonies and populations. In: BIGNELL, E. D., ROISIN, Y. & LO, N. (eds.) *Biology of termites: a modern synthesis*. Dordrecht, The Netherlands: Springer
- VARGO, E. L., *et al.* 2003. Colony and population genetic structure of the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*, in Japan. *Molecular Ecology*, 12, 2599-2608.
- VARGO, E. L., *et al.* 2006. Relative abundance and comparative breeding structure of subterranean termite colonies (*Reticulitermes flavipes*, *Reticulitermes hageni*, *Reticulitermes virginicus*, and *Coptotermes formosanus*) in a South Carolina lowcountry site as revealed by molecular markers. *Annals of the Entomological Society of America*, 99, 1101-1109.
- VARGO, E. L., *et al.* 2012. Asexual queen succession in the subterranean termite *Reticulitermes virginicus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279, 813-819.
- VARGO, E. L., *et al.* 2013. Clinal variation in colony breeding structure and level of inbreeding in the subterranean termites *Reticulitermes flavipes* and *R. grassei*. *Molecular Ecology*, 22, 1447-1462.
- WASMANN, E. 1897. *Termiten von Madagaskar und Ostafrika*, Diesterweg.
- WATT, A. D., *et al.* 1997. Impact of forest management on insect abundance and damage in a lowland tropical forest in southern Cameroon. *Journal of Applied Ecology*, 18, 985-998.
- WEESNER, F. M. 1956. *The biology of colony foundation in Reticulitermes hesperus* Banks, University of California Press.
- WEIR, B. S. & COCKERHAM, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.
- WEIß, C. H. 2007. Statsoft, inc., tula, ok.: Statistica, version 8. *Advances in Statistical Analysis*, 91, 339-341.
- WENSELEERS, T. & VAN OYSTAEYEN, A. 2011. Unusual modes of reproduction in social insects: shedding light on the evolutionary paradox of sex. *BioEssays*, 33, 927-937.
- WERREN, J. H. 2011. Selfish genetic elements, genetic conflict, and evolutionary innovation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 10863-10870.
- WERREN, J. H., *et al.* 1988. Selfish genetic elements. *Trends in ecology & evolution*, 3, 297-302.
- WHITE, M. J. D. 1977. *Animal cytology and evolution*, Cambridge, U.K., Cambridge University Press.

- WILSON, E. O. & HÖLLDOBLER, B. 2005. Eusociality: origin and consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 13367-13371.
- WOOD, T. G. 1988. Termites and the soil environment. *Biology and Fertility of Soils*, 6, 228-236.
- WRIGHT, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19, 395-420.
- WRIGHT, S. 1978. Vol. 4: Variability within and among natural populations. *Evolution and the genetics of populations: a treatise in four volumes*. Chicago: University of Chicago Press.
- YAMAMOTO, Y. & MATSUURA, K. 2012. Genetic influence on caste determination underlying the asexual queen succession system in a termite. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66, 39-46.
- YEAP, B.-K., *et al.* 2011. Genetic analysis of population structure of *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae) in native and introduced populations. *Environmental Entomology*, 40, 470-476.

-Annexes-

Annexe 1 : Ensemble des colonies échantillonnées sur le site de Petit Saut et des individus utilisés dans les analyses génétiques pour *Embiratermes neotenicus*. AQS : nomenclature et individus utilisés dans l'étude AQS, POP : nomenclature et individus utilisés dans l'étude de génétique des populations. RP ♀ : reines primaires, RP ♂ : rois primaires, IM (♂/♀) : imagos mâles et femelles, FN : femelles néoténiques, MN, mâles néoténiques, NY (♂/♀) : nymphes mâles et femelles, O : ouvriers, S : soldats.

Espèce	Site	Colonie	Code AQS	Code POP	Coordonnées GPS	Campagne	RP ♀	RP ♂	IM (♂/♀)	FN	MN	NY (♂/♀)	O AQS	S AQS	O POP	S POP
<i>Embiratermes neotenicus</i>	RR1	G12-110	A	110	N5 04.067 W52 58.773	oct-12	-	1	-	20	-	-	15	-	15	-
	PK24	G12-83A	B	83A	N5 04.584 W53 01.356	oct-12	-	1	-	20	-	-	20	18	1	19
	PK24	Em2	C	Em2	N5 04.568 W53 01.309	oct-12	-	1	-	60	-	-	14	15	6	14
	P305	G13-10	D	10	N5 04.502 W52 58.404	mai-13	-	1	-	20	-	10 / 10	20	20	1	19
	P305	G13-17	E	17	N5 04.514 W52 58.104	mai-13	-	1	-	19	-	-	20	15	5	15
	P305	G13-25	F	25	N5 04.534 W52 58.436	mai-13	-	1	-	20	-	10 / 08	19	20	-	20
	P305	G13-32	G	32	N5 07.202 W52 57.924	mai-13	1	1	-	-	-	-	20	20	9	11
	River	G14-54	H	54	N5 04.163 W53 03.188	mars-14	-	1	-	20	-	-	20	20	-	20
	River	G14-41	I	41	N5 04.135 W53 03.196	mars-14	-	1	-	20	-	-	20	20	-	20
	River	G14-27	J	27	N5 05.331 W52 57.872	mars-14	-	1	-	20	-	-	20	20	-	20
	G13-02	G13-02	-	-	N5 03.017 W52 58.559	mai-13	-	-	-	-	-	-	8	8	-	-
	Maman Lézard	G14-93	-	-	N5 03.883 W52 59.735	mars-14	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-
	Clio	G13-21	21	-	N5 06.045 W52 57.878	mai-13	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3

Embira place	G12-123	123	-	N5 03.460 W52 58.491	oct-12	-	-	-	-	-	-	-	-	1	19
Embira place	G12-124	124	-	N5 03.462 W52 58.476	oct-12	-	-	-	-	-	-	-	-	11	9
Embira place	G12-125	125	-	N5 03.492 W52 58.453	oct-12	-	-	-	-	-	-	-	-	15	5
Maman Lézard	G14-88	88	-	N5 03.916 W52 59.727	mars-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
Maman Lézard	G14-92	92	-	N5 03.893 W52 59.738	mars-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
Mazda	G13-34A	34A	-	N5 07.176 W52 57.963	mai-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
Mazda	G13-34B	34B	-	N5 07.176 W52 57.963	mai-13	-	-	-	-	-	-	-	-	2	18
P305	G13-08	8	-	N5 05.235 W52 57.975	mai-13	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10
P305	G14-25	25	-	N5 05.344 W52 57.881	mars-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
P305	G14-26	26	-	N5 05.340 W52 57.874	mars-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
P305	G14-30	30	-	N5 05.290 W52 57.989	mars-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
PK24	Em1	Em1	-	N5 04.534 W53 01.315	oct-12	-	-	-	-	-	-	-	-	1	19
PK24	Em1A	Em1A	-	N5 04.534 W53 01.312	oct-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
River	G14-133	133	-	N5 04.190 W53 03.187	mars-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
River	G14-37	37	-	N5 04.106 W53 03.212	mars-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
River	G14-61	61	-	N5 04.201 W53 03.191	mars-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
River	G14-64	64	-	N5 04.194 W53 03.210	mars-14	-	-	-	-	1	-	-	-	-	20

RR1	Em7	Em7	-	N5 04.073 W52 58.773	oct-12	-	-	-	-	20	-	-	-	-	20
RR1	G12-111	111	-	N5 04.074 W52 58.737	oct-12	-	-	-	-	-	-	-	-	1	19
RR1	G12-30	30	-	N5 04.140 W52 58.773	oct-12	-	-	-	-	-	-	-	-	3	17
RR1	G13-42	42	-	N5 04.284 W52 58.821	mai-13	-	-	-	-	-	-	-	-	9	11
RR1	G14-105	105	-	N5 04.183 W52 58.730	mars-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
RR1	G14-114	114	-	N5 04.227 W52 58.780	mars-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
RR1	G14-125	125	-	N5 04.167 W52 58.757	mars-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
RR2	G13-11	11	-	N5 04.506 W52 58.377	mai-13	-	-	-	-	-	-	-	-	13	7
RR2	G13-15	15	-	N5 04.634 W52 58.217	mai-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
RR2	G13-23	23	-	N5 04.542 W52 58.432	mai-13	-	-	-	-	1	-	-	-	10	10
RR2	G13-38	38	-	N5 04.531 W52 58.378	mai-13	-	-	-	-	-	-	-	-	14	6
RR2	G14-17	17	-	N5 04.532 W52 58.089	mars-14	-	-	-	-	-	-	-	-	6	14
RR2	G14-21	21	-	N5 04.548 W52 58.049	mars-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20

Annexe 2 : Ensemble des colonies échantillonnées sur le site de Petit Saut et des individus utilisés dans les analyses génétiques pour *Silvestritermes minutus*. AQS : nomenclature et individus utilisés dans l'étude AQS, POP : nomenclature et individus utilisés dans l'étude de génétique des populations. RP ♀ : reines primaires, RP ♂ : rois primaires, IM (♂/♀) : imagos mâles et femelles, FN : femelles néoténiques, MN, mâles néoténiques, NY (♂/♀) : nymphes mâles et femelles, O : ouvriers, S : soldats.

Espèce	Site	Colonie	Code AQS	Code POP	Coordonnées GPS	Campagne	RP ♀	RP ♂	IM (♂/♀)	FN	MN	NY (♂/♀)	O AQS	S AQS	S POP	
<i>Silvestritermes minutus</i>	P305	23	a	-	N5 05.320 W52 57.869	mars-14	-	1	-	10	-	-	15	15	-	
	River	36	b	-	N5 04.121 W53 03.230	mars-14	-	1	-	14	-	-	15	15	-	
	River	42	c	-	N5 04.131 W53 03.197	mars-14	-	1	-	18	-	-	15	15	-	
	River	43	d	-	N5 04.131 W53 03.198	mars-14	-	1	-	18	-	-	15	15	-	
	Maman Lézard	84	e	-	N5 04.005 W52 59.813	mars-14	1	1	-	2	-	-	15	15	-	
	Clio	100	f	-	N5 06.054 W52 57.896	mars-14	-	1	-	18	-	-	15	15	-	
	RR1	205	g	-	N5 04.430 W52 58.753	oct-14	-	1	-	-	-	-	29	-	-	
	RR1	47	h	47	N5 04.342 W52 58.735	avr-15	-	1	-	20	-	4 / 0	15	15	15	
	RR1	59	i	59	N5 04.257 W52 58.767	avr-15	-	1	-	10	-	10 / 0	15	15	15	
	Football field	107	j	107	N5 04.421 W53 03.243	avr-15	-	1	-	16	-	-	15	15	15	
	River	39	k	-	N5 04.104 W53 03.214	juin-16	-	-	30/30	-	-	-	18	18	-	
	River	42	l	-	N5 04.098 W53 03.261	juin-16	-	-	30/30	-	-	-	18	18	-	
	Football field	101	101	-	N5 04.366 W53 03.305	avr-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15

Football field	103	103	-	N5 04.361 W53 03.295	avr-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
Football field	105	105	-	N5 04.427 W53 03.266	avr-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
Football field	109	109	-	N5 04.373 W53 03.288	avr-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
Football field	207	207	-	N5 04.360 W53 03.337	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
Football field	202	202	-	N5 04.384 W53 03.271	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
Football field	204	204	-	N5 04.389 W53 03.269	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
Football field	208	208	-	N5 04.411 W53 03.223	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
Football field	210	210	-	N5 04.423 W53 03.221	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
Football field	212	212	-	N5 04.427 W53 03.217	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
Football field	213	213	-	N5 04.413 W53 03.215	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
Football field	215	215	-	N5 04.351 W53 03.182	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
Football field	216	216	-	N5 04.424 W53 03.216	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
PK24	1	1	-	N5 04.634 W53 01.325	mars-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
PK24	5	5	-	N5 04.628 W53 01.331	mars-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
PK24	8	8	-	N5 04.650 W53 01.361	mars-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
PK24	217	217	-	N5 04.574 W53 01.313	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
PK24	219	219	-	N5 04.592 W53 01.295	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15

PK24	221	221	-	N5 04.612 W53 01.307	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
PK24	224	224	-	N5 04.605 W53 01.309	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
PK24	225	225	-	N5 04.654 W53 01.329	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
PK24	226	226	-	N5 04.598 W53 01.304	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
PK24	227	227	-	N5 04.598 W53 01.304	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
PK24	228	228	-	N5 04.628 W53 01.321	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
PK24	229	229	-	N5 04.667 W53 01.334	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
PK24	232	232	-	N5 04.648 W53 01.324	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
PK24	236	236	-	N5 04.655 W53 01.309	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
RR1	17	17	-	N5 04.383 W52 58.775	avr-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
RR1	21	21	-	N5 04.354 W52 58.776	avr-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
RR1	27	27	-	N5 04.408 W52 58.759	avr-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
RR1	45	45	-	N5 04.326 W52 58.696	avr-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
RR1	56	56	-	N5 04.357 W52 58.708	avr-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
RR1	69	69	-	N5 04.429 W52 58.755	avr-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
RR1	86	86	-	N5 04.354 W52 58.768	avr-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
RR1	111	111	-	N5 04.411 W52 58.680	avr-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15

RR1	231	231	-	N05 04.319 W52 58.739	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
RR1	237	237	-	N05 04.363 W52 58.703	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
RR1	233	233	-	N05 04.310 W52 58.729	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15
RR1	235	235	-	N05 04.318 W52 58.712	nov-15	-	-	-	-	-	-	-	-	15

Résumé

Chez les insectes sociaux, les reproductrices doivent faire face à un dilemme entre coûts et bénéfices de la reproduction asexuée et sexuée. Récemment, il a été montré que les reines termites pouvaient résoudre ce dilemme en optant pour l'utilisation alternée de la reproduction asexuée et sexuée, en produisant des femelles secondaires néoténiques par parthénogenèse, et les ouvriers, soldats et futurs essaimants par reproduction sexuée. Cette stratégie, appelée AQS pour « Asexual Queen Succession », a été décrite chez trois termites souterrains xylophages de la famille des Rhinotermitidae. Deux espèces humivores appartenant à la famille des Termitidae et particulièrement abondantes en forêt néotropicale, *Embiratermes neotenicus* et *Silvestritermes minutus* (Syntermitinae), semblaient être des nouvelles candidates pour cette stratégie, car elles présentaient des nids menés par de nombreuses femelles néoténiques. Pour confirmer cette hypothèse et déterminer l'origine génétique de ces femelles, des castes stériles et des futurs essaimants, nous avons développé une banque de microsatellites spécifiques pour *E. neotenicus* et *S. minutus*, et génotypé une dizaine de colonies du site de Petit Saut en Guyane, pour chaque espèce. Nous avons confirmé que les castes stériles et les imagos étaient issus pour la très grande majorité de reproduction sexuée, alors que les femelles néoténiques étaient issues de parthénogenèse avec fusion centrale, un mécanisme différent de celui décrit chez les Rhinotermitidae. La reconstruction détaillée du cycle de vie de *S. minutus* nous a permis de conclure que l'AQS, au-delà des bénéfices communs à toutes les espèces i.e. la succession de plusieurs générations de reproductrices sans dilution de la participation génétique de la reine fondatrice, l'augmentation du potentiel reproductif de la colonie et la prévention de la consanguinité chez les castes stériles et les imagos, permettait à cette espèce d'investir dans un seul évènement massif d'essaimage pendant un cycle de vie très court. D'autre part, nous avons réalisé une analyse de structuration génétique des colonies et des populations d'*E. neotenicus* et de *S. minutus* dans le but de comprendre les conséquences de la dispersion, des modalités d'appariement et de la participation des différents reproducteurs sur la consanguinité des colonies et la potentialité de colonisation de ces espèces. Pour environ 40 colonies de chaque espèce, nous avons montré que les reproducteurs fondateurs étaient très majoritairement non apparentés, et une absence de viscosité à une échelle locale (1 à 11 km), suggérant une dispersion importante des essaimants. De plus, seule une très faible structuration génétique a pu être détectée sur l'ensemble du site d'échantillonnage, indiquant des flux de gènes peu contraints.

Mots-clés : Termites humivores – Termitidae – Stratégie de reproduction – Dispersion – Microsatellites

Abstract

In social insects, reproductive females have to face a dilemma between costs and advantages of asexual and sexual reproduction. Recently, termite queens were shown to be able to solve this dilemma by using alternatively asexual and sexual reproduction, with the production of secondary neotenic females by parthenogenesis, and workers, soldiers and future alate reproductives by sexual reproduction. This strategy, called AQS for Asexual Queen Succession, was described in three subterranean xylophagous termites of the Rhinotermitidae family. Two soil-feeding species belonging to the Termitidae family, and particularly abundant in Neotropical forest, *Embiratermes neotenicus* and *Silvestritermes minutus* (Syntermitinae), seemed to be new candidates for this strategy since they showed colonies headed by numerous neotenic females. In order to confirm this hypothesis and determine the genetic origin of these females, of sterile castes and future imagoes, we developed specific microsatellite libraries for *E. neotenicus* and *S. minutus*, and genotyped about ten colonies for each species, on the site of Petit Saut in French Guiana. We confirmed that sterile castes and imagoes were mostly produced by sexual reproduction, while neotenic females were produced by parthenogenesis with central fusion, a mechanism different from that described in Rhinotermitidae species. The detailed reconstruction of *S. minutus* life cycle allowed us to conclude that AQS, in addition to advantages common to all species i.e. succession of queen generations with undiluted genetic input of the foundress, multiplication of reproductive potential of the colony and prevention of inbreeding in sterile castes and dispersers, would allow this species to optimize a single dispersal event within a very short life cycle. Otherwise, we realized an analysis of colony and population genetic structuration of both species in order to understand consequences of dispersion, mating strategies and parental allocation on inbreeding and colonization abilities of both species. For about 40 colonies of each species, we showed that most of founding reproductives were not related, and absence of genetic viscosity at a local scale (1 to 11 km) suggesting long dispersal flights of alates. Furthermore, only a weak genetic structuration was detected, indicating unfettered gene flows on the sampling site.

Keywords: Soil-feeding termites – Termitidae – Reproductive strategy – Dispersion – Microsatellites